

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 210**

51 Int. Cl.:

A61K 31/716 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/US2012/054071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12829310 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2753337**

54 Título: **Composiciones que incluyen β -glucanos y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

09.09.2011 US 201161532647 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.02.2019

73 Titular/es:

**BIOThERA, INC. (100.0%)
3388 Mike Collins Drive
Eagan, MN 55121, US**

72 Inventor/es:

**GORDEN, KEITH B.;
BOSE, NANDITA;
CHAN, ANISSA S.H. y
GROSSMAN, WILLIAM J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 698 210 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que incluyen β -glucanos y procedimientos de uso

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/532.647, presentada el 9 de septiembre de 2011.

Sumario de la invención

La invención se refiere en general a composiciones de β -glucano tal como se define en las reivindicaciones y el procedimiento de uso de tales composiciones. En un aspecto, describimos un adyuvante para una composición farmacéutica. En general, el adyuvante incluye un β -glucano derivado de levadura soluble y un agonista de TLR 7, TLR 8 o TLR 9, cada uno en una cantidad que, en combinación con el otro, es eficaz para aumentar la respuesta inmune del sujeto a un antígeno.

En otro aspecto, describimos composiciones que incluyen en general un componente de antígeno, un componente de β -glucano que comprende un β -glucano derivado de levadura soluble y un componente de agonista de TLR que comprende un agonista de TLR 7, TLR 8 o TLR 9. Estas composiciones pueden administrarse a un sujeto para modular el sistema inmune del sujeto. Por lo tanto, describimos adicionalmente un procedimiento que incluye en general la administración a un sujeto de una composición que comprende un β -glucano derivado de levadura soluble y un agonista de TLR 7, TLR 8 o TLR 9, cada uno en una cantidad que, en combinación con el otro, es eficaz para aumentar la respuesta inmune del sujeto a un antígeno. En algunos casos, el antígeno pueden ser un componente adicional de la composición. En otros casos, el antígeno puede ser un antígeno endógeno. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, describimos un procedimiento que incluye generalmente la administración a un sujeto de una cantidad de β -glucano soluble eficaz para reducir la activación inmune crónica.

El resumen anterior de la presente invención no está previsto para describir cada realización desvelada o cada implementación de la presente invención. La descripción que sigue más particularmente ejemplifica realizaciones ilustrativas de la invención y aspectos adicionales de la presente divulgación. En varios lugares en toda la solicitud, se proporciona orientación mediante listas de ejemplos, cuyos ejemplos pueden usarse en diversas combinaciones. En cada caso, la lista citada sirve solo como un grupo representativo y no debe interpretarse como una lista exclusiva.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra la unión de β -glucano soluble a linfocitos B, monocitos o células dendríticas derivadas de monocitos.

La FIG. 2 muestra la modulación de β -glucano soluble de la proliferación de linfocitos B inducida por agonistas de TLR.

La FIG. 3 muestra la modulación de β -glucano soluble de la proliferación de linfocitos B inducida por agonistas de TLR.

La FIG. 4 muestra la modulación de β -glucano soluble de la expresión de marcador coestimulador inducido por TLR mediante monocitos.

Descripción detallada de realizaciones preferentes

En el presente documentos se desvelan composiciones y procedimientos relacionados a combinaciones de β -glucano soluble y un agonista de un receptor tipo Toll (TLR). Las combinaciones pueden proporcionar actividad inmunoestimulante cuando se administra a un sujeto. Por lo tanto, la combinación de un β -glucano soluble y un agonista de TLR pueden ser útiles como adyuvantes a una composición farmacéutica terapéutica y/o profiláctica - por ejemplo, una vacuna - diseñada para inducir una respuesta inmune específica a antígeno. En algunos casos, la combinación de un β -glucano soluble y un agonista de TLR pueden proporcionar inmunoestimulación aumentada y/o efectos secundarios reducidos en comparación con el uso de un agonista de TLR como un adyuvante sin el β -glucano.

Los receptores tipo Toll (TLR) son una clase de proteínas que reconoce componentes conservados sobre microbios referidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). La interacción de los PAMP con sus TLR correspondientes activa la respuesta inmune innata para procesar y presentar antígenos microbianos a células del sistema inmune adaptativo. Desde su descubrimiento en 1990, los TLR han mostrado estar involucrados en la defensa de los mamíferos frente a patógenos y enfermedades relacionadas con infecciones microbianas. Los TLR de activación que están presentes sobre la superficie de células que presentan antígenos pueden inducir una diversa gama de efectos entre los que se incluyen, por ejemplo, la mejora del procesamiento y presentación de antígenos. El reconocimiento de TLR de los PAMP aislados de sus patógenos nativos puede influir en la respuesta del organismo a antígenos extraños. Se han investigado las propiedades de agonistas de TLR de varios PAMP en humanos para una variedad de fines entre los que se incluye, por ejemplo, como un adyuvante en vacunas tumorales y vacunas virales. Por ejemplo, el imiquimod es un agonista de TLR 7/8 que es útil para tratar carcinoma basocelular,

5 queratosis actínica y verrugas genitales. El lípido de monofosforilo A (MPL, un agonista de TLR 4) se usa como un adyuvante en la vacuna contra el VPH CERVARIX (GlaxoSmithKline). Los agonistas de TLR se están investigando actualmente en ensayos clínicos principalmente por sus propiedades adyuvantes en diversas indicaciones de enfermedades (Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. Vaccine. 14 de agosto de 2010). Investigaciones ejemplares se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Agonistas de TLR	Indicaciones de enfermedad perseguidas en ensayos clínicos
Adyuvantes dependientes de TLR 2	enfermedad de Lyme, malaria, VIH, VHB, VPH
Adyuvantes dependientes de TLR 4	Hepatitis B, VPH genital, VHS genital, EBV, leishmaniasis, VIH, malaria, tuberculosis, melanoma, cáncer de mama, cáncer broncopulmonar, cáncer de próstata
Adyuvantes dependientes de TLR 7/8	LMC, cáncer vulvar, cáncer de próstata, melanoma
Adyuvantes dependientes de TLR 9	Enfermedades infecciosas: malaria, hepatitis B, gripe, Cáncer de ántrax: melanoma, sarcoma de cáncer de mama, cáncer de ovario, glioblastoma

10 Los β -glucanos de levadura son estructuras microbianas conservadas que no se encuentran en las células de mamíferos. IMPRIME PGG ($\beta(1,6)$ -[poli-1,3]-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa) es un β -glucano soluble aislado de levadura. Como muchos otros β -glucanos solubles, la IMPRIME PGG es una estructura microbiana conservada que no se encuentra en mamíferos. Puesto que las células inmunes innatas reconocen la IMPRIME PGG, la IMPRIME PGG puede clasificarse como un PAMP. De hecho, hemos demostrado que la IMPRIME PGG, así como otros β -glucanos solubles (es decir, laminarina), puede unirse a neutrófilos humanos, monocitos, linfocitos B y células dendríticas (CD) derivadas de monocitos. la IMPRIME PGG une diversos subconjuntos de células inmunes mediante receptores de unión de complemento (CR2 en linfocitos B; CR3 sobre neutrófilos y monocitos), no un TLR.

15 Mientras que muchos PAMP asociados TLR (es decir, LPS, Pam3Cys, poli I:C) inducen citocinas proinflamatorias tales como, por ejemplo, las citocinas reguladas por $\text{NF-}\kappa\text{B}$ TNF- α y IL-12, β -glucanos solubles tales como IMPRIME PGG no parecen inducir citocinas proinflamatorias sistémicas. Por lo tanto, parece que el β -glucano soluble puede modular respuestas inmunes de un modo distintos a los agonistas de TLR.

20 Hemos descubierto que las células tratadas con β -glucano soluble pueden modular la respuesta a agonistas de TLR como se ha medido mediante marcadores y proliferación de la activación celular. Este descubrimiento puede aprovecharse combinando un β -glucano soluble con un agonista de TLR para producir una composición adyuvante que puede aumentar una respuesta inmune generada frente a un antígeno particular. Puesto que los agonistas de TLR y β -glucanos soluble modulan respuestas inmunes a través de distintas trayectorias, antes de esta divulgación no estaba claro si, en combinación entre sí, la actividad inmunomoduladora de un β -glucano soluble interferiría con, se complementaría o no tendría ningún efecto sobre la actividad inmunomoduladora del agonista de TLR. Mostramos que el β -glucano soluble puede aumentar la actividad inmunomoduladora de un agonista de TLR, permitiendo, de este modo, lograr un nivel deseado de inmunomodulación usando menos agonista de TLR. A continuación se describen con más detalles determinados beneficios de este avance.

25 30 En general, por lo tanto, las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento se refieren a la mejora de la eficacia de una composición farmacéutica aumentando el efecto inmunoestimulante de la composición. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para aumentar la potencia inmunológica de una composición farmacéutica tal como, por ejemplo, una vacuna. La mejora de la eficacia de una composición farmacéutica puede proporcionar uno o más beneficios tales como, por ejemplo, menores administraciones de la composición farmacéutica para lograr un resultado deseado, mejorar o establecer la eficacia de una composición farmacéutica, un tratamiento más rápido o completo, efectos secundarios reducidos asociados con la composición farmacéutica o menores costes.

35 40 Por ejemplo, determinadas vacunas incluyen múltiples componentes inmunogénicos, algunos de los cuales (por ejemplo, toxoides) pueden causar efectos secundarios no deseables tales como, por ejemplo, dolor, hinchazón, sensibilidad y similares. Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento pueden aumentar la respuesta inmune a un componente particular de una composición farmacéutica (por ejemplo, un toxoide de vacuna) suficientemente de modo que puede necesitarse menos del componente particular para proporcionar el nivel deseado de respuesta inmune, reduciendo, de este modo, o incluso eliminando los efectos secundarios no deseables del componente.

45 Puesto que los β -glucanos solubles son macromoléculas, su diseminación a la circulación sistémica es mucho más lenta que, por ejemplo, los agonistas de TLR de molécula pequeña. Su retención en el sitio de administración puede

crear un área localizada que se sensibiliza a la activación de TLR. Esta propiedad física puede crear un "efecto de depósito" en el que el antígeno y las células inmunes son capaces de interactuar en el contexto adecuado para estimular una respuesta inmune y aumentar la eficacia de una vacuna. Esta propiedad permitiría un aumento localizado en la expresión de determinadas citocinas y quimiocinas (por ejemplo, TNF- α , IL-12, IFN- α) mientras que limita el grado y/o probabilidad de que la inmunoestimulación pueda manifestarse sistémicamente. Por lo tanto, la combinación de un agonista de TLR con un β -glucano soluble puede crear un área localizada de mayor inmunoestimulación, permitiendo, de este modo, la inducción de un nivel deseado de inmunoestimulación con, en algunos casos, una cantidad inferior de agonista de TLR. La administración de una cantidad inferior de agonista de TLR puede disminuir la probabilidad, grado y/o efectos del agonista de TLR de inducir inflamación sistémica.

- 10 Requerir menos de cada componente de la composición farmacéutica para lograr una respuesta inmune deseada puede resultar en menores costes para producir la composición farmacéutica, tal como cuando un componente particular es costoso, por ejemplo, de obtener o formular.

15 Por lo tanto, en un aspecto, en el presente documento describimos una composición adyuvante que incluye en general un β -glucano soluble y un agonista de TLR, cada uno en una cantidad que, en combinación con el otro, es eficaz para aumentar la respuesta inmune del sujeto a un antígeno.

20 El compuesto de β -glucano soluble puede ser o derivar de, por ejemplo, β -glucano derivado de una fuente de levadura fúngica tal como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torula (Candida utilis)*, *Candida albicans*, *Pichia stipitis* o cualquier otra fuente de levadura; β -glucano derivado de otra fuente fúngica tal como, por ejemplo, escleroglucano derivado de *Sclerotium rofsii* o cualquier otra fuente fúngica de no levadura; β -glucano de una fuente de algas tal como, por ejemplo, laminarina o ficarina de *Laminaria digitata* o cualquier otra fuente de algas; β -glucano de una fuente bacteriana tal como, por ejemplo, curdlano de *Alcaligenes faecalis* o cualquier otra fuente bacteriana; β -glucano de una fuente de hongos tal como, por ejemplo, esquizofilano de *Schizophyllum commune*, lentinano de *Lentinan edodes*, grifolano de *Grifola frondosa*, ganoderano de *Ganoderma lucidum*, cresina de *Coriolus versicolor*, paquimano de *Poria cocos Wolf* o cualquier otra fuente de hongos; β -glucano derivado de una fuente de grano de cereal tal como, por ejemplo, glucano de avena, glucano de cebada o cualquier otra fuente de grano de cereal; β -glucano derivado de una fuente de líquen tal como, por ejemplo, pustulano de *Umbilicaris pustulata*, líquenano de *Cetraria islandica* o cualquier otra fuente de líquen. De acuerdo con la invención el β -glucano es β -glucano derivado de levadura soluble. En algunas realizaciones, el β -glucano puede ser o derivarse de un β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae*. Una tal forma de β -glucano derivado de *Saccharomyces cerevisiae* es $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli-b(1,3)-D-glucopiranososa - también denominado en el presente documento como IMPRIME PGG, una forma soluble en agua de β -glucano derivado de levadura. La laminarina es un ejemplo de un β -1,3/1,6 glucano derivado de algas. En algunas realizaciones, el β -glucano soluble se puede opsonizar tal como se describe en, por ejemplo, la Solicitud de patente internacional n.º PCT/US2012/040435, presentada el 1 de junio de 2012.

35 La composición adyuvante incluye adicionalmente un agonista de al menos uno de TLR 7, TLR 8 o TLR 9. Como se utiliza en el presente documento, "agonista" se refiere a un compuesto que puede combinarse con un TLR para inducir una actividad celular mediada por TLR. Las actividades celulares mediadas por TLR se describen con mayor detalle a continuación. Un agonista puede ser un ligando que se une directamente al receptor. Como alternativa, un agonista puede combinarse con un receptor indirectamente mediante, por ejemplo, la formación de un complejo con otra molécula que se une directamente al TLR. Un agonista puede referirse como un agonista de un TLR particular (por ejemplo, un agonista de TLR 9) o una combinación particular de TLR (por ejemplo, un agonista de TLR 7/8 - una agonista de tanto TLR 7 como TLR 8). Agonistas de TLR ejemplares incluyen, por ejemplo, un agonista de TLR 1 (por ejemplo, un lipopéptido de triacilo), un agonista de TLR 2 (por ejemplo, un ácido lipoteicoico), un agonista de TLR 3 (por ejemplo, ARNds), un agonista de TLR 4 (por ejemplo, lipopolisacárido o LPS), un agonista de TLR 5 (por ejemplo, flegelina), un agonista de TLR 6 (por ejemplo, peptidoglicano), un agonista de TLR 7 (por ejemplo, ARNss, imidazoquinolinas, loxoribina), un agonista de TLR 8 (por ejemplo, imidazoquinolinas, loxoribina) o un agonista de TLR 9 (por ejemplo, un oligonucleótido CpG no metilado).

En determinadas realizaciones, el agonista de TLR puede ser un agonista en tanto TLR 7 como/o TLR 8. En otras realizaciones, el agonista de TLR puede ser un agonista de TLR 9.

50 En algunas realizaciones, el β -glucano soluble y el agonista de TLR puede unirse covalentemente entre sí. Procedimientos para unir covalentemente el β -glucano soluble y el agonista de TLR incluye procedimientos para, por ejemplo, conjugar o reticular compuestos biológicos y son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los reticulantes heterobifuncionales son conocidos y hay muchos disponibles en el mercado. Véase, por ejemplo, Hermanson, G. (1996), Bioconjugate Techniques, Academic Press, Capítulo 5 "Heterobifunctional Cross-Linkers", 229-285. Además, grupos reactivos del β -glucano soluble y agonista de TLR adecuado para regular sitios pueden incluir grupos reactivos que se describen en Hermanson, G. (1996), Bioconjugate Techniques, Academic Press, Capítulo 2 "The Chemistry of Reactive Functional Groups", 137-166. Además, procedimientos para derivatizar compuestos de β -glucano se describen en, por ejemplo, la Solicitud de patente internacional n.º PCT/US2012/036795.

60 La composición adyuvante incluye β -glucano soluble y agonista de TLR en cantidades que, en combinación entre sí, son eficaces para inducir una respuesta inmune frente a un antígeno diana. Los componentes de tal composición

adyuvante - o de una composición más grande que incluye además un antígeno, tal como se describe con mayor detalle a continuación - puede decirse que se suministra "en combinación" entre sí si los componentes se proporcionan de cualquier modo que permita que el efecto biológico de poner en contacto un componente con las células inmunes se sostenga al menos hasta que se ponga en contacto otro componente con las células inmunes.

5 Por lo tanto, los componentes pueden suministrarse en combinación entre sí incluso si se proporcionan en formulaciones separadas, suministrarse a través de vías distintas de administración y/o administrarse en tiempos distintos. En general, cualquier composición multicomponente que se describe en el presente documento puede proporcionarse en una o más formulaciones separadas.

10 Por ejemplo, un β -glucano soluble y un agonista de TLR puede considerarse "en combinación" entre sí independientemente de si los componentes se proporcionan en una única formulación o el β -glucano soluble se administra en una formulación y el agonista de TLR se administra en una segunda formulación. Cuando se administra en formulaciones distintas, los componentes pueden administrarse en tiempos distintos, si se desea, pero administrarse de tal forma que la respuesta inmune inducida es mayor que la respuesta inmune inducida si o bien el β -glucano soluble o bien el agonista de TLR se administra solo.

15 Como se utiliza también en el presente documento, el término "inducir" y variaciones del mismo se refieren a cualquier aumento medible en la actividad celular. Por ejemplo, la inducción de una actividad celular mediada por TLR puede incluir, por ejemplo, la activación, proliferación o maduración de una población de células inmunes, aumento de la producción de una citocina y/u otro indicador de función inmune aumentada. En determinadas realizaciones, la inducción de una respuesta inmune puede incluir aumentar la proliferación de linfocitos B, la
20 producción de anticuerpos específicos a antígeno, el aumento de la proliferación de linfocitos T específicos a antígeno, la mejora de la presentación de antígeno de células dendríticas y/o un aumento de expresión de determinadas citocinas, quimiocinas y marcadores coestimulantes.

25 Por ejemplo, Las FIG. 2 y FIG. 3 muestran que el tratamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con un β -glucano soluble, IMPRIME PGG, y o bien un agonista de TLR 7/8 (CL097, FIG. 2) o bien un agonista de TLR 9 (CpG 2006, FIG. 3) aumenta la proliferación de linfocitos B en comparación con CMSP tratadas solo con el agonista de TLR. La FIG. 4 muestra un aumento en la expresión de CD40 cuando las CMSP se incuban con un β -glucano soluble, IMPRIME PGG y un agonista de TLR 4, LPS, en comparación con el tratamiento de CMSP con solo el agonista de TLR. Este efecto se magnifica cuando las CMSP se incuban previamente con el β -glucano soluble antes de tratarse con el agonista de TLR.

30 Las actividades ejemplificadas en las FIG. 2-4 son completamente indicativas de un fenómeno más general manifestado cuando se combina β -glucano soluble y un agonista de TLR. Por lo tanto, un experto en la técnica puede extrapolar la activación ejemplificada en las FIG. 2-4 a otras manifestaciones de inmunomodulación tales como, por ejemplo, el aumento de proliferación de linfocitos T específicos a antígeno, la producción de anticuerpos específicos a antígeno y, en última instancia, el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de afecciones neoplásicas y/o
35 infecciosas.

El antígeno frente al cual se induce la respuesta inmune puede ser un antígeno endógeno tal como, por ejemplo, un antígeno tumoral asociado con un tumor ya presente en el sujeto. En otros casos, el antígeno puede ser un antígeno exógeno tal como, por ejemplo, un antígeno presente en una vacuna terapéutica o profiláctica.

40 En el caso de antígenos exógenos, el antígeno puede incluirse en la composición de β -glucano soluble/antagonista de TLR o proporcionarse en una composición separada. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, las composiciones que se describen en el presente documento pueden incluir en general un componente de antígeno, un componente de β -glucano soluble y un componente de agonista de TLR.

45 Como se utiliza en el presente documento, "antígeno" y variaciones del mismo se refieren a cualquier material capaz de provocar una respuesta inmune en un sujeto desafiado con el material. En varias realizaciones, un antígeno puede provocar una respuesta inmune mediada por células, una respuesta inmune humoral o ambas. Antígenos ejemplares incluyen pero no están limitados a péptidos o polipéptidos; lípidos; glicolípidos; polisacáridos; hidratos de carbono; polinucleótidos; priones; bacterias vivas o inactivadas, virus, hongos o parásitos; e inmunógenos bacterianos, virales, fúngicos, protozoarios, derivados de tumores o derivados de organismos, toxinas o toxoides.

50 Por lo tanto, antígenos ejemplares incluyen antígenos virales tales como, por ejemplo, antígenos asociados con gripe, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, adenovirus, Herpes Simple B u otros virus adecuados.

Antígenos ejemplares también pueden incluir un antígeno asociado con un tipo particular de neoplasma o tumor. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, MUC-1, CA 125, telomerasa/hTERT, PSA, NY-ESO-1, MAGE, fusiones de AML1, EGFR, HER2/NEU, gp100, WT1, CEA u otro antígeno que tenga una asociación conocida con uno o más tumores.

55 Antígenos ejemplares también pueden incluir antígenos bacterianos tales como, por ejemplo, toxoide tetánico, toxoide diftérico, un antígeno de la especie de *Staphylococcus*, un antígeno de la especie de *Pneumococcus*, un antígeno de la especie de *Klebsiella* u otro antígeno bacteriano.

Antígenos ejemplares también pueden incluir antígenos parasitarios tales como, por ejemplo, un antígeno de la especie de *Trypanosoma*, un antígeno de la especie de *Toxoplasma*, un antígeno de la especie de *Leishmania*, un antígeno de la especie de *Plasmodium*, un antígeno de la especie de *Schistosoma* u otro antígeno parasitario.

5 La composición adyuvante incluye β -glucano soluble y agonista de TLR en cantidades que, en combinación entre sí, son eficaces para inducir una respuesta inmune frente a un antígeno diana. En algunas realizaciones, la administración de la composición de adyuvante puede proporcionar el tratamiento profiláctico y/o terapéutico para una afección. Como se utiliza en el presente documento, "tratar", "tratamiento" o variaciones del mismo se refieren a la reducción, limitación de la progresión, mejora, prevención o resolución, en cualquier medida, de los síntomas o signos clínicos relacionados con una afección. Como se utiliza en el presente documento, "mejorar" se refiere a cualquier reducción en la medida, gravedad, frecuencia y/o probabilidad de un síntoma o signo clínico característico de una afección particular. El tratamiento puede ser profiláctico o terapéutico. "Profiláctico" y variaciones del mismo se refiere a un tratamiento que limita, en cualquier medida, el desarrollo y/o aparición de un síntoma o signo clínico de una afección. "Terapéutico" y variaciones del mismo se refieren a un tratamiento que mejora uno o más síntomas existentes o signos clínicos asociados con una afección. Como se utiliza en el presente documento, "síntoma" se refiere a cualquier evidencia subjetiva de enfermedad o de una afección de un paciente y "signo" o "signo clínico" se refiere a un hallazgo físico objetivo relacionado con una afección particular capaz de encontrarse por otra persona distinta del paciente.

20 En general, las células asociadas con una afección -por ejemplo, células tumorales o células de un patógeno - expresan determinado antígeno de modo que una respuesta inmune generada frente al antígeno puede ser eficaz para inactivar y/o eliminar al menos algunas de las células asociadas con la afección. Por lo tanto, la administración de la composición adyuvante puede provocar una respuesta inmune frente a células que expresan el antígeno, limitar la progresión de la afección y/o mejorar uno o más síntomas o signos clínicos de la afección.

25 Determinados agonistas de TLR pueden inducir una respuesta inmune aumentada frente a un antígeno, pero también puede hacerlo con los efectos secundarios simultáneos tales como, por ejemplo, la inducción sistémica de determinadas citocinas proinflamatorias tales como, por ejemplo, Interferones de tipo I, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MIP-1 y/o MCP-1. Puesto que los β -glucanos inducen respuestas inmunes a través de una trayectoria no inflamatoria, la combinación de un agonista de TLR y un β -glucano puede inducir un nivel deseado de respuesta inmune mientras que disminuye la cantidad de agonista de TLR que está siendo administrado y, por lo tanto, disminuir la probabilidad y/o grado de inflamación asociado con la respuesta inmune inducida por agonista de TLR.

30 En consecuencia, las composiciones de adyuvante descritas en el presente documentos pueden tener una utilidad particular en conexión con el tratamiento de individuos que tienen activación inmune crónica como puede asociarse con afecciones tales como, por ejemplo, aterosclerosis u otros trastornos asociados con la autoinmunidad.

35 La aterosclerosis es una afección en la cual hay un espesor de la pared arterial como resultado de la acumulación de materiales grasos tales como colesterol. Es un síndrome caracterizado por una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias. De forma más general, los trastornos autoinmunitarios implican el fallo de un organismo en reconocer sus propias partes constituyentes como *propias*, que permite una respuesta inmune frente a sus propias células y tejidos. Afecciones autoinmunes ejemplares incluyen, por ejemplo, enfermedad celiaca, diabetes mellitus tipo 1 (IDDM), lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren, síndrome de Churg-Strauss, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide (AR), lupus y alergias.

45 Las composiciones de adyuvante descritas en el presente documentos también pueden ser útiles para proporcionar un tratamiento de inflamación reducida de una afección neoplásica primaria - por ejemplo, un tumor - o una afección infecciosa primaria en individuos que tienen una afección autoinmune secundaria, individuos para los cuales la inducción de la inflamación puede agravar la afección autoinmune y reducir la eficacia y/o cumplimiento del tratamiento para la afección primaria. Tal tratamiento puede ser eficaz para mejorar la afección primaria con agravación reducida de la afección autoinmune en comparación con la agravación inflamatoria que uno puede observar usando, por ejemplo, solo un agonista de TLR como adyuvante en el tratamiento de la afección primaria.

50 La composición adyuvante puede proporcionar en una formulación junto con un "portador". Como se indicó anteriormente, los componentes de la composición adyuvante pueden proporcionarse en una formulación única o en una formulación separada, ambos con respecto a entre sí y con respecto a cualquier componente adicional tal como, por ejemplo, un antígeno. En la descripción que sigue, cualquier referencia a "la composición adyuvante" contempla expresamente que la composición adyuvante puede proporcionarse en una o más formulaciones.

55 Como se utiliza en el presente documento, "portador" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, vehículo, recubrimiento, diluyente, agente antibacteriano y/o antifúngico, agente isotónico, agente retardante de la absorción, tamponador, solución de portador, suspensión, coloide o similares. El uso de tales medios y/o agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el β -glucano soluble o el agonista de TLR, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los principios activos complementarios también pueden incorporarse en las

composiciones.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no sea biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el Típicamente, se administra un vehículo a un sujeto junto con el β -glucano soluble y/o un agonista de TLR sin causar ninguno efecto biológicamente indeseado o interactuando de un modo perjudicial con cualquier otro de los componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

El β -glucano soluble y el agonista de TLR puede proporcionarse en una formulación única o en formulaciones separadas. Una formulación puede adaptarse a un vía preferente de administración. Por lo tanto, puede administrarse una formulación a través de vías conocidas entre las que se incluye, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, intradérmica, transcutánea, subcutánea, intramusculares, intravenosa, intraperitoneal, etc.) o tópica (por ejemplo, intranasal, intrapulmonar, intramamaria, intravaginal, intrauterina, intradérmica, transcutánea, rectal, etc.). Se prevé que una formulación pueda administrarse a una superficie de mucosa, tal como mediante administración a, por ejemplo, la mucosa nasal o respiratoria (por ejemplo, mediante pulverización o aerosol). También se puede administrar una formulación mediante una liberación sostenida o retardada.

Una formulación puede presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y puede prepararse mediante los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Procedimientos de preparación de una formulación con un portador farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de poner el β -glucano soluble y/o el agonista de TLR en asociación con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, puede prepararse una formulación poniendo de forma uniforme y/o íntima el β -glucano soluble y/o el agonista de TLR en asociación con el portador líquido, un portador finamente dividido o ambos y, a continuación, si es necesario, moldear el producto en las formulaciones deseadas.

La composición adyuvante que incluye el β -glucano soluble y el agonista de TLR puede proporcionar en cualquier forma adecuada que incluye aunque no se limita a una solución, una suspensión, una emulsión, una pulverización, un aerosol o cualquier forma de mezcla. La composición adyuvante puede suministrarse en una formulación con cualquier excipiente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición adyuvante puede suministrarse en una forma de dosificación tópica convencional tal como, por ejemplo, una crema, un ungüento, una formulación de aerosol, una pulverización de no aerosol, un gel, una loción y similares. Una formulación puede incluir adicionalmente uno o más aditivos que incluyen tales como, por ejemplo, un adyuvante, un potenciador de la penetración en la piel, un colorante, una fragancia, un saborizante, un humectante, un espesante y similares.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos que implican en general la administración a un individuo de una cantidad eficaz de la composición adyuvante para inducir una respuesta inmune frente a uno o más antígenos predeterminados.

La cantidad de la composición adyuvante eficaz para inducir uno o más de los efectos deseados puede variar dependiendo de diversos factores que incluyen, aunque no de forma limitante, el agonista de TLR particular en la composición adyuvante, el peso, la condición física y/o edad del sujeto y/o la vía de administración. En consecuencia, no resulta práctico indicar en general la cantidad de la composición adyuvante o las cantidades relativas de cada componente de la composición adyuvante, que constituye una cantidad eficaz para todas las aplicaciones posibles. Los expertos en la técnica, sin embargo, puede determinar fácilmente la cantidad adecuada con debida consideración a tales factores.

En algunas realizaciones, el procedimiento puede incluir administrar suficiente composición adyuvante para proporcionar una dosis de, por ejemplo, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg de cada uno del β -glucano soluble y el agonista de TLR al sujeto, aunque en algunas realizaciones los procedimientos pueden realizarse mediante la administración de la composición adyuvante en una dosis fuera de este intervalo. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la administración de suficiente composición adyuvante para proporcionar una dosis de cada componente de la composición adyuvante de aproximadamente 10 μ g/kg a aproximadamente 5 mg/kg al sujeto, por ejemplo, una dosis de cada componente de aproximadamente 100 μ g/kg a aproximadamente 1 mg/kg.

Como alternativa, la dosis puede calcularse usando el peso corporal real obtenido justo antes del inicio de un transcurso de tratamiento. Para las dosificaciones calculadas de este modo, el área de superficie corporal (m^2) se calcula antes del inicio del transcurso del tratamiento usando el procedimiento de Dubois: $m^2 = (\text{peso en kg}^{0,425} \times \text{altura cm}^{0,725}) \times 0,007184$. En algunas realizaciones, por lo tanto, el procedimiento puede incluir la administración de suficientes cantidades de la composición adyuvante para proporcionar una dosis de cada componente de la composición adyuvante de, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/ m^2 a aproximadamente 10 mg/ m^2 .

En realizaciones en las que se administra un antígeno exógeno en combinación con la composición adyuvante, el antígeno puede administrarse en una o más dosis separadas de "sensibilización" antes de administrar el antígeno en combinación con la composición adyuvante. La sensibilización de este modo puede proporcionar una respuesta inmune aumentada cuando se administra el antígeno en combinación con la composición adyuvante. En otras realizaciones, el antígeno puede administrarse en una o más dosis separadas "sensibilización" antes de administrar

el antígeno en combinación con la composición adyuvante. El refuerzo de este modo puede fortalecer una respuesta inmune al menos parcialmente resulta activando los linfocitos T de memoria CD8⁺, linfocitos T de memoria CD4⁺ o ambos. En otras realizaciones más, la composición de adyuvante puede administrarse en una o más dosis separadas de refuerzo antes de administrar el antígeno en combinación con la composición adyuvante. La composición adyuvante proporcionada en una dosis de refuerzo puede ser la misma o distinta de la composición adyuvante proporcionada en combinación con el antígeno y puede ser la misma o distinta de la composición adyuvante proporcionada en cualquier otra dosis de refuerzo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se prepararon células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) a partir de sangre obtenida de voluntarios sanos tal como se describe en Peters y col. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; 329:275-280; 1993). El día 7, las MoDCs se resuspendieron en RPMI 1640 complementado con suero humano al 10 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se obtuvieron CMSP a partir de voluntarios sanos y se resuspendieron de forma similar en RPMI 1640 complementado con suero humano al 10 %. Las MoDCs y CMSP se trataron con un vehículo solo o con IMPRIME (Biothera, Eagan, MN) a 100 µg/ml, 200 µg/ml o 400 µg/ml durante dos horas. Se evaluó la unión de IMPRIME mediante análisis citométrico de flujo con un glucano específico Ab BFD IV (Patente de los EE.UU. n.º 6.084.092).

Los resultados se muestran en la FIG. 1

Ejemplo 2

La activación de TLR de linfocitos B induce la proliferación celular que puede medirse mediante una reducción en la intensidad de tinción del tinte intracelular, éster de succinimidilo de carboxifluorescena (CFSE, Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). El principio detrás de esta técnica es que según una célula divide el tinte de CFSE se diluye por la mitad entre las células hijas después de cada división. La reducción en la intensidad de tinción medida mediante análisis FACS (BD Biosciences, San Jose, CA) indica que se ha producido la proliferación y puede controlarse sobre varios pasajes.

a) Modulación de imidazoquinolina CL097 de agonista de TLR 7/8

Las CMSP obtenidas a partir de voluntarios sanos se trataron con 2 µM de CL097 (InvivoGen, San Diego, CA) en presencia o ausencia de 50 µg/ml de IMPRIME PGG (Biothera, Eagan, MN) y se cultivaron durante cinco días en medio que contenía un 10 % de suero humano fresco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD19 (BioLegend, Inc., San Diego, CA) para identificar el subconjunto de linfocitos B en la mezcla de CMSP y se midió la intensidad de las CFSE mediante análisis FACS (BD Biosciences, San Jose, CA).

Los resultados se muestran en la FIG. 2.

b) Modulación de CpG 2006 de agonista de TLR-9

Las CMSP obtenidas a partir de voluntarios sanos se trataron con 100 nM de CpG 2006 (InvivoGen, San Diego, CA) en presencia o ausencia de 50 µg/ml de IMPRIME PGG (Biothera, Eagan, MN) y se cultivaron durante cinco días en medio que contenía un 10 % de suero humano fresco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD19 (BioLegend, Inc., San Diego, CA) para identificar el subconjunto de linfocitos B en la mezcla de CMSP y se midió la intensidad de las CFSE mediante análisis FACS (BD Biosciences, San Jose, CA).

Los resultados se muestran en la FIG. 3.

Ejemplo 3 (solo para referencia)

Las CMSP obtenidas a partir de voluntarios sanos se trataron con 25 ng/ml de LPS (InvivoGen, San Diego, CA) o bien simultáneamente con dosis anotadas de IMPRIME PGG (Biothera, Eagan, MN) o bien después de tratar previamente las células durante la noche con IMPRIME PGG. Las células se cultivaron durante cinco días en medio que contiene suero humano fresco al 10 % y, a continuación, se tiñeron con un anticuerpo anti-CD14 (BioLegend, Inc., San Diego, CA) para identificar el subconjunto de monocitos en la mezcla de CMSP y un anticuerpo anti-CD40 (BioLegend, Inc., San Diego, CA) para evaluar la expresión de CD40 mediante análisis FACS (BD Biosciences, San Jose, CA).

Los resultados se muestran en la FIG. 4.

La divulgación completa de todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones, así como material electrónicamente disponible (incluido, por ejemplo, presentaciones de secuencias de nucleótidos en, por ejemplo, el GenBank y RefSeq, así como presentaciones de secuencias de aminoácidos en, por ejemplo, SwissProt, PIR, PRF, PDB y traducciones a partir de regiones de codificación anotadas en el GenBank and RefSeq) recitadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de que exista cualquier inconsistencia entre la divulgación de la presente solicitud y la(s) divulgación(es) de cualquier documento incorporado en el

5 presente documento por referencia, regirá la divulgación de la presente solicitud. La descripción detallada y ejemplos anterior se ha proporcionado para fines de claridad de comprensión solo. No se deben entender limitaciones innecesarias de la misma. La invención no está limitada a los ejemplos exactos que se muestran y describen, pues las variaciones obvias para un experto en la técnica se incluirán dentro de la invención definida por las reivindicaciones.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "y/o" se refiere a uno o todos los elementos enumerados o una combinación de cualquiera dos o más de los elementos enumerados; el término "que comprende" y variaciones del mismo no tienen un significado limitante cuando aparecen estos términos en la descripción y reivindicaciones; a menos que se indique específicamente lo contrario, "un", "uno", "una", "el", "la", y "al menos uno/una" se usan indistintamente y significan uno o más de uno; y recitaciones de intervalos números por parámetros incluyen todos los números subsumidos dentro de este intervalo (por ejemplo 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

Para cualquier procedimiento desvelado en el presente documento que incluye etapas discretas, las etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden factible. Y, según sea adecuado, cualquier combinación de dos o más etapas puede llevarse a cabo simultáneamente.

15 A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, etc. que se usan en la memoria descriptiva y reivindicaciones, se deben entender como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y reivindicaciones son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener mediante la presente invención. Como mínimo, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significantes indicados y aplicando técnicas de redondeo normales.

20 A pesar de que los intervalos y parámetros numéricos que establecen el amplio ámbito de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se indican de la forma más precisa posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen inherentemente un intervalo que resulta necesariamente de la desviación estándar que se encuentra en sus mediciones de ensayo respectivas.

25 Todos los encabezados son para la conveniencia del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezado, a menos que así se especifique.

REIVINDICACIONES

1. Un adyuvante que comprende:
 - un β -glucano derivado de levadura soluble y
 - un agonista de TLR 7, TLR 8 o TLR 9,
- 5 cada uno en una cantidad que, en combinación con el otro, es eficaz para aumentar la respuesta inmune del sujeto a un antígeno.
2. El adyuvante de la reivindicación 1 en el que al menos un β -glucano está unido covalentemente a al menos un agonista de TLR.
3. Una composición que comprende:
 - 10 un componente de antígeno;
 - un componente de β -glucano que comprende un β -glucano derivado de levadura; y
 - un componente de agonista de TLR que comprende un agonista de TLR 7, TLR 8 o TLR 9.
4. La composición de la reivindicación 3 en la que
 - 15 (i) el componente de antígeno comprende un antígeno tumoral; o
 - (ii) el componente de antígeno comprende un antígeno de un patógeno infeccioso; en el que opcionalmente el patógeno infeccioso comprende una bacteria, un virus, un parásito o un hongo; o
 - (iii) el componente de antígeno comprende una vacuna.
5. La composición de la reivindicación 3 en el que al menos un componente de β -glucano está unido covalentemente a al menos un componente de agonista de TLR.
- 20 6. La composición de la reivindicación 3 que comprende al menos dos formulaciones, en la que una formulación comprende al menos un componente y una segunda formulación comprende al menos un componente ausente de la primera formulación.
7. Una composición que comprende un β -glucano derivado de levadura soluble y un agonista de TLR7, TLR 8 o TLR 9 para su uso en el aumento de una respuesta inmune de un sujeto a un antígeno, en la que cada uno de un β -glucano derivado de levadura soluble y un agonista de TLR son en una cantidad que, en combinación con el otro, es eficaz para aumentar la respuesta inmune del sujeto a un antígeno.
- 25 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que
 - 30 (i) β -glucano derivado de levadura soluble y el agonista de TLR se administran en una formulación única, en el que opcionalmente al menos un β -glucano derivado de levadura soluble está unido covalentemente a al menos un agonista de TLR; o
 - (i) el β -glucano derivado de levadura soluble y el agonista de TLR se administran en formulaciones separadas.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que
 - 35 (i) la composición induce una respuesta inmune inducida por TLR superior a la respuesta inmune inducida por TLR inducida mediante la administración del agonista de TLR sin el β -glucano derivado de levadura soluble; o
 - (ii) la composición induce un nivel predeterminado de una respuesta inmune dependiente del agonista de TLR usando menos agonista de TLR que el necesario para inducir el nivel predeterminado si el agonista de TLR se administra sin el β -glucano derivado de levadura soluble; o
 - 40 (iii) los efectos secundarios dependientes de TLR se reducen por un nivel predeterminado de respuesta inmune dependiente de TLR en comparación con los efectos secundarios dependientes de TLR observados si el agonista de TLR se administra sin el β -glucano derivado de levadura soluble.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 en la que la respuesta inmune inducida por TLR comprende la proliferación de linfocitos B o en la que la respuesta inmune inducida por TLR comprende la proliferación de linfocitos T específicos a antígeno o en la que la respuesta inmune inducida por TLR comprende una expresión de marcador coestimulante.
- 45 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el antígeno comprende un antígeno de vacuna, un antígeno tumoral o un antígeno de un patógeno infeccioso, en el que opcionalmente el patógeno infeccioso comprende una bacteria, un virus, un parásito o un hongo.

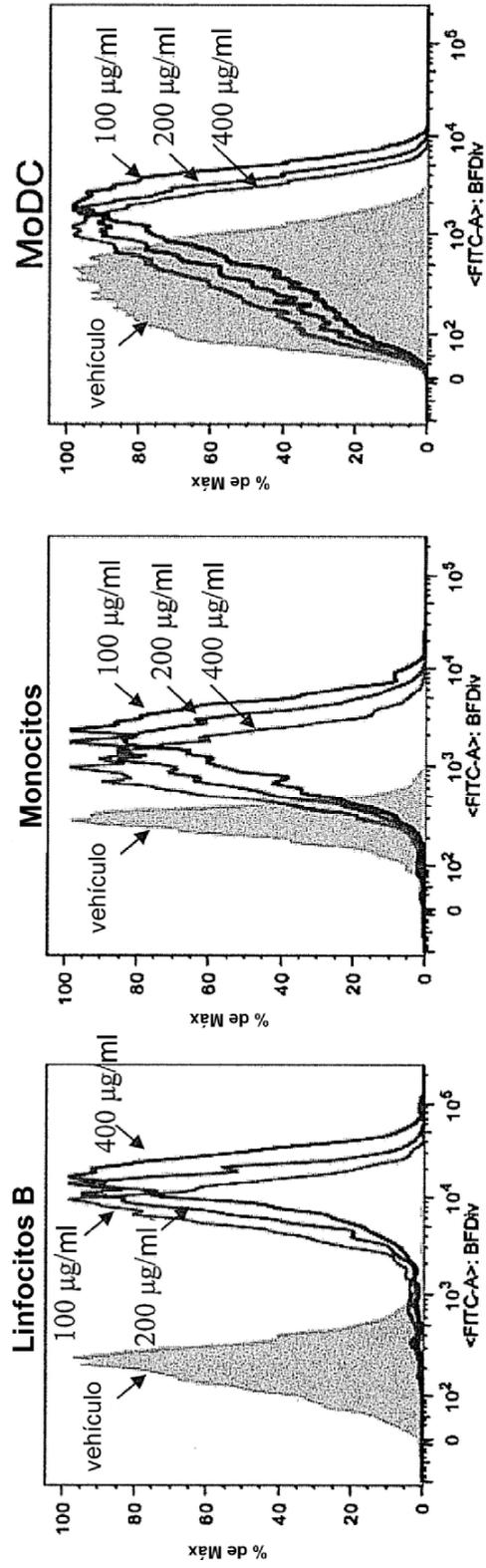
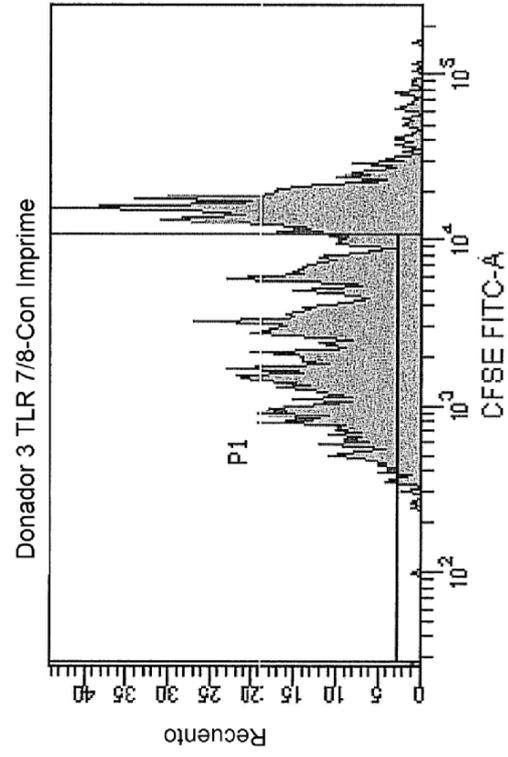
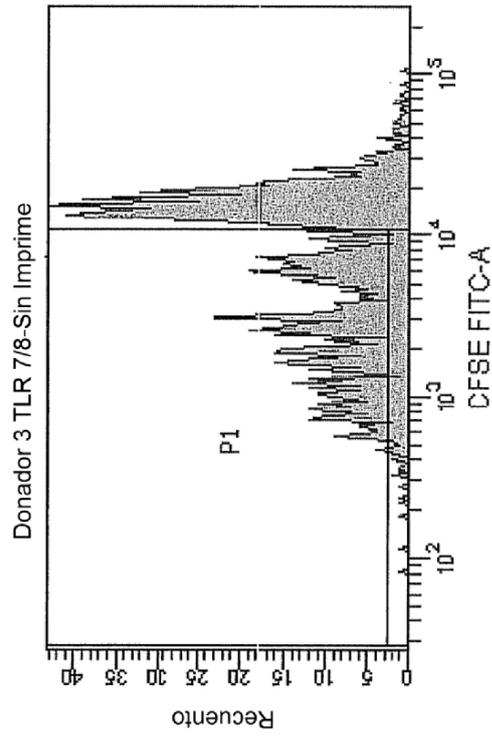


FIG. 1

FIG. 2

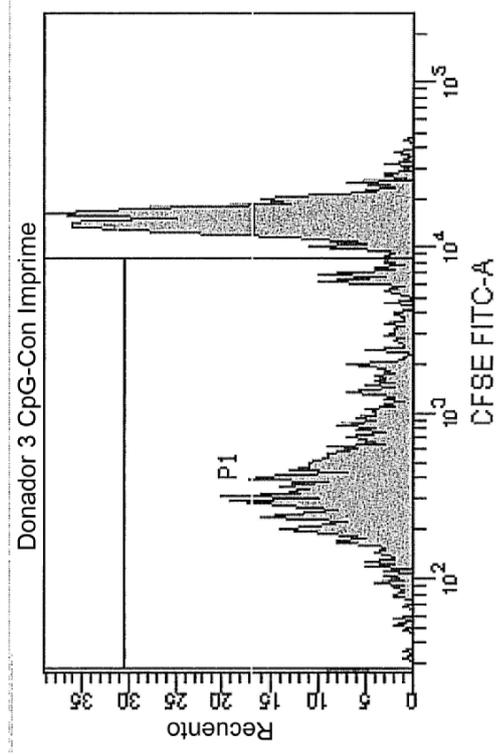


P1 = 67, 3 % de proliferación de linfocitos B

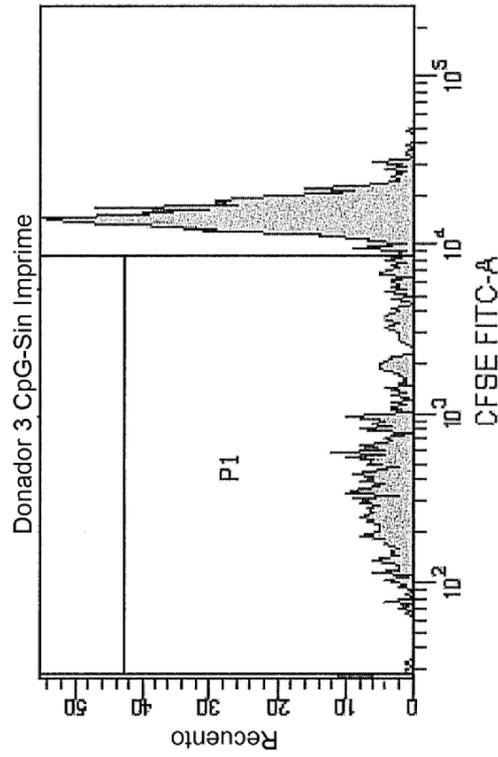


P1 = 55, 8 % de proliferación de linfocitos B

FIG. 3



P1 = 56, 4 % de proliferación de linfocitos B



P1 = 41, 4 % de proliferación de linfocitos B

FIG. 4

