

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 474**

51 Int. Cl.:

A61K 31/121 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2008** **PCT/CA2008/001879**
87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2009** **WO09052629**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008** **E 08842588 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 2214656**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

26.10.2007 US 583

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2019

73 Titular/es:

AVIVAGEN INC. (50.0%)
100 Sussex Drive
Ottawa ON K1A 0R6, CA y
NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(50.0%)

72 Inventor/es:

JOHNSTON, JAMES;
KORCZAK, BOZENA y
BURTON, GRAHAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 474 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 y métodos para mejorar la respuesta inmunitaria

Antecedentes de la invención

La invención se refiere a productos de oxidación de carotenoides poliméricos para el uso en el tratamiento de una infección.

Los organismos multicelulares han desarrollado dos sistemas generales de inmunidad hacia los agentes infecciosos. Los dos sistemas son la inmunidad innata o natural (también conocida como "inmunidad innata") y la inmunidad adaptativa (adquirida) o específica. La diferencia principal entre los dos sistemas es el mecanismo mediante el cual reconocen los agentes infecciosos.

El sistema inmunitario innato usa un grupo de receptores codificados en la línea germinal para el reconocimiento de patrones moleculares conservados presentes en los microorganismos. Estos patrones moleculares se dan en ciertos constituyentes de los microorganismos, que incluyen: lipopolisacáridos, peptidoglucanos, ácidos lipoteicoico, fosfatidil colinas, proteínas específicas de bacterias, que incluyen lipoproteínas, ADNs bacterianos, ARNs virales monocatenarios y bicatenarios, ADNs con tramos de CpG sin metilar, mananos y una diversidad de otros componentes de la pared de las células bacterianas y fúngicas. Tales patrones moleculares también se pueden dar en otras moléculas, tales como los alcaloides vegetales. Estos objetivos del reconocimiento inmunitario innato se denominan Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PMAPs), ya que los producen los microorganismos y no el organismo hospedador infectado. Los receptores del sistema inmunitario innato que reconocen PMAPs se denominan Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRPs) (véase Janeway et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54:1 (1989); Medzhitov et al., *Curr. Opin. Immunol.* 94:4 (1997)). Estos receptores tienen una estructura variable, y pertenecen a varias familias de proteínas diferentes. Algunos de estos receptores reconocen PMAPs directamente (p.ej., CD14, DEC205, colectinas), mientras otros (p.ej., receptores del complemento) reconocen los productos generados por el reconocimiento de PMAPs. Los miembros de estas familias de receptores se pueden dividir, en general, en tres tipos: (1) receptores humorales que circulan en el plasma; (2) receptores endocíticos expresados en las superficies de las células inmunitarias, y (3) receptores de señalización que se pueden expresar en la superficie de las células o de manera intracelular. (Medzhitov et al., *Curr. Opin. Immunol.* 94:4 (1997); Fearon et al., *Science* 272:50 (1996)).

Los RRP celulares se expresan en las células efectoras del sistema inmunitario innato, que incluyen las células que funcionan como células presentadoras de antígenos (APC) profesionales en la inmunidad adaptativa, tales como macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y epitelios superficiales. Este perfil de expresión permite que los RRP induzcan directamente mecanismos efectoras innatos, y también que alerten al organismo hospedador de la presencia de agentes infecciosos induciendo la expresión de un grupo de señales endógenas, tales como citocinas y quimiocinas inflamatorias, como se discute más adelante. Esta última función permite la movilización eficaz de las fuerzas efectoras para combatir a los invasores.

En contraste, el sistema inmunitario adaptativo, que se halla solamente en los vertebrados, usa dos tipos de receptores de antígenos que se generan mediante mecanismos somáticos durante el desarrollo de cada organismo individual. Los dos tipos de receptores de antígenos son el receptor de células T (TCR) y el receptor de inmunoglobulina (IgR), que se expresan en dos tipos de células especializadas, los linfocitos T y los linfocitos B, respectivamente. Las especificidades de estos receptores de antígenos se generan aleatoriamente durante la maduración de los linfocitos mediante los procesos de reordenamiento de genes somáticos, el emparejamiento aleatorio de subunidades de receptores, y mediante una adición independiente del molde de nucleótidos en las regiones codificantes durante el reordenamiento.

El sistema inmunitario innato desempeña un papel crucial en el control del inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa y en la inducción de respuestas efectoras de células adecuadas (Fearon et al., *Science* 272:50 (1996)). Actualmente está bien establecido que la activación de linfocitos T indiferenciados requiere dos señales diferentes: una es un péptido antigénico específico reconocido por el TCR, y la otra es la denominada señal coestimuladora, B7, que se expresa en APCs y es reconocida por la molécula CD28 expresada en las células T (Lenschow et al., *Annu. Rev. Immunol.* 14:233 (1996)). La activación de los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados requiere que ambas señales, el antígeno específico y la molécula B7, se expresen en la misma APC. Si una célula T CD4 indiferenciada reconoce el antígeno en ausencia de la señal B7, la célula T morirá mediante apoptosis. La expresión de las moléculas B7 en las APCs, por lo tanto, controla si los linfocitos T CD4 indiferenciados se activarán o no. Debido a que las células T CD4 controlan la activación de las células T CD8 para las funciones citotóxicas, y la activación de las células B para la producción de anticuerpos, la expresión de las moléculas B7 determina si se activará o no una respuesta inmunitaria adaptativa.

El sistema inmunitario innato desempeña un papel crucial en el control de la expresión de B7 (Fearon et al., *Science* 272:50 (1996); Medzhitov et al., *Cell* 91:295 (1997)). Como se mencionó anteriormente, el reconocimiento inmunitario innato está mediado por RRP que reconocen PMAPs. El reconocimiento de PMAPs por los RRP da como resultado la activación de rutas de señalización que controlan la expresión de una diversidad de genes

inducibles de la respuesta inmunitaria, que incluyen los genes que codifican las señales necesarias para la activación de los linfocitos, tales como B7, citocinas y quimiocinas (Medzhitov et al., *Cell* 91:295 (1997); Medzhitov et al., *Nature* 388:394 (1997)). La inducción de la expresión de B7 por RRP tras el reconocimiento de PMAPs explica la discriminación de lo propio y lo ajeno, y asegura que se activen normalmente solamente las células T específicas de antígenos derivados de microorganismos. Este mecanismo normalmente impide la activación de linfocitos autorreactivos específicos de antígenos propios.

Recientemente se han identificado los receptores del sistema inmunitario innato que controlan la expresión de las moléculas B7 y citocinas. (Medzhitov et al., *Nature* 388:394 (1997); Rock et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:588 (1998)). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores similares a Toll (TLRs), así denominados porque son homólogos a la proteína Toll de *Drosophila*, que está implicada en la formación del patrón dorsoventral en embriones de *Drosophila* y en la respuesta inmunitaria en las moscas adultas (Lemaitre et al., *Cell* 86:973 (1996)). En los organismos mamíferos, se ha demostrado que tales TLRs reconocen PMAPs tales como los productos bacterianos LPS, peptidoglucano, y lipoproteína (Schwandner et al., *J. Biol. Chem.* 274:17406 (1999); Yoshimura et al., *J. Immunol.* 163:1 (1999); Aliprantis et al., *Science* 285:736 (1999)).

Las vacunas se han usado tradicionalmente como medio para proteger contra enfermedades provocadas por agentes infecciosos, y con el avance de la tecnología de vacunas, se han usado vacunas en aplicaciones adicionales que incluyen, pero sin limitación, el control de la fertilidad en mamíferos, la modulación de la acción de hormonas, y la prevención o el tratamiento de tumores. El fin principal de las vacunas usadas para proteger contra una enfermedad es inducir la memoria inmunológica en un microorganismo particular. Más en general, las vacunas son necesarias para inducir una respuesta inmunitaria hacia antígenos específicos, tanto si pertenecen a un microorganismo como si los expresan células tumorales u otras células enfermas o anormales. La división y la diferenciación de linfocitos B y T que tienen receptores superficiales específicos del antígeno generan especificidad y memoria.

Para que una vacuna induzca una respuesta inmunitaria protectora, debe cumplir los siguientes requisitos: 1) debe incluir el/los antígeno(s) específico(s) o fragmento(s) de el/los mismo(s), que será(n) el/los objetivo(s) de la inmunidad protectora tras la vacunación; 2) debe presentar tales antígenos en una forma que la pueda reconocer el sistema inmunitario, p.ej., una forma resistente a la degradación antes del reconocimiento inmunitario; y 3) debe activar las APCs para que presenten el antígeno a las células T CD4⁺, que a su vez inducen la diferenciación de las células B y otras funciones efectoras inmunitarias.

Las vacunas convencionales contienen suspensiones de microorganismos atenuados o muertos, tales como virus o bacterias, incapaces de inducir una infección grave por sí mismos, pero capaces de contrarrestar la especie sin modificar (o virulenta) al inocularlas en un hospedador. El uso del término se ha ampliado en la actualidad para incluir básicamente cualquier preparación destinada a activar la profilaxis inmunológica (p.ej., preparaciones de microbios muertos de cepas virulentas o microbios vivos de cepas atenuadas (variantes o mutantes); derivados o productos microbianos, fúngicos, vegetales, protozoicos, o metazoicos; y vacunas sintéticas). Los ejemplos de vacunas incluyen, pero sin limitación, virus de la viruela bovina para inocular contra la viruela, toxoide tetánico para prevenir el tétanos, bacterias completamente inactivadas para prevenir la tos ferina, subunidades de polisacáridos para prevenir la neumonía estreptocócica, y proteínas recombinantes para prevenir la hepatitis B.

Aunque las vacunas atenuadas normalmente son inmunógenas, su uso ha sido limitado, ya que su eficacia requiere en general un conocimiento específico y detallado de los determinantes moleculares de la virulencia. Además, el uso de patógenos atenuados en vacunas está asociado a una diversidad de factores de riesgo que en la mayoría de casos impiden el uso seguro en los seres humanos.

El problema con las vacunas sintéticas, por otra parte, es que a menudo no son inmunógenas o protectoras. El uso de los adyuvantes disponibles para incrementar la inmunogenicidad de las vacunas sintéticas a menudo no es una opción, debido a los efectos secundarios inaceptables inducidos por los propios adyuvantes.

Un adyuvante es cualquier sustancia que incrementa la inmunogenicidad de un antígeno. Aunque a menudo se considera que algunos productos químicos, tales como el alumbre, son adyuvantes, en la práctica son parecidos a vehículos, y probablemente actúan estabilizando los antígenos y/o favoreciendo su interacción con las células presentadoras de antígenos. Los mejores adyuvantes son aquellos que imitan la capacidad de los microorganismos de activar el sistema inmunitario innato. Los antígenos puros no inducen una respuesta inmunitaria, ya que no son capaces de inducir la señal coestimuladora (p.ej., B7.1 o B7.2) necesaria para la activación de los linfocitos. Así, se ha atribuido un mecanismo clave de la actividad adyuvante a la inducción de señales coestimuladoras por parte de constituyentes microbianos, o similares a microbianos, que portan PMAPs que son constituyentes rutinarios de los adyuvantes (véase Janeway et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54: 1 (1989)). Como se discutió anteriormente, el reconocimiento de estos PMAPs por parte de los RRP induce las señales necesarias para la activación (tales como B7) y diferenciación (citocinas efectoras) de los linfocitos.

El beneficio de incorporar adyuvantes en las formulaciones de vacunas para mejorar la inmunogenicidad se debe sopesar respecto al riesgo de que estos agentes induzcan reacciones adversas locales y/o sistémicas. Las reacciones adversas locales incluyen la inflamación local en el sitio de inyección y, raramente, la inducción de granulomas o la formación de abscesos estériles. Las reacciones sistémicas hacia adyuvantes observadas en

animales de laboratorio incluyen malestar, fiebre, artritis por adyuvante, y uveítis anterior (Allison et al., *Mol. Immunol.* 28:279 (1991); Waters et al., *Infect. Immun.*, 51:816 (1986)). Tales reacciones se pueden deber a menudo al perfil de citocinas que induce el adyuvante. Así, muchos adyuvantes potentes, tales como el adyuvante Completo de Freund o el Incompleto de Freund, son tóxicos y, por lo tanto, solamente son útiles para fines de investigación en animales, no para vacunaciones en seres humanos.

El alumbre está aprobado actualmente para el uso como adyuvante clínico, aunque tiene una eficacia relativamente limitada, ya que no es un estimulante inmunitario innato, y por tanto no causa una inflamación excesiva.

El documento US 2005/205086 A1 describe un kit y una composición inmunomoduladora de retinoide, y el uso del mismo. Además se describe un disolvente espumable que incluye un retinoide para administración tópica.

El documento WO 2006/120567 A2 describe una composición farmacéutica que comprende al menos una primera sustancia terapéutica activa seleccionada de carveol, timol, eugenol, borneol, carvecrol, alfa-ionona, beta-ionona y que comprende al menos una segunda sustancia terapéutica activa que es un antibiótico.

El documento WO 03/049726 A1 describe composiciones y métodos para la prevención y el tratamiento de una infección respiratoria, en los que la composición comprende un único terpeno, una mezcla de terpenos o liposoma-terpeno(s).

El documento US 2003/157159 A1 describe la administración oral de un único terpeno, una mezcla de terpenos o liposoma-terpeno(s) para la prevención y el tratamiento de infecciones del tubo digestivo en seres humanos y animales.

El documento WO 2004/019929 A1 describe una composición basada en citrato de trietilo para el tratamiento de las infecciones bacterianas de la piel.

El documento EP 0 546 870 A1 describe composiciones nutritivas que tienen una actividad en la mejora de la inmunodepresión inducida por la medicación con fármacos antineoplásicos, que comprenden proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, y 1-5 % en peso, respecto del peso sólido de dicha composición, de compuesto retinoide.

Mordi R.C. et al. (Exploratory Study of β -carotene autooxidation; 1991; 32(33): 4203-4206) describe que los productos principales de las etapas tempranas de la autooxidación de β -caroteno son epóxidos, β -ionona, β -apo-13-carotenona, retinal y compuestos relacionados.

El documento US 5.475.006 describe el uso de derivados exhaustivamente oxidados de carotenoides, retinoides y polienos conjugados relacionados para inhibir la proliferación celular.

Por lo tanto, existe la necesidad de adyuvantes que incrementen la inmunogenicidad de los antígenos sin producir una respuesta proinflamatoria. También existe la necesidad de moduladores del sistema inmunitario capaces de sensibilizar al sistema inmunitario innato y adaptativo para producir una respuesta más rápida y eficaz hacia una infección en el hospedador, o de mejorar la eficacia de los antibióticos.

Sumario de la invención

Se describen composiciones, métodos, y kits para la administración de un carotenoide transformado oxidativamente y los componentes del mismo. Las composiciones pueden ser útiles para sensibilizar al sistema inmunitario innato y adaptativo de un sujeto, y por tanto se pueden usar para tratar una infección o como adyuvante en una inmunización.

Se describe un método para tratar a un sujeto que tiene una infección administrando al sujeto un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, en una cantidad suficiente para tratar la infección.

En un aspecto relacionado, se describe un método para tratar a un sujeto humano que tiene, o está en riesgo de tener, una infección administrando al sujeto un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, en una cantidad suficiente para tratar la infección.

En otro aspecto relacionado, se describe un método para tratar a un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una infección administrando al sujeto un carotenoide transformado oxidativamente en una cantidad suficiente para tratar la infección, o un componente del mismo, en el que el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, se administra de manera intravenosa, ocular, intramuscular, tópica, subcutánea, o intranasal.

Se describe un método para mejorar la respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene una infección administrando al sujeto una cantidad eficaz de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo.

También se describe un método para mejorar la respuesta inmunitaria en un sujeto humano que tiene, o está en riesgo de tener, una infección administrando al sujeto una cantidad eficaz de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo.

Además, se describe un método para mejorar la respuesta inmunitaria en un sujeto humano que tiene, o está en riesgo de tener, una infección administrando al sujeto una cantidad eficaz de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, en el que el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, se administra de manera intravenosa, ocular, intramuscular, tópica, subcutánea, o intranasal.

La presente invención se refiere a un material polimérico y un antígeno para el uso en el tratamiento de una infección, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y se puede obtener haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide.

La presente invención se refiere a un material polimérico para el uso en la mejora de la respuesta inmunitaria adaptativa a un antígeno en un sujeto que se inmuniza, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y es obtenible haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide.

La presente invención se refiere a un material polimérico para el uso en la mejora de la respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una infección, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y es obtenible haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide.

En ciertas realizaciones de los usos anteriores, la infección es por una bacteria, virus, hongo, o parásito. Por ejemplo, la infección puede ser neumonía adquirida en la comunidad, infección de las vías respiratorias superiores e inferiores, infección de la piel y los tejidos blandos, otitis media bacteriana aguda, neumonía bacteriana, infección complicada, pielonefritis, infección intraabdominal, septicemia bacteriana, infección del sistema nervioso central, bacteriemia, infección de heridas, peritonitis, meningitis, infecciones tras quemaduras, infección del tracto urogenital, enfermedad inflamatoria pélvica, endocarditis, o infección intravascular. El material polimérico se puede administrar de manera ocular para el tratamiento de una infección ocular. En otra realización, el material polimérico se administra de manera tópica en la boca del sujeto para el tratamiento de una infección oral.

En otras realizaciones de los usos anteriores, al sujeto no se le ha diagnosticado, pero está en riesgo de tener, una infección. De manera alternativa, los usos son para tratar a un sujeto que tiene una infección.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el uso incluye además administrar al sujeto un antibiótico, en el que el material polimérico y el antibiótico se administran de manera simultánea, o en 14 días, 10 días, 7 días, o 3 días entre sí.

Se describe un método para mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa a un antígeno en un sujeto que se inmuniza, y el método incluye (i) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, y (ii) administrar al sujeto un antígeno, en el que el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, se administra antes del antígeno.

También se describe un método para mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa a un antígeno en un sujeto humano que se inmuniza, y el método incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo.

Además, se describe un método para mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa hacia un antígeno en un sujeto que se inmuniza, y el método incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, en el que el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, se administra de manera intravenosa, ocular, intramuscular, tópica, subcutánea, o intranasal.

Se describe un kit para mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa hacia un antígeno en un sujeto que se inmuniza, que incluye: (i) una composición farmacéutica que incluye un carotenoide transformado oxidativamente o un componente del mismo; (ii) una composición farmacéutica que incluye un antígeno; y (iii) instrucciones para administrar el carotenoide transformado oxidativamente o un componente del mismo, y el antígeno para la inmunización de un sujeto.

En cualquiera de los usos anteriores dirigidos a mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa, el antígeno puede derivar, por ejemplo, de un patógeno, tal como una bacteria, virus, hongo, o parásito. En ciertas realizaciones, el antígeno es un carbohidrato, glicolípido, glicoproteína, lípido, proteína, lipoproteína, fosfolípido, o polipéptido. El patógeno puede ser, por ejemplo, un virus vivo o un virus vivo atenuado. En ciertas realizaciones, el patógeno es carbunco, gripe, poliomielitis, sarampión, rabia, o cualquier patógeno descrito en la presente memoria.

En cualquiera de los usos anteriores dirigidos a mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa, el material polimérico se puede administrar en 14 días, 10 días, 8 días, 6 días, 4 días, 3 días, 2 días, o incluso 1 día de la administración del antígeno. En ciertas realizaciones, el antígeno se administra antes del material polimérico. En otras realizaciones, el material polimérico se administra antes del antígeno. En otra realización, el material polimérico se administra de

manera simultánea con el antígeno.

Se describe una composición farmacéutica que incluye un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, y un antígeno. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un material polimérico y un antígeno, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y se puede obtener haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide. La composición farmacéutica se puede formular, por ejemplo, para administración oral, intravenosa, intramuscular, oftálmica, tópica, subcutánea, o intranasal. En ciertas realizaciones, el antígeno puede derivar, por ejemplo, de un patógeno, tal como una bacteria, virus, hongo, o parásito. En ciertas realizaciones, el antígeno es un carbohidrato, glicolípido, glicoproteína, lípido, proteína, lipoproteína, fosfolípido, o polipéptido. El patógeno puede ser, por ejemplo, un virus vivo o un virus vivo atenuado. En ciertas realizaciones, el patógeno es carbunco, gripe, poliomiелitis, sarampión, rabia, o cualquier patógeno descrito en la presente memoria.

Se describe un kit, que incluye: (i) una composición farmacéutica que incluye un carotenoide transformado oxidativamente o un componente del mismo; y (ii) instrucciones para administrar la composición para el tratamiento de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una infección. En cierta descripción, la infección es por una bacteria, virus, hongo, o parásito. Por ejemplo, la infección puede ser neumonía adquirida en la comunidad, infección de las vías respiratorias superiores e inferiores, infección de la piel y los tejidos blandos, otitis media bacteriana aguda, neumonía bacteriana, infección complicada, pielonefritis, infección intraabdominal, septicemia bacteriana, infección del sistema nervioso central, bacteriemia, infección de heridas, peritonitis, meningitis, infecciones tras quemaduras, infección del tracto urogenital, enfermedad inflamatoria pélvica, endocarditis, o infección intravascular. En otra descripción, el kit incluye además instrucciones para administrar un antibiótico al sujeto.

También se describe una pasta dentífrica que incluye un carotenoide transformado oxidativamente o un componente del mismo. La pasta dentífrica se puede formular con cualquier excipiente que se conozca que es útil en la producción de pasta dentífrica, tales como los descritos en la presente memoria.

También se describe un colutorio que incluye un carotenoide transformado oxidativamente o un componente del mismo. El colutorio se puede formular con cualquier excipiente que se conozca que es útil en la producción de colutorios, tales como los descritos en la presente memoria.

La invención también incluye una composición farmacéutica de la invención y formulada para la administración en los ojos. La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, una gota oftálmica, bálsamo oftálmico, pomada oftálmica, espray oftálmico, inyección subconjuntiva, o inyección intravítrea, lente de contacto, inserto conjuntivo, o inserto ocular. La composición farmacéutica se puede formular con cualquier excipiente que se conozca que es útil en la producción de formulaciones para administración en los ojos, tales como las descritas en la presente memoria.

En cualquiera de los métodos anteriores, las composiciones y los kits del carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, pueden incluir el componente polimérico de carotenoide transformado oxidativamente. En otra descripción, el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, incluye un componente de carotenoide transformado oxidativamente que incluye 2-metil-6-oxo-2,4-heptadienal, dihidroactinidiolida, β -ciclocitral, β -ionona, β -ionona 5,6-epóxido, 4-oxo- β -ionona, β -ionilideno acetaldehído, β -ionilideno acetaldehído 5,6-epóxido, 4-oxo- β -ionilideno acetaldehído, β -apo-13-carotenona, β -apo-13-carotenona 5,6-epóxido, 4-oxo- β -apo-13-carotenona, retinal, retinal 5,6-epóxido, o mezclas de los mismos. En otra descripción, el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, incluye 2-metil-6-oxo-2,4-heptadienal. De manera deseable, el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, es un carotenoide transformado oxidativamente. En cierta descripción, el carotenoide transformado oxidativamente es un producto de oxidación de β -caroteno, licopeno, ácido retinoico, o cantaxantina.

En cualquiera de los métodos, composiciones, y kits anteriores el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, se puede administrar de manera oral, intravenosa, intramuscular, ocular, tópica, subcutánea, intranasal, o por cualquier otra vía de administración descrita en la presente memoria.

En cualquiera de los métodos, composiciones, y kits anteriores, el sujeto puede ser un ser humano, una mascota domesticada (p.ej., un perro, gato, caballo, o pájaro), o un animal agrícola, que incluye, por ejemplo, oveja, cerdo, ganado vacuno (p.ej., ganado de leche o ganado de carne), aves de corral (p.ej., pavo o pollo), o pescado (p.ej., tilapia, siluro, trucha, o salmón).

Tal como se usa en la presente memoria, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, que sensibiliza el sistema inmunitario innato o adaptativo de un sujeto, por lo que se mejora la respuesta inmunitaria hacia una infección.

Una "cantidad suficiente" significa la cantidad de carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, necesaria para tratar o prevenir una infección o una enfermedad asociada a una infección. La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención usada para poner en práctica la invención para el tratamiento terapéutico o profiláctico de las afecciones causadas o provocadas por una infección varía dependiendo de la manera de administración, la edad, el peso corporal, y la salud general del sujeto. En última instancia, el médico o

veterinario que aplica el tratamiento decidirá la cantidad adecuada y el régimen de dosis. Tal cantidad se denomina "cantidad suficiente".

Tal como se usa en la presente memoria, "carotenoide" se refiere a pigmentos naturales del grupo de los terpenoides que se pueden hallar en plantas, algas, bacterias, y ciertos animales, tales como aves y mariscos. Los carotenoides incluyen carotenos, que son hidrocarburos (es decir, sin oxígeno), y sus derivados oxigenados (es decir, xantofilas). Los ejemplos de carotenoides incluyen licopeno; β -caroteno; zeaxantina; equinenona; isozeaxantina; astaxantina; cantaxantina; luteína; citranaxantina; éster etílico de ácido β -apo-8'-caroténico; hidroxi carotenoides, tales como aloxantina, apocarotenol, astaceno, astaxantina, capsantina, capsorrubina, carotenodiolos, carotenotrioles, carotenoles, criptoxantina, decaprenoxantina, epiluteína, fucoxantina, hidroxicarotenonas, hidroxiequinenonas, hidroxilicopeno, luteína, licoxantina, neurosporina, fitoeno, fitoflueno, rodopina, esferoideno, toruleno, violaxantina, y zeaxantina; y carotenoides carboxílicos, tales como ácido apocarotenico, ácido β -apo-8'-carotenico, azafrina, bixina, carboxilcarotenos, crocetina, ácido diapocarotenico, neurosporaxantina, norbixina, y ácido licopenico.

Tal como se usa en la presente memoria, "componente" se refiere a un componente oxidado activo de una mezcla de carotenoides transformados oxidativamente que incluye un material polimérico o un compuesto seleccionado de 2-metil-6-oxo-2,4-heptadienal, dihidroactinidiolida, β -ciclocitral, β -ionona, β -ionona 5,6-epóxido, 4-oxo- β -ionona, β -ionilideno acetaldehído, β -ionilideno acetaldehído 5,6-epóxido, 4-oxo- β -ionilideno acetaldehído, β -apo-13-carotenona, β -apo-13-carotenona 5,6-epóxido, 4-oxo- β -apo-13-carotenona, retinal, y retinal 5,6-epóxido; y mezclas de los mismos. Los componentes de un carotenoide transformado oxidativamente son activos en el sentido de que son capaces de tratar una infección o mejorar una respuesta inmunitaria en un animal. Los métodos para determinar si una fracción particular de un carotenoide transformado oxidativamente es capaz de tratar una infección y/o mejorar una respuesta inmunitaria se proporcionan en los Ejemplos. Los métodos de fraccionamiento de mezclas de carotenoides transformados oxidativamente hasta sus componentes se describen en la patente de EE.UU. n° 5.475.006 y el documento de n° de serie de EE.UU. 08/527.039.

Tal como se usa en la presente memoria, "mejorar una respuesta inmunitaria" se refiere a un incremento de la expresión de CD14 o un incremento de la actividad fagocítica en células THP-1 en un sujeto que se está tratando con un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, como se describe en la presente memoria en comparación con el mismo sujeto antes de tratarlo.

"Infección" significa la invasión en un hospedador por parte de microbios (p.ej., bacterias, hongos, o virus). Por ejemplo, la infección puede incluir el crecimiento excesivo de microbios que están presentes normalmente en o sobre el cuerpo de un mamífero, o el crecimiento de microbios que no están presentes normalmente en o sobre un mamífero. Más en general, una infección puede ser cualquier situación en la que la presencia de una población microbiana es dañina para el cuerpo del hospedador. En ciertos casos, el crecimiento microbiano puede ser pequeño, pero el daño lo provoca la producción de diversos constituyentes tóxicos por parte del microbio. En casos poco frecuentes, los microbios crecen fuera del hospedador, producen toxinas que son ingeridas y el daño es completamente resultado de la actividad de esta toxina microbiana. Así, un sujeto está "padeciendo" una infección cuando hay presente una cantidad excesiva de una población microbiana en o sobre el cuerpo del sujeto, o cuando la presencia de una población microbiana es dañina para las células u otro tejido del sujeto.

Tal como se usa en la presente memoria, "carotenoide transformado oxidativamente" se refiere a un carotenoide que se ha hecho reaccionar con hasta 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno, o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante, que da como resultado una mezcla de productos de escisión oxidativa de pesos moleculares muy bajos y una gran proporción de material polimérico (es decir, el componente del carotenoide transformado oxidativamente que tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons). La reacción resultante produce una mezcla que incluye especies moleculares que tienen pesos moleculares que oscilan de alrededor de 100 a 8.000 Daltons. Se cree que el material polimérico se forma mediante las numerosas recombinaciones químicas posibles de los diversos fragmentos oxidativos que se forman. Los métodos de producción de mezclas de carotenoides transformados oxidativamente se describen en la patente de EE.UU. n° 5.475.006 y el documento de n° de serie de EE.UU. 08/527.039. Tal como se usa en la presente memoria, el término "OxBC" se refiere de manera específica a un carotenoide transformado oxidativamente derivado de β -caroteno.

"Composición farmacéutica" significa una composición que contiene un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, y formulado con uno o más excipientes de grado farmacéutico, de una manera que cumple los requisitos de una agencia gubernamental que regula la fabricación y comercialización de productos farmacéuticos como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un mamífero (p.ej., fabricado según las regulaciones GMP y adecuado para la administración a un ser humano). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular, por ejemplo, para la administración oral en una forma farmacéutica unitaria (p.ej., un comprimido, cápsula, comprimido oblongo, cápsula de gelatina, o jarabe); para administración tópica (p.ej., en forma de una crema, gel, loción, o pomada); para administración intravenosa (p.ej., en forma de una solución estéril libre de émbolos particulados y en un sistema disolvente adecuado para el uso intravenoso); o cualquier otra formulación descrita en la presente memoria.

"Sujeto" significa cualquier animal vertebrado que incluye, sin limitación, seres humanos, perros, gatos, caballos,

ovejas, cerdos, ganado vacuno, aves de corral, y pescado.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratar" se refiere a administrar una composición farmacéutica para fines profilácticos y/o terapéuticos. "Prevenir una enfermedad" se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que todavía no está enfermo, pero que es susceptible hacia, o de otra manera está en riesgo de tener, una enfermedad particular. "Tratar una enfermedad" o el uso para un "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar un tratamiento a un sujeto que ya padece una enfermedad para mejorar o estabilizar la afección del sujeto. Así, en las reivindicaciones y realizaciones, tratar es la administración a un sujeto para fines terapéuticos o profilácticos. Tal como se usa en la presente memoria, "estar en riesgo" se refiere a ser susceptible a las infecciones. Los sujetos pueden ser susceptibles a las infecciones, por ejemplo, debido a (i) tener un sistema inmunitario debilitado (es decir, sujetos inmunodeprimidos) o (ii) la exposición a microbios (es decir, como resultado de un procedimiento quirúrgico, el contacto regular con el público, tal como el personal docente o sanitario, o por la exposición a un medio patológico/infeccioso).

La síntesis y purificación de 2-metil-6-oxo-2,4-heptadienal se ha informado en el documento de nº de serie de EE.UU. 08/527.039. Se proporciona un esquema sintético de cinco etapas más adecuado para la preparación de 2-metil-6-oxo-2,4-heptadienal en el documento de nº de serie de EE.UU. 10/196.695, publicado el 22 de mayo de 2003.

Las composiciones y usos de la invención se pueden usar para sensibilizar los sistemas inmunitarios innato y adaptativo de un sujeto hacia la infección.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada, los Dibujos, y las Reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que representa los niveles de TNF (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) en monocitos de sangre periférica (PBM) primarios incubados con LPS antes de tratarlos con OxBC. Los PBM primarios se incubaron con LPS (15 ng/ml) durante 24 h antes de tratarlos con las concentraciones indicadas de OxBC. Después de 24 h, se recogió el CM y se detectaron los niveles de TNF (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) mediante ELISA (* p<0,05, ** p< 0,02, prueba t de Student). Los monocitos humanos purificados expuestos a LPS responden al tratamiento con OxBC mediante una expresión incrementada de la citocina inflamatoria IL-1 β , lo que sugiere la capacidad de OxBC de mejorar la respuesta a la infección microbiana.

La Figura 2 es un gráfico que representa los niveles de IL-8 (A) e IL-12 (B) en PBM primarios incubados con LPS antes de tratarlos con OxBC. Los PBM primarios se incubaron con LPS (15 ng/ml) durante 24 h antes de tratarlos con las concentraciones indicadas de OxBC. Después de 24 h, se recogió el CM y se detectaron los niveles de IL-8 (A) e IL-12 (B) mediante ELISA (* p<0,05, ** p< 0,01, prueba t de Student). La expresión de la citocina reguladora IL-8 se elevó en los monocitos humanos expuestos a OxBC tras la exposición a LPS, lo que sugiere que OxBC tiene la capacidad de incrementar la actividad antimicrobiana.

La Figura 3 es un gráfico que representa la expresión de CD14 en células THP-1 tratadas con OxBC. Se incubaron monocitos THP-1 con la concentración indicada de OxBC o control de DMSO. Se llevó a cabo un análisis FACS 24 h tras el tratamiento. Los valores representan los cambios en proporción respecto de los controles de DMSO. Se usó miristato acetato de forbol (PMA) a 25 ng/ml (* p<0,001, prueba t de Student frente a los controles de DMSO). OxBC estimula la expresión de CD14, un receptor que se une al componente microbiano, y prepara la respuesta inmunitaria innata hacia la infección.

La Figura 4 es un gráfico que representa la expresión de CD40L y CD86 en células THP-1 tratadas con OxBC. Se incubaron monocitos THP-1 con la concentración indicada de OxBC o control de DMSO. Se llevó a cabo un análisis FACS 24 h tras el tratamiento. Los valores representan los cambios en proporción respecto de los controles de DMSO. Se usó PMA a 25 ng/ml (* p<0,005, ** p<0,001, prueba t de Student frente a los controles de DMSO). OxBC incrementó la expresión de los receptores superficiales implicados en la presentación de antígenos y la estimulación de la respuesta de los linfocitos, y por lo tanto incrementó la actividad de los monocitos en la respuesta a la exposición inmunitaria.

La Figura 5 es un gráfico que representa la expresión de antígenos de diferenciación en células THP-1 tras el tratamiento con OxBC y la exposición a LPS. Se incubaron monocitos THP-1 con la concentración indicada de OxBC o control de DMSO durante 24 h, y después se expusieron a 15 ng/ml de LPS cinco días más tarde. Los valores representan los cambios en proporción respecto de los controles no tratados con OxBC (* p<0,02, prueba t de Student frente al control sin tratar). El tratamiento de los monocitos con concentraciones inferiores de OxBC antes de la exposición a LPS no tuvo un efecto significativo sobre la expresión de los receptores implicados en la inmunidad innata.

La Figura 6 es un gráfico que representa la expresión de moléculas coestimuladoras en células THP-1 tras el tratamiento con OxBC y la exposición a LPS. Se incubaron monocitos THP-1 con la concentración indicada de OxBC o control de DMSO durante 24 h, y después se expusieron a 15 ng/ml de LPS cinco días más tarde. Los valores representan los cambios en proporción respecto de los controles no tratados con OxBC (* p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,001, prueba t de Student frente al control sin tratar). El tratamiento con concentraciones inferiores de OxBC tendió

a mejorar la capacidad de los monocitos de participar en la inducción de una respuesta adaptativa a los microbios.

La Figura 7 es un gráfico que representa la fagocitosis en células THP-1 tratadas con OxBC. Se incubaron monocitos THP-1 con la concentración indicada de OxBC o control de DMSO durante 24 h, y después se dejaron recuperar durante 24 h en medio solo. Se analizó la fagocitosis tras el periodo de recuperación. Los valores representan los cambios en proporción respecto de los controles. Se usó PMA a 25 ng/ml. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$, prueba t de Student frente a los controles. OxBC incrementó significativamente la actividad fagocítica en las células THP-1, lo que sugiere una actividad antimicrobiana incrementada.

La Figura 8 es un gráfico que representa la fagocitosis en células THP-1 tratadas con OxBC y estimuladas con LPS. Se incubaron monocitos THP-1 con la concentración indicada de OxBC o control de DMSO durante 24 h antes de tratarlos con LPS (15 ng/ml). Se analizó la fagocitosis 24 h tras la estimulación con LPS. Los valores representan los cambios en proporción respecto de los controles. Se usó PMA a 25 ng/ml. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$, prueba t de Student frente a los controles. Las células THP-1 tratadas con OxBC exhibieron una actividad fagocítica mayor tras la exposición a LPS que los controles sin tratar.

La Figura 9 es un gráfico que representa la fagocitosis en PBM primarios tratados con OxBC y estimulados con LPS. Se incubaron PBM primarios con la concentración indicada de OxBC o control de DMSO durante 24 h antes de tratarlos con LPS (15 ng/ml). Se analizó la fagocitosis 24 h tras la estimulación con LPS. Los valores representan los cambios en proporción respecto de los controles. Se usó PMA a 25 ng/ml. * $p < 0,05$, *** $p < 0,002$, prueba t de Student frente a los controles. Los monocitos humanos primarios respondieron al tratamiento con OxBC incrementando su actividad fagocítica en respuesta a la estimulación con LPS.

Descripción Detallada

La invención proporciona composiciones y usos para la administración de un material polimérico. Las composiciones pueden ser útiles para sensibilizar el sistema inmunitario innato y adaptativo de un sujeto hacia una infección.

Terapia

La invención incluye usos para sensibilizar el sistema inmunitario innato y adaptativo de un sujeto hacia una infección.

El uso para la terapia según la invención se puede llevar a cabo solo o junto con otra terapia (es decir, en combinación con una terapia antibiótica), y se puede proporcionar en el hogar, el consultorio médico, una clínica, las consultas externas de un hospital, o un hospital. La duración de la terapia depende del tipo de enfermedad o trastorno a tratar, la edad y estado del paciente, la etapa y el tipo de enfermedad del paciente, y la manera en la que el paciente responde al tratamiento.

Tratamiento de infecciones microbianas

Los usos y las composiciones de la invención se pueden usar para tratar, por ejemplo, infecciones de las vías respiratorias, otitis media bacteriana aguda, neumonía bacteriana, infecciones de las vías urinarias, infecciones complicadas, pielonefritis, infecciones intraabdominales, septicemia bacteriana, infecciones de la piel y de las estructuras de la piel, infecciones de tejidos blandos, infecciones del sistema nervioso central, bacteriemia, infecciones de heridas, peritonitis, meningitis, infecciones tras quemaduras, infecciones del aparato genitourinario, enfermedad inflamatoria pélvica, endocarditis, infecciones intravasculares, y cualquier otra infección descrita en la presente memoria.

Incremento de la inmunogenicidad de los antígenos

Los usos y composiciones de la invención se pueden usar para incrementar la inmunogenicidad de los antígenos (es decir, como adyuvante usado en inmunizaciones). Las enfermedades hacia las que se puede inmunizar al sujeto incluyen todas las enfermedades capaces de tratarse o prevenirse mediante inmunización, tales como las enfermedades virales, manifestaciones alérgicas, enfermedades provocadas por patógenos bacterianos o de otro tipo que entran a través de las superficies mucosas o las colonizan, SIDA, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico, y cánceres. Los ejemplos de infecciones virales que se pueden tratar o prevenir mediante el uso de la invención incluyen la infección por virus de ADN, tales como EBV y VZV, y en particular herpesvirus, por ejemplo HSV y HCMV, adenovirus, papovavirus, tales como HPV, hepadnavirus, tales como HBV, infección por virus de ARN, tales como picornavirus, especialmente polivirus y HAV, rinovirus y FMDV, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, tales como RSV, ortomixovirus, tales como virus de la gripe, y retrovirus, especialmente HIV.

Terapia de combinación

Los usos y las composiciones de la invención también pueden incluir un antibiótico. Por ejemplo, el material polimérico se puede administrar con un antibiótico seleccionado, sin limitación, de aminoglicósidos, tales como amikacina, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, dihidroestreptomocina, fortimicina(s),

fradiomicina, gentamicina, isepamicina, kanamicina, micronomicina, neomicina, undecilenato de neomicina, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, espectinomicina, estreptomicina, estreptonicozida, y tobramicina; anfenicoles, tales como azidanfenicol, cloranfenicol, palmirato de cloranfenicol, pantotenato de cloranfenicol, florfenicol, y tianfenicol; ansamicinas, tales como rifampina, rifabutina, rifapentina, y rifaximina; β -lactamas, tales como amidinocilina, amdinocilina, pivoxil, amoxicilina, ampicilina, aspoxicilina, azidocilina, azlocilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina, carbenicilina, carfecilina, carindacilina, clometocilina, cloxacilina, ciclacilina, dicloxacilina, difenecilina, epicilina, fenbenicilina, floxicilina, hetacilina, lenampicilina, metampicilina, meticilina, mezlocilina, nafcilina, oxacilina, penamecilina, penetamato hidroyoduro, penicilina G benetamina, penicilina G benzatina, penicilina G benzhidrilamina, penicilina G cálcica, penicilina G hidrabamina, penicilina G potásica, penicilina G, procaína, penicilina N, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina, feneticilina, piperacilina, pivapicilina, propicilina, quinacilina, sulbenicilina, talampicilina, temocilina y ticarcilina; carbapenems, tales como imipenem; cefalosporinas, tales como 1-carba(destia)cefalosporina, cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefazolina, cefixima, cefmenoxima, cefodizima, cefonicida, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotiam, cefpimizol, cefpirimida, cefpodoxima proxetil, cefroxadina, cefsulodina, ceftazidima, cefteteram, ceftazol, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefuzonam, cefacetil sódico, cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalosporina, cefalotina, cefapirina sódica, cefradina, pivcefalexina, cefalotina, cefaclor, cefotetan, cefprozil, loracarbef, cefetamet, y cefepima; cefamicinas tales como cefbuperazona, cefmetazol, cefminox, cefetano, y cefoxitina; monobactamas tales como aztreonam, carumonam, y tigemonam; oxacefems tales como flomoxef y moxalactama; lincosamidas tales como clindamicina y lincomicina; macrólidos tales como azitromicina, carbomicina, claritromicina, eritromicina(s) y derivados, josamicina, leucomicinas, midecamicinas, miocamicina, oleandomicina, primicina, rokitamicina, rosaramicina, roxitromicina, espiramicina y troleandomicina; polipéptidos tales como anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enilomicina, fusafungina, gramicidina(s), gramicidina S, micamicina, polimixina, polimixina-ácido β -metanosulfónico, pristamicina, ristocetina, teicoplanina, tiostreptona, tuberactinomicina, tirocidina, tirotricina, vancomicina, viomicina(s), virginiamicina y bacitracina zinc; tetraciclinas tales como espiciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, doxiciclina, guameciclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiciclina, pipaciclina, rolitetraciclina, sanciclina, senociclina y tetraciclina; y 2,4-diaminopirimidinas tales como brodimoprim, tetroxoprim y trimetoprim; nitrofuranos tales como furaltadona, furazolio, nifuradeno, nifuratel, nifurfolina, nifurpirinol, nifurpazina, nifurtoinol y nitrofurantoína; quinolonas tales como amifloxacina, cinoxacina, ciprofloxacina, difloxacina, enoxacina, fleroxacina, flumequina, lomefloxacina, miloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico, perfloxacina, ácido pipemídico, ácido piromídico, rosoxacina, temafloxacina, y tosufloxacina; sulfonamidas tales como acetil sulfametoxipirazina, acetil sulfisoxazol, azosulfamida, bencilsulfamida, cloramina- β , cloramina-T, dicloramina-T, formosulfatiazol, N2-formil-sulfisomidina, N4- β -D-glucosilsulfanilamida, mafenida, 4'-(metilsulfamoil)sulfanilánilida, p-nitrosulfatiazol, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, ftalilsulfatiazol, salazosulfadimidina, succinilsulfatiazol, sulfabenzamida, sulfacetamida, sulfaclopiridazina, sulfacrisoidina, sulfacitina, sulfadiazina, sulfadicramida, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfaetidol, sulfaguanidina, sulfaguanol, sulfaleno, ácido sulfalóxico, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametizol, sulfametomidina, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfametrol, sulfamidocrisoidina, sulfamoxol, sulfanilamida, sal de trietanolamina de ácido sulfanilamidometanosulfónico, ácido 4-sulfanilamidosalicíclico, N4-sulfanililsulfanilamida, sulfanililurea, N-sulfanilil-3,4-xilamida, sulfanitrán, sulfaperina, sulfafenazol, sulfaproxilina, sulfapirazina, sulfapiridina, sulfasomizol, sulfasimazina, sulfatiazol, sulfatiourea, sulfatolamida, sulfisomidina y sulfisoxazol; sulfonas, tales como acedapsona, acediasulfona, acetosulfona, dapsona, diatimosulfona, glucosulfona, solasulfona, succisulfona, ácido sulfanílico, p-sulfanililbencilamina, p,p'-sulfonildianilina-N,N'-digalactósido, sulfoxona y tiazolsulfona; lipopéptidos tales como daptomicina; oxazolidonas tales como linezolid; cetólidos tales como telitromicina; y antibióticos diversos, tales como clofoctol, hexedina, magaininas, metenamina, anhidrometilen-citrato de metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, sulfosalicilato de metenamina, nitroxolina, escualamina, xibornol, cicloserina, mupirocina, y tuberina. El uso de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, en combinación con una terapia antibiótica puede ser deseable para mejorar la eficacia de un antibiótico hacia las cepas resistentes de un microbio, para reducir la probabilidad de formación de cepas resistentes de un microbio mientras se las somete a tratamiento con un antibiótico, y/o para reducir la carga de antibiótico. Esto se puede conseguir mejorando la respuesta inmunitaria del hospedador hacia el microbio con un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo.

Administración y Formulación

La invención incluye composiciones y usos para sensibilizar el sistema inmunitario innato y adaptativo de un sujeto hacia una infección. Para los materiales poliméricos, los intervalos de dosis típicos son de alrededor de 5 $\mu\text{g/kg}$ a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal al día. De manera deseable, se administra una dosis de entre 5 $\mu\text{g/kg}$ y 5 mg/kg de peso corporal, o 5 $\mu\text{g/kg}$ y 0,5 mg/kg de peso corporal. Para un componente de un carotenoide transformado oxidativamente, los intervalos de dosis típicos son de alrededor de 0,05 $\mu\text{g/kg}$ a alrededor de 500 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal al día. De manera deseable, se administra una dosis de entre 0,05 $\mu\text{g/kg}$ y 50 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, o 0,05 $\mu\text{g/kg}$ y 5 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal. La dosis a administrar de un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, probablemente dependerá de variables tales como la especie, la dieta, y la edad del animal. Se pueden usar ensayos habituales, tales como los descritos en el Ejemplo 1, para optimizar la dosis y la frecuencia de dosificación del carotenoide transformado oxidativamente o un componente del mismo.

Se puede administrar un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, a seres humanos, mascotas domésticas, ganado, u otros animales con un diluyente, vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable. La administración puede ser mediante administración tópica, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, ocular, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, en aerosol, en supositorios, u oral. En ciertas formulaciones, el carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, se proporciona en una forma farmacéutica unitaria.

Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales, gotas óticas, o aerosoles.

Se hallan métodos muy conocidos en la técnica de producción de formulaciones, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20ª ed., ed. A. R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins). Las formulaciones para administración parenteral, por ejemplo, pueden contener excipientes, agua estéril, o solución salina, polialquilen glicoles tales como polietilén glicol, aceites de origen vegetal, o naftalenos hidrogenados. Se pueden usar polímeros de lactida, copolímeros de lactida/glicolida, o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, biocompatibles y biodegradables, para controlar la liberación de los compuestos. Se pueden usar formulaciones nanoparticuladas (p.ej., nanopartículas biodegradables, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas) para controlar la biodistribución de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles incluyen las partículas de copolímeros de etileno-acetato de vinilo, las bombas osmóticas, los sistemas de infusión implantables, y los liposomas. Las formulaciones para la inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser disoluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietilén-9-lauril éter, glicolato, y desoxicolato, o pueden ser disoluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o en forma de un gel. La concentración del compuesto en la formulación variará dependiendo de varios factores, que incluyen la dosis del fármaco a administrar, y la vía de administración.

La administración de los compuestos en formulaciones de liberación controlada es útil cuando el compuesto de fórmula I tiene (i) un índice terapéutico reducido (p.ej., la diferencia entre la concentración plasmática que provoca efectos secundarios dañinos o reacciones tóxicas y la concentración plasmática que provoca un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la proporción de dosis letal mediana (DL50) respecto de la dosis eficaz mediana (DE50)); (ii) una ventana de absorción reducida en el tubo gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica corta, de forma que es necesaria una administración frecuente durante un día para mantener el nivel plasmático a un nivel terapéutico.

Se pueden usar muchas estrategias para obtener una liberación controlada, en la que la velocidad de liberación sobrepasa la velocidad del metabolismo del compuesto terapéutico. Por ejemplo, se puede obtener la liberación controlada mediante la selección adecuada de los parámetros e ingredientes de la formulación, que incluyen, p.ej., composiciones adecuadas de liberación controlada y revestimientos. Los ejemplos incluyen composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias o múltiples, disoluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches, y liposomas.

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el/los ingrediente(s) activo(s) mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables atóxicos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o rellenos inertes (p.ej., sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes, y antiadhesivos (p.ej., estearato magnésico, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados, o talco).

Las formulaciones para uso oral también se pueden proporcionar en una forma farmacéutica unitaria, tal como comprimidos masticables, comprimidos, comprimidos oblongos, o cápsulas (es decir, como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blandas en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso).

Se puede formular un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, con un diluyente, vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable como se describe en el documento de nº de serie de EE.UU. 10/196.695, publicado el 22 de mayo de 2003.

Formulaciones de higiene oral

El carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, se puede formular como un colutorio o pasta dentífrica útil para la higiene oral general y, de manera específica, para destruir los microbios que provocan la placa dental, gingivitis, y halitosis. La concentración del carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, puede ser del 0,0001 al 1 %p/p, más preferiblemente del 0,001 al 0,1 %p/p.

Los colutorios se pueden preparar simplemente combinando un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, con un colutorio existente. Opcionalmente, los colutorios incluyen además agua, fluoruro, agentes aromatizantes, alcohol, peróxido de hidrógeno, timol, eucaliptol, hexetidina, salicilato de metilo, mentol, gluconato de clorhexidina, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, metilparabeno, bromuro de domifeno, enzimas, calcio, zinc, y/o edulcorantes (es decir, sorbitol, sucralosa, o sacarina sódica).

Las pastas dentífricas se pueden preparar simplemente combinando un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, con una pasta dentífrica existente. Opcionalmente, las pastas dentífricas incluyen además fluoruro (es decir, fluoruro sódico o monofluorofosfato sódico), un agente remineralizante (es decir, hidroxiapatito, fosfato cálcico amorfo, carbonato cálcico), un agente espumante (es decir, lauril sulfato sódico), carbonato sódico, enzimas, vitaminas, plantas aromáticas, calcio, fosfosilicato de calcio y sodio, peróxido de hidrógeno, un agente antibacteriano (triclosán, cloruro de zinc), un espesante (es decir, glicerina), y/o agentes aromatizantes (es decir, hierbabuena, menta, etc.).

Formulaciones oftálmicas

Las composiciones farmacéuticas oftálmicas de la invención se pueden preparar mediante la adición de un material polimérico a una formulación oftálmica existente. Opcionalmente, la composición farmacéutica oftálmica incluye tampones, tensioactivos, estabilizantes, conservantes, agentes humectantes oftálmicos, y/o agentes diluyentes oftálmicos. Los agentes humectantes usados habitualmente en las soluciones oftálmicas incluyen carboximetilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, glicerina, manitol, alcohol polivinílico o hidroxietilcelulosa, y el agente diluyente puede ser agua, agua destilada, agua estéril, o lágrimas artificiales, en los que el agente humectante está presente en una cantidad de alrededor del 0,001% a alrededor del 10%. La concentración del carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, puede ser del 0,0001 al 1 %p/p, más preferiblemente del 0,001 al 0,1 %p/p. La composición oftálmica se puede usar para el tratamiento de una infección (es decir, una bacteria, un virus, un hongo, o una ameba, o un parásito) del ojo, que da como resultado, por ejemplo, conjuntivitis, abrasión corneal, queratitis infecciosa ulcerativa, queratitis epitelial, queratitis estromal, o queratitis herpética.

Los ejemplos de soluciones oftálmicas y pomadas oftálmicas se pueden formular en tales preparaciones mediante la utilización de varios métodos usados de manera generalizada muy conocidos para los expertos habituales en la técnica. En el caso de las soluciones oftálmicas, por ejemplo, se pueden preparar mediante el uso de agua destilada, una base acuosa, o cualquier otra base aceptable; agentes de tonicidad tales como cloruro sódico y glicerol concentrado; tampones tales como fosfato sódico y acetato sódico; tensioactivos tales como monooleato de polioxietilen sorbitán, estearato de polioxilo 40, y aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado; estabilizantes tales como citrato sódico y edetato sódico; conservantes tales como cloruro de benzalconio, timerosal, clorobutanol, cloruro sódico, ácido bórico, ésteres de ácido parahidroxibenzoico (sorbato, benzoato, propionato), clorobutanol, alcohol bencílico, compuestos de mercurio, parabeno; etc., y las mezclas de los mismos, si es necesario. El cloruro de benzalconio y timerosal son los conservantes preferidos. La formulación oftálmica se puede variar para incluir ácidos y bases para ajustar el pH; agentes que confieren tonicidad, tales como sorbitol, glicerina y dextrosa; otros agentes que confieren viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico) y otras gomas; potenciadores de la absorción adecuados, tales como tensioactivos, ácidos biliares; agentes estabilizantes tales como antioxidantes, como los bisulfitos y ascorbatos; agentes quelantes de metales, tales como edetato sódico; y potenciadores de la solubilidad de fármacos, tales como polietilen glicoles. Estos ingredientes adicionales ayudan a conferir a las disoluciones comerciales una estabilidad adecuada, de forma que no es necesario producirlas bajo demanda.

La formulación oftálmica de la invención puede ser un vehículo acuoso estéril, un bálsamo, o una pomada. Los bálsamos y las pomadas incluyen en general un carotenoide transformado oxidativamente, o un componente del mismo, disuelto o suspendido en un bálsamo o base de pomada farmacéuticamente aceptable estéril, tal como una base de aceite mineral-petrolato blanco. En las composiciones de bálsamos o pomadas, también se puede incluir lanolina anhidra en la formulación. Se puede añadir timerosal o clorobutanol a la formulación como agentes antimicrobianos.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo se llevan a cabo, se producen y se evalúan los métodos y las composiciones reivindicadas en la presente memoria, y pretenden ser meramente ejemplares de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Ejemplo 1. Estudio de los perfiles de citocinas en monocitos tras la suplementación con un carotenoide transformado oxidativamente (OxBC).

Los siguientes resultados demuestran que OxBC activa las respuestas de citocinas en los fagocitos mononucleares. El carotenoide transformado oxidativamente tiene la capacidad de sensibilizar a las células para responder a una exposición, tal como a patógenos invasores, y mejorar las actividades antimicrobianas en las células expuestas.

La inflamación, un componente importante de la inmunidad inespecífica, es una secuencia compleja de sucesos que forman el proceso fisiológico primario mediante el cual el cuerpo repara el daño tisular y se defiende de los agentes infecciosos, tóxicos o alérgicos. Aunque los mecanismos precisos que controlan la inducción y la propagación de las respuestas proinflamatorias en gran medida siguen siendo confusos, las quimiocinas y los mediadores solubles liberados desde las células inmunitarias residentes representan los mediadores primarios. Numerosos estudios han demostrado que los micronutrientes, tales como β -caroteno, pueden influir significativamente en diversas funciones de los macrófagos, que incluyen su contribución a las respuestas inflamatorias manifiestas, activando la producción

de citocinas y otros mediadores proinflamatorios. Así, se estudió el efecto de OxBC sobre la producción de citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e interferón (IFN)- γ) e inmunorreguladores (IL-12, IL-8 y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1) por los monocitos y linfocitos humanos.

5 Métodos:

Preparación de compuestos:

Se preparó OxBC a partir de β -caroteno (véase la patente de EE.UU. nº 5.475.006) y se almacenó a -20 °C antes del uso. Se prepararon disoluciones de reserva (50 mM de equivalentes de caroteno) disolviendo 26,85 mg de OxBC/ml de DMSO y se almacenaron en forma de alícuotas de 500 μ l a -80 °C. Se prepararon disoluciones de trabajo 200 μ M de OxBC mediante dilución en los medios de cultivo adecuados, y se esterilizaron mediante filtración (tamaño de poro de 0,22 μ m). Los valores equivalentes de OxBC ensayados y la cantidad asociada de DMSO en las muestras de ensayo y de control se indican en la Tabla 1. Se usaron cantidades equivalentes de vehículo de DMSO como controles.

Tabla 1. Concentraciones de OxBC y valores de DMSO asociados

OxBC (μ M)	OxBC (μ g/ml)	DMSO (% v/v)
0,0	0,00	0,000
0,1	0,05	0,001
0,5	0,27	0,005
1,0	0,54	0,010
2,5	1,34	0,025
5,0	2,67	0,050
10	5,38	0,100
15	8,01	0,150
25	13,4	0,250
50	26,9	0,500

Líneas Celulares

Se obtuvieron células monocitoides THP-1 humanas (leucemia monocítica aguda) de la American Type Tissue Collection (nº TIB-202). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1,0 mM, 10% de suero bovino fetal y antibióticos. Se aislaron monocitos de sangre periférica (PBM) y linfocitos (PBL) de PBMC mediante selección positiva y negativa, respectivamente, con el uso del sistema de separación magnética MACs de Miltenyi Biotec. Los PBM se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1,0 mM, 20% de suero bovino fetal y antibióticos. Los PBL se sembraron en el mismo medio, con la excepción de que se usó un 10% de FBS. Las densidades de células específicas y las condiciones experimentales se describen a continuación.

Condiciones experimentales

Las células se analizaron en modelos de exposición simulada y de exposición a LPS. Para los estudios simulados, las células se expusieron directamente a OxBC durante longitudes de tiempo variables, y se analizó la expresión de citocinas en medio condicionado (CM) mediante ELISA. Para la exposición a LPS, las células se incubaron primero con OxBC durante el tiempo indicado, en cuyo momento se eliminó el OxBC y se sustituyó con medio fresco que carecía del compuesto. En diferentes puntos temporales tras el tratamiento, las células se expusieron a LPS (15 ng/ml) durante 24 h antes de analizar los niveles de citocinas en CM mediante ELISA. En una variación del experimento de exposición a LPS, primero se expusieron PBM primarios a LPS durante 24 h. Tras esta estimulación inicial, las células tratadas con LPS se expusieron a OxBC durante 24 h antes de recoger el CM para análisis mediante ELISA.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El análisis de los niveles de citocinas en CM se llevó a cabo mediante el uso de kits Endogen Human ELISA (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Se preparó el CM mediante centrifugación para eliminar los restos celulares y

se usó solo, diluido con medio completo o concentrado mediante el uso de concentradores centrífugos Nanosep 3K (Pall) para asegurar que los niveles de citocinas se hallaron dentro de los intervalos lineales de cada ensayo. Cuando fue adecuado, las muestras se almacenaron a -80 °C y se descongelaron mediante equilibrio gradual a temperatura ambiente antes del uso. Brevemente, se añadieron muestras de 50 µl a cada pocillo de una microplaca en la que se había adsorbido un anticuerpo específico hacia la citocina de interés, y se incubó a temperatura ambiente durante 1-3 h. Las placas se lavaron tres veces para eliminar el material unido de manera inespecífica, y se incubaron durante 1-3 h adicionales con un anticuerpo biotinilado específico de la citocina de interés. Tras el lavado, las placas se incubaron durante 30 min con un reactivo de estreptavidina-peroxidasa de rábano seguido de un ciclo de lavado adicional. Las placas lavadas se incubaron durante 30 min con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), la reacción se paró y se midió la absorbancia a 450 nm (referencia de 550 nm). Se generaron curvas de referencia para cada citocina mediante el uso del patrón recombinante suministrado.

Resultados y Discusión

Se llevó a cabo un estudio primario de prueba de concepto en células THP-1 que no se trataron (simulado) o que se trataron durante 24 h con OxBC, PMA (25 ng/ml) y vehículo (DMSO). La estimulación directa con OxBC no tuvo un efecto perceptible en los niveles de citocinas inflamatorias (véase la Tabla 2), aunque hubo incrementos moderados detectables en las citocinas reguladoras MCP-1 e IL-8. Estos estudios se ampliaron para incluir OxBC a lo largo de un intervalo de concentraciones (2,5, 7,5 y 12,5 µM) y de concentración de las muestras en un intento de incrementar la detección de citocinas menos abundantes. Se descubrió que OxBC a 12,5 µM indujo una expresión incrementada de MCP-1 (58,1±8,8%) e IL-8 (42,1±1,0%), pero no en los niveles de otras citocinas (véase la Tabla 3). Además, no se detectaron cambios en la expresión de MCP-1 e IL-8 a las concentraciones inferiores del compuesto. Tanto MCP-1 como IL-8 funcionan como citocinas en la incorporación de células inmunitarias en localizaciones de infección o lesión. Por ejemplo, IL-8 incorpora principalmente neutrófilos en una respuesta inflamatoria, y también se denomina factor de incorporación de neutrófilos (NRF), mientras MCP-1 funciona principalmente en la incorporación de otros monocitos. La expresión de cada citocina por los monocitos/macrófagos se induce en respuesta a la detección de un antígeno o la fagocitosis de un patógeno invasor.

Tabla 2. Ensayos de prueba de concepto de la liberación de citocinas

Citocina	OxBC (12,5 µM)	PMA (25 ng/ml)	DMSO	Simulado ¹
Inflamatoria				
TNF	31,5 ± 3,0	110,1 ± 1,7	32,1 ± 1,1	32,0 ± 1,6
IL-1β	9,7 ± 0,2	73,4 ± 2,8	6,7 ± 0,0	7,1 ± 0,4
IL-6	ND ²	ND	ND	ND
IFNγ	9,6 ± 0,0	10,0 ± 1,3	10,4 ± 0,5	5,6 ± 0,3
Reguladora				
IL-8	52,7 ± 2,8	637,2 ± 18,6	32,3 ± 0,7	41,1 ± 2,1
IL-12	9,1 ± 2,1	8,0 ± 6,5	7,6 ± 3,4	7,5 ± 0,4
MCP-1	164,5 ± 43,3	654,9 ± 60,2	80,8 ± 34,4	61,7 ± 3,8

1. Los valores representan pg/ml tal como se determinó mediante los patrones de referencia incluidos en cada ensayo.

2. ND, no detectado; el valor fue menor de 5,0 pg/ml

Tabla 3. Perfiles de citocinas tras el tratamiento con OxBC

Muestra	Conc.	TNF	IL-1β	IL-6	IFNγ	IL-8	IL-12	MCP-1 ¹
OxBC	2,5 µM	31,3	14,5	ND ²	21,1	42,5	20,1	79,6
	7,5 µM	31,4	13,8	ND	21,2	40,3	18,2	85,6
	12,5 µM	36,1	14,7	ND	23,9	61,4	19,6	104,0
DMSO ³	2,5 µM	37,3	15,1	ND	21,9	47,4	21,4	71,1

	7,5 µM	36,0	13,7	ND	21,3	42,3	21,0	72,8
	12,5 µM	38,7	14,0	ND	22,2	43,2	21,5	65,8
PMA	25 ng/ml	108,5	62,5	20,3	24,9	712,4	20,9	574,8

1. Los valores representan pg/ml tal como se determinó mediante los patrones de referencia incluidos en cada ensayo.

2. ND, no detectado; el valor fue menor de 5,0 pg/ml

3. Los valores de DMSO representan la cantidad de vector para la concentración correspondiente de OxBC indicada.

5 Dado que OxBC exhibió un efecto limitado sobre la expresión de citocinas inflamatorias al exponer células monocitoides sin exposición previa, a continuación se determinó la capacidad del compuesto de alterar las respuestas de los monocitos a los estímulos proinflamatorios, concretamente a lipopolisacárido (LPS). Para estudiar esta capacidad, se llevó a cabo un estudio secundario de prueba de concepto en el que las células THP-1 se pretrataron con OxBC (0,1, 0,5, 1,0 µM) durante 24 h, se cultivaron durante 5 días y después se estimularon con LPS durante otras 24 h antes de medir la expresión de TNF mediante ELISA. Se seleccionaron las concentraciones inferiores de OxBC para reproducir un modelo de disponibilidad en un hospedador, y se seleccionó TNF como citocina proinflamatoria prototípica. Como se muestra en la Tabla 4, el pretratamiento con OxBC estimuló la expresión de TNF tras la exposición a LPS en aproximadamente un 25% a todas las concentraciones analizadas. Estos estudios se ampliaron posteriormente a otras citocinas proinflamatorias mediante el uso de un modelo similar de sensibilización y exposición. Se detectó una expresión incrementada de IL-6 e IL-1 β , pero no de IFN γ , cuando las células se sensibilizaron con 0,1 o 0,5 µM de OxBC (véase la Tabla 5). De manera interesante, no se observó cambio en la expresión de citocinas a 1,0 µM del compuesto. IL-6 es uno de los mediadores más importantes de fiebre en la respuesta de fase aguda; sin embargo, la citocina también es necesaria para mantener la resistencia microbiana. Tanto TNF como IL-1 β son citocinas pleiotrópicas cruciales en las respuestas inmunitarias innatas e inflamatorias, que regulan la función de los fagocitos y los linfocitos. De forma similar, se descubrió que el pretratamiento con OxBC también estimula la expresión de la citocina reguladora IL-8 tras la exposición a LPS. De manera específica, la expresión de IL-8 se incrementó un 33 $\pm$ 4% y 49 $\pm$ 5% tras el pretratamiento con 0,1 y 0,5 µM de OxBC, respectivamente, en comparación con las células estimuladas con LPS solamente. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia en los cultivos pretratados con 1 µM del compuesto.

25 Tabla 4: Expresión de TNF tras sensibilización con OxBC y exposición a LPS (prueba de concepto)

Muestra	Concentración	TNF ¹	Cambio en Proporción ²
OxBC (µM)	0,1	60,4 $\pm$ 2,1	
	0,5	61,1 $\pm$ 1,7	
	1,0	64,6 $\pm$ 5,2	
OxBC (µM) + LPS (15 ng/ml)	0,1	1840,4 $\pm$ 2,6	1,25 $\pm$ 0,1
	0,5	1845,5 $\pm$ 7,3	1,25 $\pm$ 0,1
	1,0	1832,0 $\pm$ 0,4	1,24 $\pm$ 0,1
LPS (ng/ml)	15	1471,2 $\pm$ 171,2	1,00 $\pm$ 0,1

1. Los valores representan pg/ml tal como se determinó mediante los patrones de referencia incluidos en cada ensayo.

2. Cambio en proporción respecto de las células tratadas con LPS solamente.

30 Tabla 5: Expresión de citocinas proinflamatorias tras sensibilización con OxBC y exposición a LPS

Muestra	Conc.	IL-6		IL-1 β		IFN γ	
		pg/ml	prop. ¹	pg/ml	prop.	pg/ml	prop.
OxBC (µM)	0,1	ND		54,7 $\pm$ 16,6		18,0 $\pm$ 2,1	
	0,5	ND		57,3 $\pm$ 0,1		20,0 $\pm$ 5,3	

	1,0	ND		49,9 ± 7,0		22,0 ± 1,1	
OxBC (μM) + LPS (15 ng/ml)	0,1	49,4 ± 3,9	1,31	1424,8 ± 117,1	1,19	21,0 ± 0,1	1,00
	0,5	56,1 ± 2,8	1,48	1668,6 ± 77,9	1,40	20,5 ± 2,7	0,98
	1,0	37,8 ± 2,2	1,00	1065,2 ± 94,5	0,89	19,4 ± 3,7	0,93
LPS (ng/ml)	15	37,7 ± 1,9	1,00	1194,0 ± 45,7	1,00	20,9 ± 0,6	1,00

1. Cambio en proporción respecto de las células tratadas con LPS solamente.

Debido a que los monocitos son la célula efectora de la respuesta inmunitaria innata de mayor interés, a continuación se determinó si OxBC podría influir en la expresión de citocinas inflamatorias en PBM primarios que previamente se habían expuesto a LPS. Los PBM se trataron inicialmente durante 24 h con LPS (15 ng/ml) y después se estimularon durante otras 24 h con concentraciones variables de OxBC antes de recoger el CM para el análisis mediante ELISA. No se detectó un cambio en la expresión de IL-6 tras el tratamiento con OxBC, mientras los niveles de TNF se elevaron (aproximadamente un 25%) solamente a las concentraciones inferiores del compuesto (véase la Figura 1). Sin embargo, la expresión de IL-1β se elevó sistemáticamente a las concentraciones de OxBC mayores de 5 μM, y se detectaron incrementos máximos de aproximadamente un 50% (Figura 1). El estudio de las citocinas reguladoras, IL-8 e IL-12, reveló que aunque no se observaron cambios en la expresión de IL-12 en las células pretratadas con OxBC, la expresión de IL-8 se elevó significativamente respecto de los monocitos sin tratar a las concentraciones de OxBC que superaron 2,5 μM (Figura 2).

Ejemplo 2. Estudio de la expresión de receptores superficiales relevantes inmunológicamente sobre los monocitos tras el tratamiento con un carotenoide transformado oxidativamente (OxBC).

Los siguientes resultados demuestran que el tratamiento con OxBC está asociado a una expresión incrementada de CD14, CD51, CD16 y CD36, todos marcadores de diferenciación implicados en la activación de monocitos. Además, también se observó la expresión incrementada de las moléculas coestimuladoras de linfocitos CD86 (es decir, B7) y CD40L, lo que sugiere la capacidad de activar las ramas innata y adaptativa del sistema inmunitario. En los modelos de exposición a LPS en los que los monocitos se sensibilizaron con concentraciones inferiores de OxBC, se detectó poco cambio en los niveles de los marcadores de diferenciación. Sin embargo, el tratamiento con OxBC se asoció a una expresión incrementada de los receptores superficiales coestimuladores en respuesta a la exposición a LPS.

Los monocitos indiferenciados pierden su morfología pequeña y redondeada y exhiben un tamaño incrementado, extensión celular, y granularidad a medida que se diferencian hasta macrófagos. También se han identificado varios antígenos de diferenciación en monocitos, y se asocian a una diversidad de funciones biológicas relacionadas con la inmunidad innata y específica. El perfil de expresión de estos antígenos superficiales cambia a medida que se diferencian los monocitos, lo que proporciona un medio para cuantificar el número de macrófagos maduros en una población mixta mediante citometría de flujo. Para estos estudios, se evaluó la diferenciación y la función innata estudiando los niveles de los restos superficiales representativos que funcionan en procesos tales como la adhesión celular (integrinas CD11b/CD18 y CD51), la unión de componentes microbianos (CD14, receptor de LPS), la eliminación y fagocitosis (CD36) y las respuestas inmunitarias mediadas por células (CD16, receptor de IgG de baja afinidad necesario para la destrucción de células dependiente de anticuerpos). En general, estos receptores se expresan a niveles inferiores en los monocitos indiferenciados y se incrementan tras la estimulación. Para estudiar la influencia de OxBC sobre las funciones inmunitarias adaptativas de los monocitos, se analizó la expresión superficial de las moléculas de la clase II del MHC, HLA-DR y HLA-DP. Estas moléculas son los marcadores de la superficie celular característicos de monocitos implicados en la presentación de antígenos. De forma similar, se determinó la expresión de otras moléculas superficiales celulares con funciones en la presentación de antígenos a las células T, que incluyen los antígenos leucocitarios coestimuladores B7-2 (CD86), CD40 y CD40L.

Métodos

Preparación de Compuestos

Se prepararon disoluciones de reserva de OxBC como se describe en el Ejemplo 1.

Líneas celulares y condiciones

Se obtuvieron células monocitoides THP-1 humanas (leucemia monocítica aguda) de la American Type Tissue Collection (n° TIB-202). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1,0 mM, 10% de suero bovino fetal y antibióticos. Las células se sembraron (5×10⁵ células/pocillo, placas de cultivo de 6 pocillos) 24 h antes del tratamiento con OxBC y se recogieron para el análisis según tres protocolos: 1) Las células se trataron con OxBC (2,5, 7,5 o 12,5 μM) durante 24 h y después se estudió la expresión de receptores superficiales; 2) Las células se trataron con OxBC (0,1, 0,5 o 1,0 μM) durante 24 h, en cuyo punto se suministraron medios que carecían de OxBC durante 48 h antes del análisis, y 3) Las células se trataron con OxBC (0,1, 0,5 o 1,0 μM) durante 24 h, en cuyo punto se suministraron medios frescos que carecían de OxBC

durante 5 días. Las células tratadas se estimularon después con LPS (15 ng/ml) durante 24 h antes del análisis. Las células incubadas en un porcentaje equivalente (v/v) de DMSO solo sirvieron como controles. Para los estudios en los que no se empleó la estimulación con LPS, se usó PMA (25 ng/ml) como estimulador positivo de la diferenciación de monocitos.

5 *Análisis FACS*

Se obtuvieron anticuerpos primarios marcados con ficoeritrina (PE) hacia CD11b, CD14, CD16, CD36, CD51/CD61, HLA (isoformas generales), HLA-B₇, CD86, CD40, CD40L y CD3 humanos de AbCam. La expresión de los receptores se analizó mediante el uso de un marcaje de inmunofluorescencia directo y un análisis de citometría de flujo. Brevemente, se incubaron alícuotas de células por triplicado en tampón frío (PBS que contenía un 10% de FBS y 1% de azida sódica) con anticuerpo primario (10-20 μ l) durante 45 min a temperatura ambiente en condiciones de poca luz. Las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en 500 μ l de tampón para el análisis mediante el uso de un clasificador de células FACS Aria. Las células sin tratar y las células marcadas solo con anticuerpo sirvieron como controles.

Resultados y Discusión

Las células THP-1 se trataron con OxBC durante 24 h, y se estudió la expresión de antígenos de diferenciación mediante citometría de flujo con marcaje directo. Como se muestra en la Tabla 6 y la Figura 3, la característica más notable del tratamiento con OxBC fue la expresión incrementada del antígeno prototípico de diferenciación de monocitos, CD14, a lo largo del intervalo de concentraciones estudiadas. Este efecto dependió de la dosis y alcanzó el máximo a un incremento del doble cuando se usó una concentración de 12,5 μ M de OxBC, un resultado comparable al efecto de PMA. CD14 es una glicoproteína asociada a membrana que actúa como coreceptor con el receptor similar a Toll (TLR)-4 para detectar el LPS bacteriano. Al hacerlo, desempeña un papel crucial como mediador en la respuesta inmunitaria innata hacia las infecciones bacterianas, que incluye la secreción de citocinas y la respuesta inflamatoria. Así, su estimulación mediante OxBC indicó que el compuesto poseyó la capacidad de activar una ruta innata fundamental. Además de CD14, a la concentración de 12,5 μ M de OxBC se detectó la expresión incrementada de CD51 (37%), una integrina implicada en la adhesión de los monocitos a las células endoteliales tras la activación, y de CD16 (39%), un receptor de Fc que reconoce anticuerpos para ayudar en la destrucción de células guiada por anticuerpos. En conjunto, estos resultados proporcionaron pruebas de que OxBC pudo ejercer un estímulo de diferenciación en las células monocitoides. Se debería indicar que la tinción con CD3, un marcador de linfocitos, como control indicó que las células THP-1 no expresaron el receptor (datos no mostrados).

Tabla 6: Expresión del antígeno de diferenciación en células THP-1

Tratamiento	CD11b ¹	CD51	CD14	CD36	CD16
OxBC (μ M)					
0,0	1,00 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,05
2,5	1,01 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,05	1,62 $\pm$ 0,16	0,99 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,09
7,5	1,01 $\pm$ 0,01	1,15 $\pm$ 0,02	1,79 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,06
12,5	1,00 $\pm$ 0,01	1,37 $\pm$ 0,08	1,97 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,01	1,39 $\pm$ 0,11
PMA ²	0,97 $\pm$ 0,02	5,07 $\pm$ 0,29	1,91 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,01	4,77 $\pm$ 0,31

1. Los valores representan el cambio en proporción ($\pm$ DE) relevante respecto de los controles con vehículo. Los valores en negrita indican una significación estadística.

2. Se usó PMA a 25 ng/ml como control para el estímulo positivo.

CD11b, una integrina expresada preferentemente en las células mieloides cuya diferenciación genera señales que conducen a la activación de monocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias, y CD36, un resto superficial asociado al inicio de la fagocitosis, se expresan de manera constitutiva en las células monocitoides a niveles que se aproximan a la uniformidad. Así, también se estudió la intensidad de fluorescencia tras la tinción de estas moléculas como medida de la densidad de los receptores. Esto se realizó para detectar efectos potenciales que de otra manera se difuminarían por la abundancia de células marcadas positivamente. Como se muestra en la Tabla 7, la expresión de CD36 se incrementa aproximadamente un 27% tras el tratamiento con OxBC 12,5 μ M, mientras los niveles de CD11b se incrementaron en menor grado. En comparación, PMA incrementó las densidades de ambos receptores con un margen mucho mayor, que osciló de 2 a 4 veces.

Tabla 7: Densidades de receptores

Tratamiento	CD11b ¹	CD36
OxBC (μM)		
0,0	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02
2,5	0,96 ± 0,04	0,96 ± 0,02
7,5	1,17 ± 0,01	1,14 ± 0,01
12,5	1,11 ± 0,01	1,27 ± 0,01
PMA ²	1,97 ± 0,01	4,57 ± 0,03

1. Los valores representan el cambio en proporción (± DE) relevante respecto de los controles con vehículo. Los valores en negrita indican una significación estadística.

2. Se usó PMA a 25 ng/ml como control para el estímulo positivo.

También se determinó la expresión de los receptores superficiales implicados en la presentación de antígenos y la estimulación de la respuesta de linfocitos mediante citometría de flujo. La expresión de HLA B7-2 (también denominado CD86) y CD40L se estimuló mediante el tratamiento con OxBC 7,5 y 12,5 μM (Tabla 8, Figura 4). CD86 proporciona una señal coestimuladora necesaria para la activación de las células T por los macrófagos a través de su interacción con CD28. Esta interacción sensibiliza a las células T efectoras para responder a los antígenos presentados por los macrófagos activados. CD40L, o CD154, es un miembro de la superfamilia de TNF que se une a CD40 en las células presentadoras de antígenos, y sirve como molécula coestimuladora. CD40L se expresa más abundantemente en los linfocitos T CD4⁺; sin embargo, los hallazgos recientes han demostrado que CD40L también se expresa en otras células efectoras inmunitarias, que incluyen monocitos/macrófagos, en las que sirve para incrementar el nivel de activación de los macrófagos y mejorar las actividades fagocíticas y de producción de citocinas. Así, como CD14, estas dos moléculas actúan para incrementar la capacidad de los monocitos activados de responder a la exposición inmunitaria.

Tabla 8: Expresión de moléculas coestimuladoras en los monocitos THP-1.

Tratamiento	HLA ¹ (DQ/DR/DP)	B7-2 (CD86)	CD40L	CD40	
				cuentas	intensidad
OxBC (μM)					
0,0	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,01
2,5	1,19 ± 0,03	0,88 ± 0,08	0,99 ± 0,02	1,00 ± 0,01	1,14 ± 0,03
7,5	1,19 ± 0,01	1,20 ± 0,05	1,46 ± 0,03	1,00 ± 0,01	1,01 ± 0,01
12,5	1,02 ± 0,01	1,45 ± 0,08	1,82 ± 0,05	0,99 ± 0,01	0,93 ± 0,01
PMA ²	1,05 ± 0,01	2,04 ± 0,29	1,4 ± 0,10	0,98 ± 0,01	1,31 ± 0,1

1. Los valores representan el cambio en proporción (± DE) relevante respecto de los controles con vehículo. Los valores en negrita indican una significación estadística.

2. Se usó PMA a 25 ng/ml como control para el estímulo positivo.

A continuación se estudió la expresión de receptores tras el tratamiento con concentraciones inferiores de OxBC (≤ 1 μM) durante 24 h y exposición a LPS después de aproximadamente 5 días. Se debería indicar que en ausencia de exposición a LPS, el tratamiento de las células con estas concentraciones de OxBC no afectó a la expresión de ninguno de los receptores estudiados a las anteriores concentraciones superiores del compuesto (datos no mostrados). De forma similar, con la excepción de la expresión de CD11b a 0,1 μM, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los antígenos de diferenciación entre las células tratadas con OxBC y sin tratar tras la estimulación con LPS (Figura 5). En contraste, la expresión de moléculas coestimuladoras implicadas en la presentación de antígenos, concretamente HLA (DP/DR/DP) y CD86, se elevó significativamente en los cultivos tratados con OxBC en comparación con los controles sin tratar tras la exposición a LPS (Figura 6). De forma similar, aunque el predominio de la expresión de CD40 no se incrementó en la población celular completa mediante tratamiento con OxBC, se expresó CD40 de manera más abundante en ciertas subpoblaciones de células tratadas con OxBC en comparación con los controles sin tratar. Así, el tratamiento con concentraciones inferiores de OxBC pareció mejorar la capacidad de los monocitos de participar en la inducción de una respuesta adaptativa a los

microbios.

Ejemplo 3. Estudio de la actividad de fagocitosis exhibida por monocitos humanos tratados con un carotenoide transformado oxidativamente (OxBC).

Los siguientes resultados demuestran que el tratamiento con OxBC se asocia a una fagocitosis incrementada. Este estudio se diseñó para determinar si OxBC pudo influir en la actividad fagocítica en cultivos de monocitos humanos primarios y en células monocitoides THP-1 establecidas. Fue evidente una fagocitosis incrementada en los cultivos de monocitos indiferenciados tratados con OxBC solo. Sin embargo, el impacto de OxBC fue mayor en los cultivos pretratados con OxBC y después expuestos a LPS. Estos resultados sugieren que OxBC tiene la capacidad de sensibilizar a los monocitos para responder a la exposición a LPS con una actividad fagocítica incrementada.

La fagocitosis es un mecanismo fundamental de la defensa inmunitaria innata, que sirve como modelo clásico de interacción inmunitaria innata con microbios. Para llevar a cabo esta función, los fagocitos expresan un amplio espectro de receptores que participan en el reconocimiento y la interiorización de partículas. Algunos de estos receptores son capaces de transmitir señales intracelulares que desencadenan la fagocitosis. Sin embargo, otros, tales como los receptores depuradores (p.ej. CD36), participan en la unión a los objetivos o actúan para incrementar la eficacia de la interiorización. El contacto fagocito-microbio es un proceso engañosamente complejo, y requiere una serie de señales intracelulares que desencadenan procesos celulares tan diversos como el reordenamiento citoesquelético, alteraciones en el tráfico de las membranas, activación de mecanismos de destrucción microbiana, producción de citocinas y quimiocinas pro- y anti-inflamatorias, activación de la apoptosis, y producción de moléculas necesarias para la presentación eficaz de antígenos al sistema inmunitario adaptativo. Así, la fagocitosis es un proceso esencial para la función de los monocitos y la regulación de las defensas antimicrobianas innatas. Los estudios de los Ejemplos 1 y 2 demuestran que OxBC posee la capacidad de activar diversas respuestas innatas en cultivos de monocitos. Dado que muchas de estas respuestas se pueden desencadenar mediante la fagocitosis, a continuación se estudió la capacidad de OxBC de influir en la actividad fagocítica en los monocitos.

Métodos

Preparación de Compuestos

Se prepararon disoluciones de reserva de OxBC como se describe en el Ejemplo 1.

Líneas celulares y condiciones

Se obtuvieron células monocitoides THP-1 humanas (leucemia monocítica aguda) de la American Type Tissue Collection (n° TIB-202). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1,0 mM, 10% de suero bovino fetal y antibióticos. Se aislaron monocitos de sangre periférica (PBM) primarios de preparaciones de células mononucleares de sangre periférica mixtas mediante el uso del sistema de separación magnética MACs de Miltenyi Biotec. Los PBM se cultivaron en el mismo medio que las células THP-1, con la excepción de que se usó un 20% de suero bovino fetal. Las células se sembraron (1×10^5 células/pocillo, placas de cultivo de 96 pocillos) 24 h antes del tratamiento con OxBC, PMA (25 ng/ml) y/o LPS (15 ng/ml) como se describe más adelante. Las células incubadas en un porcentaje equivalente (v/v) de DMSO solo sirvieron como controles.

Ensayo de fagocitosis

Se estudió la fagocitosis en cultivos de monocitos mediante el uso de un kit de ensayo de fagocitosis Vybrant (Invitrogen, n° V6694) basado en la ingestión de partículas bacterianas de *E. coli* (cepa K12) marcadas con fluoresceína. Brevemente, las células tratadas se incubaron a 37 °C durante 5 h con 100 µl de suspensión de biopartículas fluorescentes en solución salina tamponada de Hank. Tras la incubación, se eliminó la suspensión y se sustituyó con 100 µl de disolución de azul tripán del 2% durante 1 minuto. Se eliminó la disolución de azul tripán, y se determinó el número de partículas ingeridas mediante el uso de un lector de fluorescencia en microplacas (excitación a 480 nm, emisión a 520 nm). Los pocillos que contuvieron solamente medio (sin células) sirvieron como controles de reacción negativos, respecto de los cuales se comparó cada réplica experimental. Se investigaron tres situaciones de tratamiento para las células THP-1 y los PBM antes de determinar la actividad fagocítica: (1) Las células se trataron simplemente con OxBC o PMA durante 24 h; (2) Las células se trataron con OxBC o PMA durante 24 h, en cuyo punto se eliminaron los compuestos y las células se cultivaron durante otras 24 h en medio completo; y (3) Las células se trataron con OxBC o PMA durante 24 h, en cuyo punto se eliminaron los compuestos y las células se cultivaron durante otras 24 h en medio completo que contenía LPS. Para las células THP-1, se investigó una situación adicional en la que las células se trataron con OxBC o PMA durante 24 h, en cuyo punto los compuestos se eliminaron y las células se dejaron recuperar durante 72 h en medio completo. Tras la recuperación, las células se trataron con LPS durante 24 h antes de medir la fagocitosis.

Resultados y Discusión

Primero se determinó el efecto de OxBC sobre la fagocitosis en monocitos en células THP-1 humanas, una línea de células monocitoides establecida, mediante el uso de concentraciones y periodos de tiempos que previamente se

demostró que no dieron como resultado una toxicidad significativa. El tratamiento de las células THP-1 sin exposición previa con OxBC durante 24 h no alteró significativamente la actividad fagocítica a ninguna de las concentraciones analizadas. En contraste, el tratamiento con PMA se asoció a un incremento de $12,94 \pm 2,05$ veces de la actividad fagocítica respecto de los cultivos de control. Sin embargo, se descubrió que el tratamiento con OxBC influyó en la actividad fagocítica cuando las células THP-1 se dejaron recuperar durante 24 h antes de analizar la fagocitosis. Se observó una actividad fagocítica significativamente incrementada en los cultivos de THP-1 tratados con 2,5, 5 o 7,5 μM (1,34, 2,67 o 4,02 $\mu\text{g/ml}$) de OxBC en comparación con los controles, aunque este efecto fue aproximadamente la mitad del observado con PMA (véase la Figura 7). Es digno de mención que OxBC a 10 μM (5,38 $\mu\text{g/ml}$) redujo el grado de fagocitosis en los cultivos tratados, posiblemente debido a efectos tóxicos.

Los Ejemplos 1 y 2 demuestran que el tratamiento con OxBC puede sensibilizar a los monocitos para mejorar la respuesta a estímulos secundarios, tales como LPS. De manera coherente con estas observaciones, las células THP-1 tratadas con OxBC exhiben una actividad fagocítica mayor tras la exposición a LPS que los controles sin tratar (Figura 8). El pretratamiento con OxBC a concentraciones que superaron 2,5 μM (1,34 $\mu\text{g/ml}$) incrementó la fagocitosis a niveles similares a los observados en los monocitos tratados con PMA.

Se observaron resultados similares al estudiar PBM primarios. Al emplear un régimen de tratamiento de 24 h con OxBC seguido de 24 h de recuperación, se detectó un incremento general de la actividad fagocítica de aproximadamente un 35% en las células tratadas con OxBC respecto de los controles. A pesar de los incrementos observados, estos resultados no alcanzaron una significación estadística debido a la variabilidad entre réplicas. Aunque incrementar el número de réplicas podría haber elevado estas respuestas a niveles más significativos disminuyendo la variabilidad, esta opción no fue viable debido al gran número de células primarias que se necesitarían. Sin embargo, como con las células THP-1, se descubrió que OxBC sensibilizaba a los PBM para que respondieran a la exposición a LPS. Como se muestra en la Figura 9, el pretratamiento con OxBC se asoció a una respuesta fagocítica incrementada hacia la estimulación con LPS, que fue comparable a la obtenida con PMA a los niveles máximos.

También se estudió la actividad fagocítica en células THP-1 que se dejaron recuperar durante 72 h tras el tratamiento con OxBC. Se observaron incrementos modestos de la fagocitosis en las células tratadas con OxBC solo, aunque estas respuestas se vieron ensombrecidas por el gran incremento de la actividad fagocítica evidente en los cultivos tratados con PMA. En comparación, de nuevo se descubrió que el pretratamiento con OxBC sensibilizó a las células THP-1 en la respuesta a un estímulo con LPS administrado 72 h más tarde. Se detectó una actividad fagocítica significativamente incrementada en los monocitos pretratados con OxBC a concentraciones que superaron 5 μM (2,67 $\mu\text{g/ml}$), lo que sugiere que los efectos del tratamiento con OxBC persistieron durante varios días después de exponer primero a los monocitos a OxBC.

OxBC exhibe la capacidad de incrementar directamente la actividad fagocítica de los monocitos primarios y establecidos. Sin embargo, el mayor impacto de OxBC sobre el sistema inmunitario parece ser su capacidad de sensibilizar a los monocitos para responder a la exposición posterior a LPS con una respuesta fagocítica más intensa.

Otras Realizaciones

Otras realizaciones están en las reivindicaciones. Lo que se reivindica es:

REIVINDICACIONES

1. Un material polimérico y un antígeno para el uso en el tratamiento de una infección, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y se puede obtener haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide.
- 5 2. Un material polimérico y un antígeno para el uso en la prevención de una infección, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y se puede obtener haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide.
3. El material polimérico y el antígeno para el uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho material polimérico se formula para administración oral, intravenosa, ocular, intramuscular, tópica, subcutánea, o intranasal.
- 10 4. El material polimérico y el antígeno para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha infección es por una bacteria, virus, hongo, o parásito; o en el que dicha infección se selecciona del grupo que consiste en neumonía adquirida en la comunidad, infección de las vías respiratorias superiores e inferiores, infección de la piel y los tejidos blandos, otitis media bacteriana aguda, neumonía bacteriana, pielonefritis, infección intraabdominal, septicemia bacteriana, infección del sistema nervioso central, bacteriemia, infección de heridas,
- 15 peritonitis, meningitis, infecciones tras quemaduras, infección del tracto urogenital, enfermedad inflamatoria pélvica, endocarditis, e infección intravascular; o en el que dicho material polimérico se formula para la administración ocular; o en el que dicho material polimérico se formula para la administración en la boca de un sujeto.
5. El material polimérico y el antígeno para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho material polimérico y antígeno se usan en combinación con un antibiótico.
- 20 6. Un material polimérico para el uso en la mejora de la respuesta inmunitaria adaptativa a un antígeno en un sujeto que se inmuniza, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y es obtenible haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide.
7. El material polimérico para el uso según la reivindicación 6, en el que el material polimérico se administra de
- 25 manera oral, intravenosa, ocular, intramuscular, tópica, subcutánea, o intranasal.
8. El material polimérico para el uso según la reivindicación 6, en el que dicho antígeno deriva de un patógeno, tal como una bacteria, virus, hongo, o parásito; o en el que dicho antígeno es un carbohidrato, glicolípido, glicoproteína, lípido, proteína, lipoproteína, fosfolípido, o polipéptido; o en el que dicho antígeno deriva de un virus vivo o vivo atenuado; o en el que dicho antígeno deriva de un patógeno seleccionado de carbunco, gripe, poliomielitis,
- 30 sarampión, y rabia; o en el que dicho material polimérico se administra en 14 días de dicho antígeno; o en el que dicho material polimérico se coadministra con dicho antígeno.
9. Un material polimérico para el uso en la mejora de la respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una infección, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y es obtenible haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de
- 35 otro agente oxidante con un carotenoide.
10. El material polimérico para el uso según la reivindicación 9, en el que el material polimérico se administra de manera oral, intravenosa, ocular, intramuscular, tópica, subcutánea, o intranasal.
11. El material polimérico y el antígeno para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o el material polimérico para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que dicho carotenoide se selecciona del
- 40 grupo que consiste en β -caroteno, licopeno, luteína, y cantaxantina.
12. El material polimérico y el antígeno para el uso según la reivindicación 11 o el material polimérico para el uso según la reivindicación 11, en el que dicho carotenoide es β -caroteno.
13. Una composición farmacéutica que comprende un material polimérico y un antígeno, en el que dicho material polimérico tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons y es obtenible haciendo reaccionar 6 a 8 equivalentes
- 45 molares de oxígeno o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante con un carotenoide.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en la que dicha composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular, oftálmica, tópica, subcutánea, o intranasal; o en la que dicho antígeno deriva de un patógeno, tal como una bacteria, virus, hongo, o parásito; o en la que dicho antígeno es un carbohidrato, glicolípido, glicoproteína, lípido, proteína, lipoproteína, fosfolípido, o polipéptido; o en la que dicho
- 50 antígeno deriva de un virus vivo o vivo atenuado; o en la que dicho antígeno deriva de un patógeno seleccionado de carbunco, gripe, poliomielitis, sarampión, y rabia.

Fig. 1

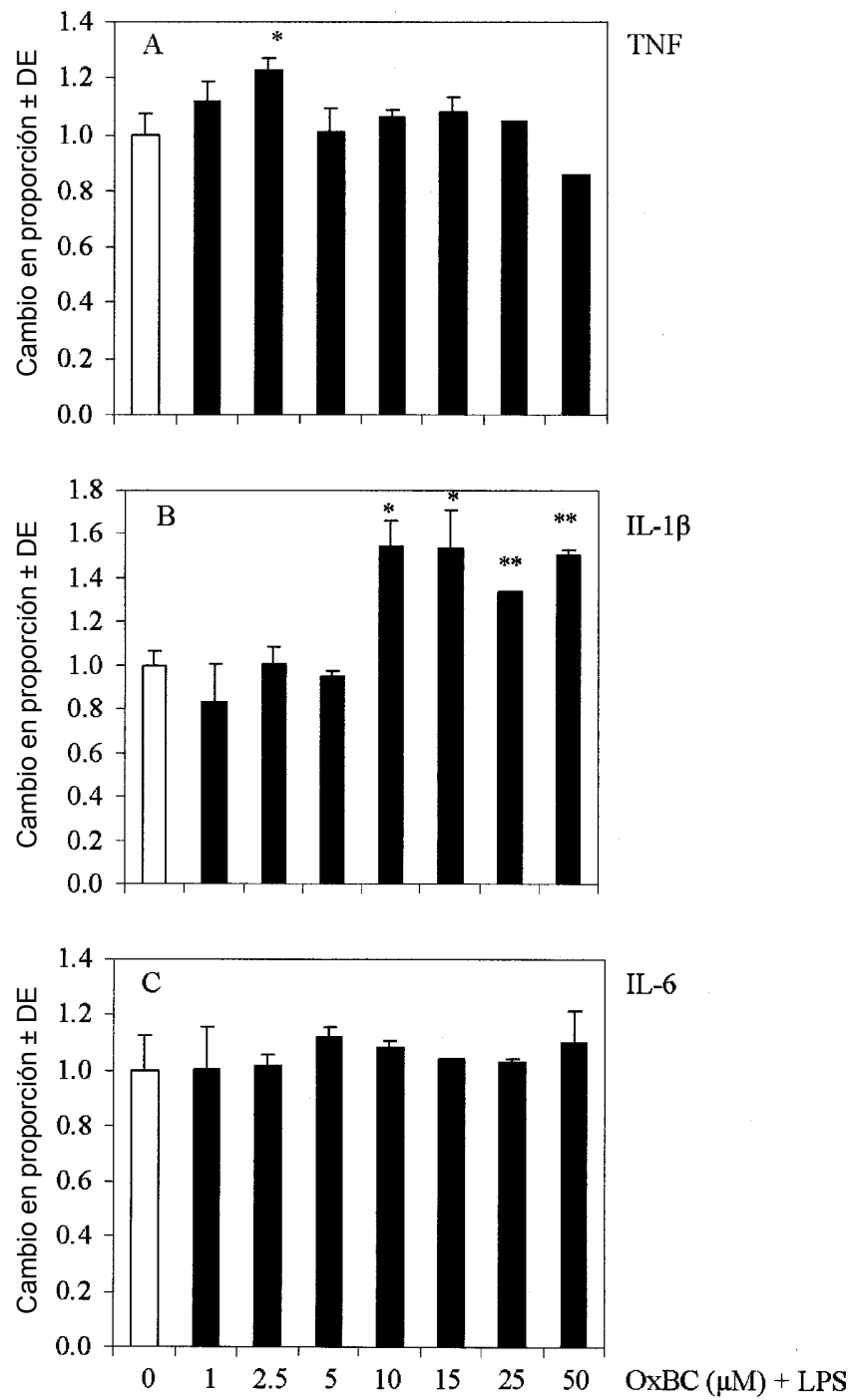


Fig. 2

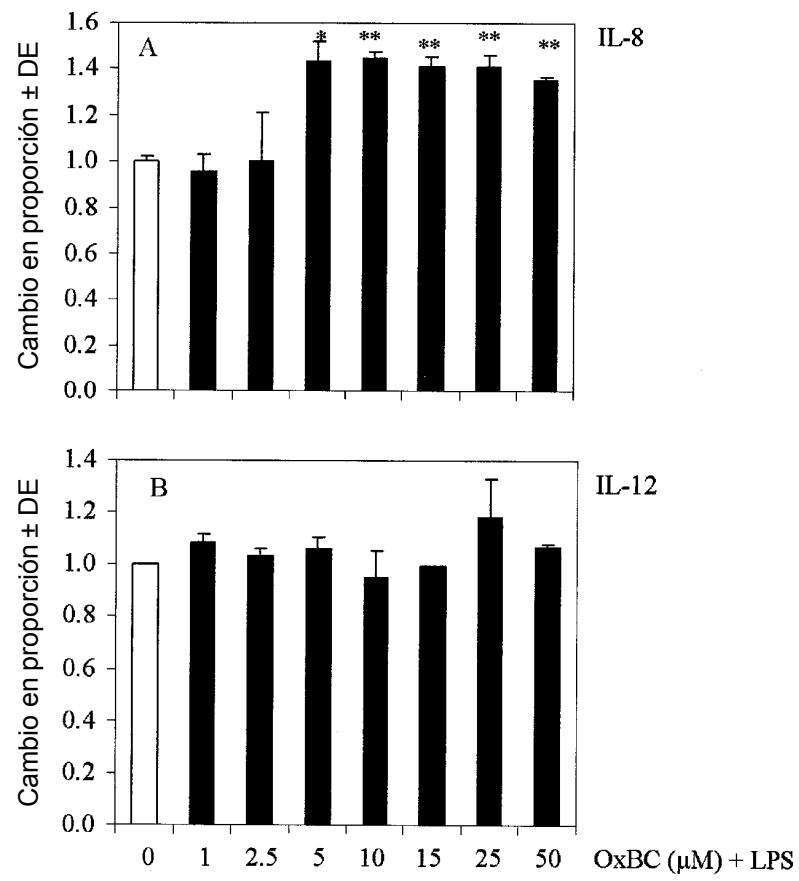


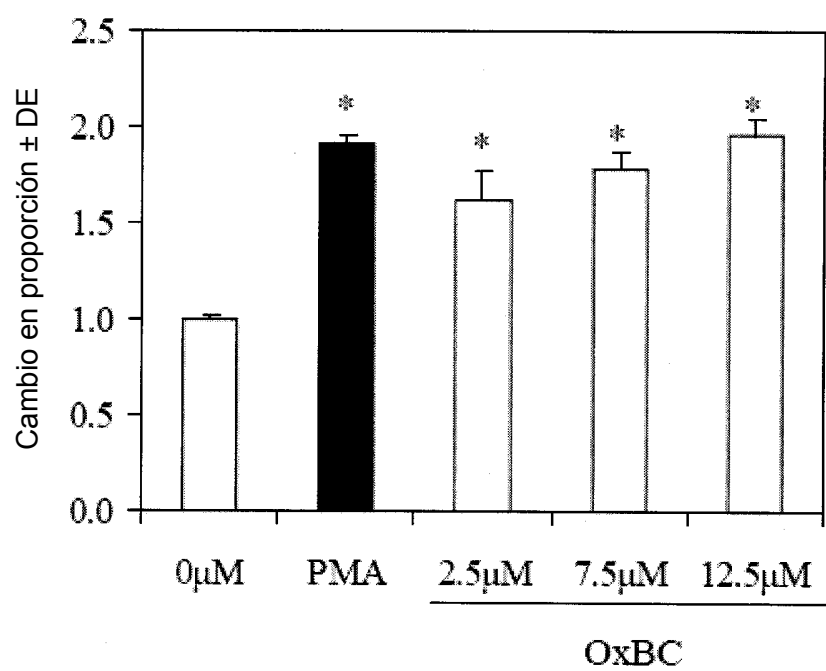
Fig. 3

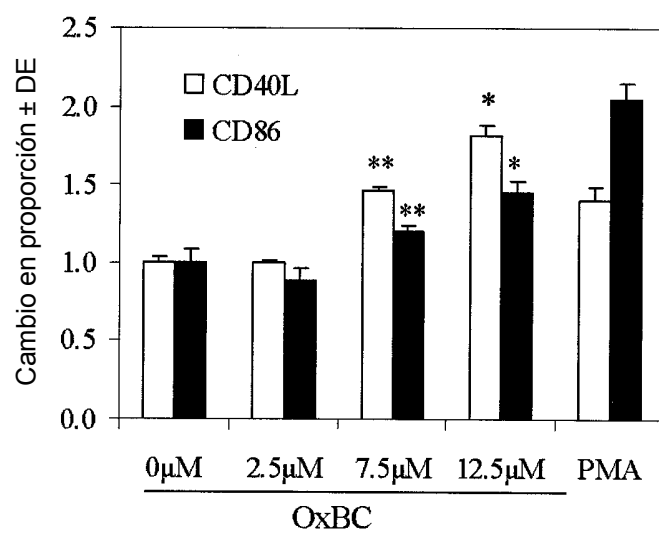
Fig. 4

Fig. 5

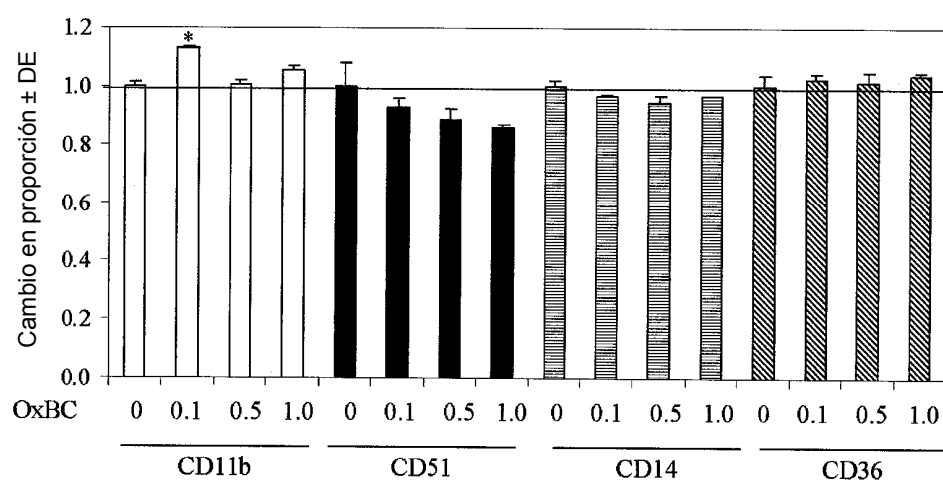


Fig. 6

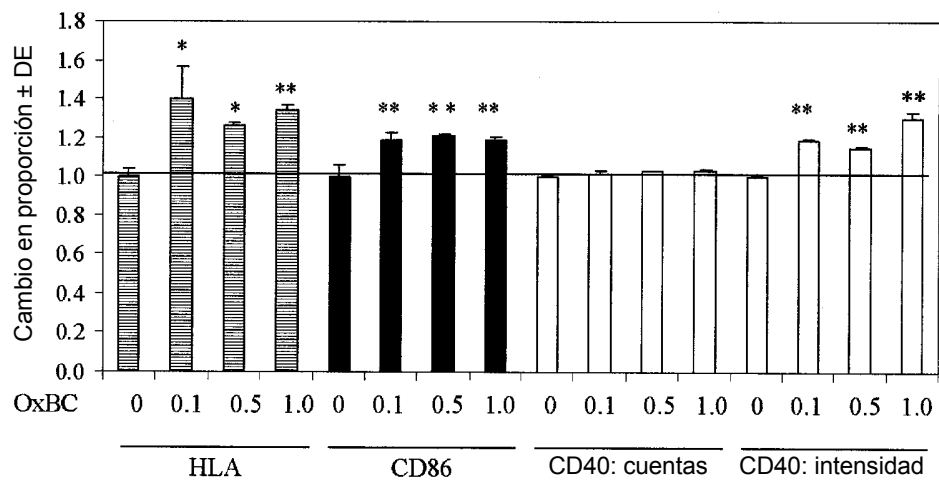


Fig. 7

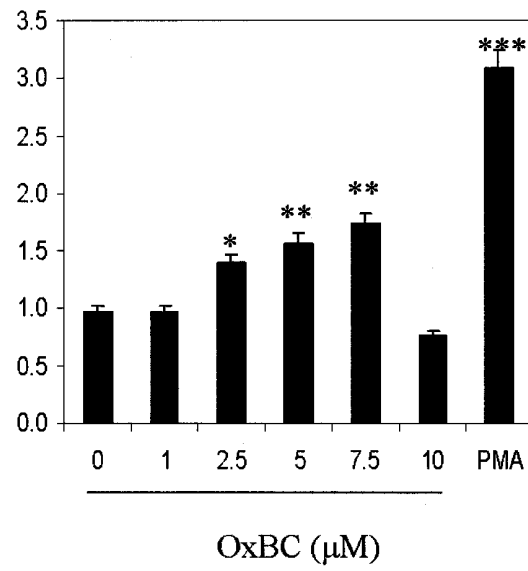


Fig. 8

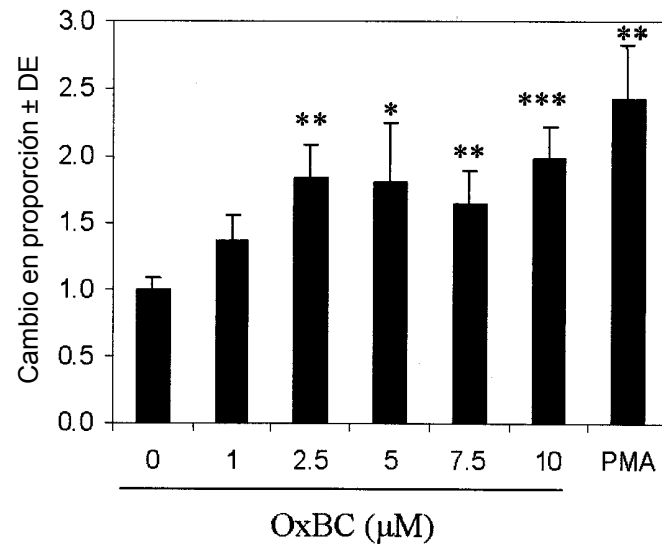


Fig. 9

