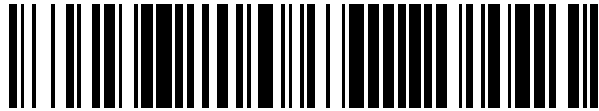


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 367**

51 Int. Cl.:

A61K 31/716	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01)
A61P 37/04	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)
A61K 31/718	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2014 PCT/JP2014/077038**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15053354**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2014 E 14852637 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021 EP 3056208**

54 Título: **Inmunopotenciador**

30 Prioridad:

09.10.2013 JP 2013212103

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2021

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku
Tokyo, 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**KOSHI YOICHIRO;
PARK JOONSIK y
LU JIAO**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 887 367 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

Inmunopotenciador

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud se basa en y reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente japonesa N 2013-212103, presentada el 9 de octubre de 2013.

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a un inmunopotenciador que comprende, como ingrediente activo, un β -glucanomodificado cuyo β -glucano y poli(hidroxiácido) están enlazados covalentemente.

15 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0003] Se sabe que los polisacáridos tienen varios efectos sobre el organismo. De estos, se sabe que los β -glucanos se unen a receptores t (por ejemplo, Dectina-1) y similares existentes en células inmunitarias en el organismo para activar la inmunorreacción (véase el Documento sin patente 1). Aunque se han investigado y desarrollado
20 inmunopotenciadores que utilizan el efecto inmunopotenciador de β -glucanos (véase el Documento de Patente 1), no se puede decir que el efecto inmunopotenciador de β -glucanos sea potente, y se ha investigado el uso concomitante con otros inmunopotenciadores para obtener efectos suficientes (véase el Documento de Patente 2).

[0004] Mientras tanto, los polisacáridos también se conocen como los materiales de biocompatibilidad, y se
25 utilizan como bases de hidrogel o materiales de liberación sostenida mediante la utilización de la biocompatibilidad de los polisacáridos. La modificación de polímeros biodegradables en polisacáridos puede transformar las propiedades físicas mientras se mantienen la biocompatibilidad (ver Documento de Patente 3 y Documento sin Patente 2).

[0005] Documento sin Patente 3, Bohn, J. y BeMiller, J., 1995. "(1 \rightarrow 3)- β -d-Glucans as biological response
30 modifier a review of structure-functional activity relationships." Carbohydrate Polymers, 28(1), pp.3-14, es una revisión de las relaciones de actividad funcional de la estructura en (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos. El Documento de Patente 4 proporciona un polisacárido, un polímero hidrofóbico y un material hidrofóbico premezclado en un solvente polar aprótico o solución acuosa alcalina. Mediante la adición de agua a la misma y la mezcla, la mezcla resultante forma una estructura autoensamblada. [beta]-1,3-glucano se utiliza preferentemente como el sacárido.

[0006] El Documento de Patente 5 describe una composición inmunogénica que comprende un complejo de
35 micropartícula adyuvante de antígeno que contiene un antígeno encapsulado en una micropartícula adyuvante compuesta por uno o más polímeros anfifílicos cuyo segmento hidrófobo es un poli(hidroxiácido), o una partícula compuesta por el complejo de la micropartícula adyuvante de antígeno asociada entre sí, y su uso como vacuna.

[0007] Huang, H., y col., 2009. "Distinct Patterns of Dendritic Cell Cytokine Release Stimulated by Fungal β -
40 Glucan and Toll-Like Receptor Agonists." Infection and Immunity, 77(5), pp. 1774-1781, describe que β -glucanos fúngicos pueden estimular la liberación de citocinas proinflamatorias en células dendríticas mieloides derivadas de médula ósea murina y células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

45 [ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA ANTERIOR]

[Documentos de Patente]

50 **[0008]**

[Documento de Patente 1]
Publicación Abierta de Solicitud de Patente Japonesa No. 1998-194977

55 [Documento de Patente 2]
Publicación Abierta de Solicitud de Patente Japonesa No. 2011-504487

[Documento de Patente 3]
Publicación Abierta de Solicitud de Patente Japonesa No. 2013-67709

60 [Documento de Patente 4]
Publicación Abierta de Solicitud de Patente Japonesa No. 2007-269791
[Documento de Patente 5]

65 Publicación Abierta de Solicitud de Patente Europea N.º 2402032

[Documentos Sin Patente]

[0009]

- 5 [Documento Sin Patente 1]
Mycological Research, 2007; 111:635-652
[Documento Sin Patente 2]
10 Polymer 2003; 44: 3927-3933 [Documento Sin Patente 3]
Carbohydrate Polymers, 1995; 28(1):3-14

RESUMEN DE LA INVENCION

Problemas a resolver por la invención

- 15 **[0010]** Un objeto de la presente invención es proporcionar un inmunopotenciador potente potenciando el efecto inmunopotenciador del β -glucano.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

- 20 **[0011]** Con el fin de superar el problema anterior, el presente inventor investigó un medio para mejorar el efecto inmunopotenciador del β -glucano, descubrió que el β -glucano modificado con poli(hidroxiácido) tiene una alta capacidad inmunopotenciadora in vivo y completó la presente invención.
- 25 **[0012]** La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

EFFECTOS DE LA INVENCION

- 30 **[0013]** La presente invención proporciona un inmunopotenciador que activa la inmunidad de manera más potente que uno convencional.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0014]

- 35 La Fig. 1 muestra los resultados de la medición de GPC de laminarano e hidrolizados de laminarano (1) a (3).
La Fig. 2 muestra los resultados de la medición de GPC de un laminarano modificado (5).
La Fig. 3 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de laminarano trimetilsililado (3).
La Fig. 4 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de un laminarano modificado (5).
40 La Fig. 5 muestra los resultados de la medición de GPC de hidrolizados de curdlano (4) a (6).
La Fig. 6 muestra los resultados de la medición de GPC de un curdlano modificado (9).
La Fig. 7 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de un curdlano trimetilsililado (5).
La Fig. 8 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de un curdlano modificado (9).
La Fig. 9 muestra los resultados de la prueba de estimulación in vitro de un β -glucano modificado.
45 La Fig. 10 muestra los resultados de la prueba de estimulación in vitro 1 de partículas con un β -glucano modificado como material base. [Fig. 11] La Fig. 11 muestra los resultados de la prueba de estimulación in vitro 2 de partículas con un β -glucano modificado como material base. [Fig. 12] La Fig. 12 muestra los resultados de la prueba in vivo 1 de un β -glucano modificado.
La Fig. 13 muestra los resultados de la prueba in vivo 2 de un β -glucano modificado.
50 La Fig. 14 muestra los resultados de la prueba in vivo 3 de un β -glucano modificado.
La Fig. 15 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de paquimano modificado (16).
La Fig. 16 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de un sizofirano modificado (17).
La Fig. 17 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de un glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18).
55 La Fig. 18 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de un escleroglucano modificado (19).
La Fig. 19 muestra los resultados de la medición de $^1\text{H-RMN}$ de un paquimarano modificado (22).
La Fig. 20 muestra los resultados de la prueba de estimulación in vitro 2 de un β -glucano modificado.
La Fig. 21 muestra los resultados de la prueba de estimulación in vitro 3 de partículas con un β -glucano modificado como material base. [Fig. 22] La Fig. 22 muestra los resultados de la prueba in vivo 4 de un β -glucano modificado.

MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

- 60 **[0015]** La presente invención se refiere a un inmunopotenciador que comprende, como ingrediente activo, un β -glucano modificado al que se unen covalentemente β -glucano y poli(hidroxiácido).

65

[0016] El glucano es un polisacárido que contiene glucosa, y el β -glucano es un glucano que contiene al menos un enlace β entre las subunidades de glucosa. En otras palabras, el β -glucano utilizado en la presente invención es un glucano que contiene un enlace β , y puede ser un glucano que contiene solo un enlace β . El β -Glucano utilizado en la presente invención puede ser ramificado o lineal.

5

[0017] El β -glucano utilizado en la presente invención incluye β -glucano que contiene al menos un enlace β -1,3 y/o al menos un enlace β -1,6, más preferentemente el β -glucano que contiene al menos un enlace β -1,3 y/o al menos un enlace β -1,6, y aún más preferentemente el β -glucano que contiene al menos un enlace β -1,3. Ejemplos de β -glucano que contienen al menos un enlace β -1,3 incluyen curdlano, paquimano, laminarano, liquenano, sizofirano, lentinano, escleroglucano, *Aureobasidium pullulans* glucano (preferentemente *Aureobasidium pullulans*-derivado β -1,3 glucano o β -1,6 glucano), o paquimarano, preferentemente curdlano, paquimano, laminarano, sizofirano, escleroglucano, *Aureobasidium pullulans* glucano, o paquimarano.

10

[0018] B-glucano lineal que contiene al menos un enlace β -1,3 incluye β -glucano que está compuesto principalmente por un enlace β -1,3 (por ejemplo, curdlano o paquimano) o β -glucano que está compuesto por un enlace β -1,3 y un enlace β -que no sea un enlace β -1,3 (por ejemplo, laminarano o liquenano).

15

[0019] El β -glucano ramificado que contiene al menos un enlace β -1,3 incluye el β -glucano que está compuesto por un enlace β -1,3 y un enlace β -1,6 (por ejemplo, sizofirano, lentinano, escleroglucano o glucano de *Aureobasidium pullulans*).

20

[0020] El β -glucano utilizado en la presente invención puede ser derivado. Ejemplos de derivatización incluyen reacción de adición de un grupo carboximetilo o reacción de escisión oxidativa. Ejemplos de β -glucano derivado incluyen carboximetil curdlano en el que se agrega un grupo carboximetilo al curdlano o paquimarano en el que se escinde el paquimano.

25

[0021] No hay ninguna limitación particular en el peso molecular medio en número de β -glucano, y es preferiblemente de 500 a 100.000, más preferentemente de 1.000 a 50.000, y aún más preferentemente de 1.900 a 25.000. El peso molecular medio numérico es el peso molecular medio calculado al no considerar la ponderación del tamaño molecular, y el peso molecular medio numérico del β -glucano se puede calcular por cromatografía de permeación en gel (GPC).

30

[0022] El poli(hidroxiácido) es preferentemente un polímero de biocompatibilidad que no tiene efectos adversos marcados en el momento de la administración in vivo en términos del componente de un inmunopotenciador. El término biocompatibilidad aquí significa que la LD50 cuando el polímero se administra por vía oral a ratas es de 2.000 mg/kg o más. Poli(hidroxiácido) puede ser un copolímero de múltiples tipos de hidroxiácidos, y es preferentemente un polímero de dos o menos tipos de hidroxiácidos.

35

[0023] El poli(hidroxiácido) incluye ácido poliglicólico, ácido poliláctico y es preferible poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico). No hay ninguna limitación particular en la relación de composición del ácido poli(láctico-co-glicólico) (ácido láctico/ácido glicólico) (mol/mol) cuando el poli(hidroxiácido) es poli(ácido láctico-co-glicólico) siempre que se logre el objeto de la presente invención, y es preferentemente 100/0 a 30/70, y más preferentemente 60/40 a 40/60.

40

[0024] No hay ninguna limitación particular en el peso molecular medio en número de poli(hidroxiácido), y es preferiblemente de 500 a 1.000.000, más preferentemente de 10.000 a 100.000, y aún más preferentemente de 14.700 a 68.300. El peso molecular medio numérico de poli(hidroxiácido) se puede calcular a partir de la diferencia entre el peso molecular medio numérico de β -glucano modificado y el peso molecular medio numérico del β -glucano.

45

[0025] No hay una limitación particular en la estructura del β -glucano modificado, y los ejemplos de este incluyen un polímero de tipo bloque lineal en el que el β -glucano está unido con poli(hidroxiácido), un polímero ramificado que tiene múltiples cadenas ramificadas de β -glucanos o poli(hidroxiácidos), un polímero de tipo injerto compuesto por una cadena principal de β -glucano y una cadena lateral de poli(hidroxiácido), o un polímero de tipo injerto compuesto por una cadena principal de poli(hidroxiácido) y una cadena lateral de β -glucano, preferentemente un polímero de tipo injerto compuesto por una cadena principal de β -glucano y una cadena lateral de poli(hidroxiácido).

50

[0026] Dado que el β -glucano modificado mantiene el efecto inmunopotenciador durante mucho tiempo, es preferentemente insoluble en agua como un todo para que no se excrete inmediatamente in vivo. El término insolubilidad en agua en este caso significa que la solubilidad en agua es de 1 g (β -glucano modificado) -100 ml (agua) o menos.

60

[0027] No hay ninguna limitación particular en el peso molecular medio en número de β -glucano modificado, y es preferiblemente de 1.000 a 1.000.000, más preferentemente de 10.000 a 100.000, y aún más preferentemente de 13.800 a 84.000. El peso molecular medio en número del β -glucano modificado se puede calcular mediante cromatografía de permeación en gel (GPC).

65

- 5 **[0028]** No hay ninguna limitación particular en la proporción de segmentos de β -glucano en el β -glucano modificado (segmentos de β -glucano/ β -glucano modificado), y es preferiblemente de 1% a 50% (p/p), más preferentemente de 5% a 45% (p/p), y aún más preferentemente de 8,3% a 42,5% (p/p). La proporción de segmentos de β -glucano en β -glucano modificado se puede calcular utilizando la proporción del peso molecular medio numérico de β -glucano con respecto al peso molecular medio numérico de β -glucano modificado.
- 10 **[0029]** Para un polímero de tipo injerto compuesto por una cadena principal de β -glucano y una cadena lateral de poli(hidroxiácido), no hay una limitación particular en el número de peso molecular promedio de cada cadena de injerto, y es preferentemente de 1.000 a 10.000, y más preferentemente de 1.300 a 6.400. El peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto se puede calcular a partir de la relación del valor integral pico de un residuo terminal con respecto al valor integral pico de los sitios distintos del residuo terminal por medición de resonancia magnética nuclear (RMN).
- 15 **[0030]** Para un polímero de tipo injerto compuesto por una cadena principal de β -glucano y una cadena lateral de poli(hidroxiácido), no hay ninguna limitación particular en la cantidad de cadenas de injerto, y es preferentemente de 3 a 15. El número de cadenas de injerto se puede calcular dividiendo el valor obtenido restando el peso molecular medio numérico de β -glucano del peso molecular medio numérico de β -glucano modificado por el peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto.
- 20 **[0031]** El β -glucano modificado puede producirse mediante procedimientos conocidos, específicamente, los ejemplos incluyen un procedimiento para producir mediante la adición de poli(hidroxiácido) al β -glucano para realizar una reacción de condensación o un procedimiento para producir mediante la adición de monómero activado por hidroxiácido al β -glucano para realizar una reacción de polimerización.
- 25 **[0032]** Particularmente, cuando el β -glucano modificado es un polímero de tipo injerto compuesto por una cadena principal de β -glucano y una cadena lateral de poli(hidroxiácido), se puede producir mediante lo siguiente (1), (2) o (3):
- 30 (1) Un procedimiento para producir un polímero tipo injerto mediante, en presencia de catalizadores de estaño, la adición de monómero activado por hidroxiácido a β -glucano para realizar una reacción de polimerización y mediante la introducción de poli(hidroxiácido) [Macromolecules 1998; 31: p.1032-1039]
- 35 (2) Un procedimiento para producir un polímero de tipo injerto mediante la activación de grupos hidroxil parcialmente desprotegidos de β -glucano en los que la mayoría de los grupos hidroxil están protegidos por sustituyentes con bases, a continuación mediante la adición de monómero activado por hidroxiácido para introducir cadenas de injerto compuestas de poli(hidroxiácido), y finalmente mediante la eliminación de los grupos protectores [Polymer 2003; 44: 3927-3933]
- 40 (3) Un procedimiento para producir un polímero tipo injerto mediante la realización de una reacción de condensación de un copolímero de poli(hidroxiácido) con β -glucano usando agentes deshidratantes y/o agentes activadores del grupo funcional [Macromolecules 2000; 33:3680-3685].
- 45 **[0033]** La forma del β -glucano modificado utilizado como un inmunopotenciador incluye fibra, película, partícula y similares, y cuando se administra un inmunopotenciador in vivo, la partícula es preferible en términos de facilidad de administración.
- 50 **[0034]** No hay ninguna limitación particular en un procedimiento para producir una partícula de β -glucano modificada, e incluye un procedimiento de evaporación de solvente, un procedimiento de secado por pulverización o un procedimiento de trituración, y una partícula de β -glucano modificada se produce preferentemente por el procedimiento de evaporación de solvente.
- 55 **[0035]** Un procedimiento para producir una partícula mediante el procedimiento de evaporación por solvente incluye un procedimiento de emulsión O/W, un procedimiento de emulsión W/O/W o un procedimiento de emulsión S/O/W (S - Sólido, O - Oil - Aceite, W - Water - Agua).
- 60 **[0036]** Como ejemplo de la producción de una partícula mediante el procedimiento de emulsión O/W, la partícula se puede producir en un procedimiento en el que un solvente orgánico inmiscible en agua en el que se disuelve un β -glucano modificado se mezcla con una solución acuosa modificadora de la superficie para preparar una solución de emulsión O/W, y un procedimiento en el que el solvente orgánico inmiscible en agua se elimina de la solución de emulsión O/W para obtener la partícula.
- 65 **[0037]** Como ejemplo de la producción de una partícula mediante el procedimiento de emulsión W/O/W, la partícula se puede producir en un procedimiento en el que un solvente acuoso se mezcla con un solvente orgánico inmiscible en agua en el que se disuelve un β -glucano modificado para preparar una solución de emulsión W/O, un procedimiento en el que la solución de emulsión W/O se mezcla con una solución acuosa modificadora de la superficie para preparar una solución de emulsión W/O/W, y un procedimiento en el que el solvente orgánico inmiscible en agua

se retira de la solución de emulsión W/O/W para obtener la partícula.

[0038] Como ejemplo de la producción de una partícula mediante el procedimiento de emulsión S/O/W, la partícula se puede producir en un procedimiento en el que un solvente acuoso se mezcla con un solvente orgánico inmiscible en agua en el que se disuelve un β -glucano modificado para preparar una solución de emulsión W/O, un procedimiento en el que el solvente se retira de la solución de emulsión W/O para obtener contenido sólido, un procedimiento en el que el contenido sólido se dispersa en el solvente orgánico inmiscible en agua para obtener una solución de suspensión S/O, un procedimiento en el que la solución de suspensión S/O se mezcla con una solución acuosa modificadora de la superficie para preparar una solución de emulsión S/O/W, y un procedimiento en el que el solvente orgánico inmiscible en agua se retira de la solución de emulsión S/O/W para obtener la partícula.

[0039] Un modificador de superficie utilizado para la preparación de una partícula es preferentemente un polímero soluble en agua o un tensioactivo. El término polímero soluble en agua aquí significa un compuesto molecular alto cuya solubilidad en agua es de 1 g (polímero hidrófilo)/100 ml (agua) o más.

[0040] Ejemplos de un polímero soluble en agua como el modificador de superficie incluyen polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polietilenimina, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poli-1,3-dioxolano, polímero 2-metacrililoietil fosforilcolina, poli-1,3,6-trioxano, poliaminoácido, péptido, proteína, sacáridos o polisacáridos, y más preferentemente alcohol polivinílico.

[0041] Ejemplos de un tensioactivo como el modificador de superficie incluyen tensioactivos no iónicos, tales como polioxietileno poli-oxipropilenglicol, éster de ácido graso de sacarosa, éster de ácido graso de polioxietileno, éster de ácido mono-graso de polioxietileno sorbitano, éster de ácido bi-graso de polioxietileno sorbitano, éster de ácido mono-graso de polioxietilenglicerina, éster de ácido bi-graso de polioxietilenglicerina, éster de ácido graso de poliglicerina, aceite de ricino de polioxietileno o aceite de ricino endurecido de polioxietileno; sulfatos de alquilo, tales como lauril sulfato de sodio, lauril sulfato de amonio, o estearil sulfato de sodio, o lecitina, y más preferentemente polioxietileno polioxipropilenglicol.

[0042] En un disolvente orgánico inmiscible en agua utilizado para la preparación de una partícula, preferentemente un β -glucano modificado es soluble y el β -glucano es ligeramente soluble o insoluble. La solubilidad en agua del disolvente orgánico inmiscible en agua es preferentemente de 30 g (disolvente orgánico inmiscible en agua)/100 ml (agua) o menos. Ejemplos del solvente orgánico inmiscible en agua incluyen acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, carbonato de dimetilo, carbonato de dietilo, cloruro de metileno o cloroformo.

[0043] Un disolvente acuoso utilizado para la preparación de una partícula es agua o una solución acuosa que contiene componentes solubles en agua. Ejemplos de los componentes solubles en agua incluyen sales inorgánicas, sacáridos, sales orgánicas, aminoácidos, péptidos, proteínas o ácido nucleico.

[0044] En la superficie de una partícula de β -glucano modificada, un modificador de superficie utilizado en el procedimiento de producción puede estar enlazado. El término enlace aquí puede ser enlace no covalente o enlace covalente. El enlace no covalente es preferentemente una interacción hidrofóbica, y puede ser una interacción electrostática, un enlace de hidrógeno o una fuerza de Van der Waals, o puede ser un enlace de combinación de estos.

[0045] El tamaño medio de partícula de la partícula es preferentemente de 0,01 a 10 mm, y más preferentemente de 0,1 a 1 mm. El tamaño medio de partícula aquí se calculó mediante la medición de la distribución de la intensidad de dispersión de la luz y el coeficiente de difusión utilizando un dispositivo dinámico de dispersión de luz (DLS: por ejemplo, Otsuka Electronics Co., Ltd., ELS-Z) y mediante el análisis por el procedimiento acumulante.

[0046] Un inmunopotenciador es un fármaco que activa la respuesta inmunitaria in vivo, y un inmunopotenciador de la presente invención se caracteriza por tener un β -glucano modificado como ingrediente activo. No hay limitación del tipo de respuesta inmunitaria activada por el inmunopotenciador, y el tipo de respuesta inmunitaria que se causará incluye la respuesta inmunitaria Th1 o la respuesta inmunitaria Th2. Se sabe que cualquiera de las respuestas inmunitarias ocurre predominantemente dependiendo de los tipos de antígeno, sitio de administración o un procedimiento de administración, y un inmunopotenciador de la presente invención puede causar respuestas inmunitarias Th1 y Th2.

[0047] Un inmunopotenciador de la presente invención se puede utilizar como un medicamento solo o en combinación con otros fármacos. Cuando se utiliza un inmunopotenciador de la presente invención en combinación con otros fármacos, pueden combinarse y formularse, o pueden formularse independientemente para administrarse por separado.

[0048] No hay ninguna limitación particular en los fármacos utilizados en combinación con un inmunopotenciador de la presente invención, y preferentemente se utiliza un antígeno. El término antígeno aquí es una sustancia que induce la inmunidad in vivo y se utiliza como una vacuna para el tratamiento y/o prevención de

enfermedades. El uso concomitante de un inmunopotenciador de la presente invención con un antígeno puede mejorar la respuesta inmunitaria inducida por el antígeno.

[0049] Ejemplos de un antígeno incluyen péptido, proteína, glicoproteína, glicolípido, lípido, carbohidrato, ácido nucleico o polisacáridos, y virus, cuerpo bacteriano, sustancia inductora de alergia, tejido o célula que los contiene. Específicamente, incluyen antígeno derivado del polen, antígeno derivado del virus de la hepatitis A, antígeno derivado del virus de la hepatitis B, antígeno derivado del virus de la hepatitis C, antígeno derivado del virus de la hepatitis D, antígeno derivado del virus de la hepatitis E, antígeno derivado del virus de la hepatitis F, antígeno derivado del virus del VIH, antígeno derivado del virus de la influenza, antígeno derivado del virus del herpes (HSV-1 o HSV-2), antígeno derivado del *Bacillus anthracis*, derivado de la *Chlamydia*, antígeno derivado del *Streptococcus pneumoniae*, antígeno derivado del virus de la encefalitis japonesa, antígeno derivado del virus del sarampión, antígeno derivado del virus de la rubéola, antígeno derivado del *Clostridium tetani*, antígeno derivado del virus de la varicela, antígeno derivado del virus del SARS, antígeno derivado del virus EB, antígeno derivado del virus del papiloma, antígeno derivado del *Helicobacter pylori*, antígeno derivado del virus de la rabia, antígeno derivado del virus del Nilo Occidental, antígeno derivado del hantavirus, antígeno derivado del *Streptococcus*, antígeno derivado del *Staphylococcus*, antígeno derivado del *Bordetella pertussis*, antígeno derivado de la tuberculosispor *Mycobacterium*, antígeno derivado del *Plasmodium*, antígeno derivado de poliovirus, varios antígenos derivados de zoonosis, varios antígenos derivados de alergias alimentarias o autoantígeno.

[0050] Otros ejemplos preferidos de un antígeno incluyen el antígeno del cáncer. El antígeno del cáncer es una sustancia derivada de proteínas que se expresan específicamente en las células cancerosas y ejerce sus efectos sobre el tratamiento y/o la prevención del cáncer mediante la respuesta inmunitaria después de administrarse in vivo desde el exterior del organismo. El uso concomitante de un inmunopotenciador de la presente invención con un antígeno del cáncer se puede utilizar como una vacuna para el tratamiento y/o la prevención del cáncer.

[0051] Cuando un inmunopotenciador de la presente invención es una partícula de β -glucano modificada, preferentemente se encapsula un antígeno en la partícula. Un procedimiento para encapsular un antígeno en la partícula de β -glucano modificada incluye un procedimiento para producir la partícula de β -glucano modificada mediante el procedimiento de emulsión W/O/W o el procedimiento de emulsión S/O/W usando una solución de antígeno como un solvente acuoso.

[0052] Cuando un antígeno se encapsula en una partícula de β -glucano modificada, la velocidad de encapsulación (antígeno/ β -glucano modificado) es preferentemente de 0,01% a 20% (p/p) y más preferentemente de 0,1% a 10% (p/p). Un procedimiento para determinar la velocidad de encapsulación incluye un procedimiento para determinar la velocidad de encapsulación mediante electroforesis en gel o cromatografía líquida después de que se extrae un antígeno de una partícula de β -glucano modificada utilizando un solvente orgánico.

[0053] divulgación De acuerdo con una realización preferible de la presente descripción se proporciona un procedimiento para la inmunopotenciación, que incluye la administración de un inmunopotenciador o un medicamento de la presente invención al organismo (sujeto). No hay limitación en un procedimiento para activar (potenciar) la inmunorreacción usando un inmunopotenciador o un medicamento de la presente invención, y el inmunopotenciador o el medicamento puede administrarse al organismo, o puede ponerse en contacto con inmunocitos extraídos ex vivo. No hay una limitación particular de un procedimiento para la administración al organismo, y ejemplos incluyen administración subcutánea, administración intracutánea, administración intramuscular, administración transnasal, administración pulmonar, administración oral, administración transcutánea, administración sublingual, administración intravaginal, inyección intraperitoneal o administración en los ganglios linfáticos, y preferentemente administración intracutánea o administración subcutánea. El organismo al que se administrará puede ser humano o animales que no sean humanos, y es preferentemente humano o bovinos, o cerdo, ganado, ave, oveja, caballo, burro, cabra, camello, perro, gato, hurón, conejo, mono, rata, ratón o conejillo de indias criado como mascota o animal de laboratorio.

[0054] Cuando se utiliza un inmunopotenciador de la presente invención como medicamento (incluida la vacuna), la formulación puede llevarse a cabo mediante la combinación de diversos aditivos farmacéuticamente útiles, y ejemplos de aditivos incluyen tampón, antioxidante, sal, polímero o azúcar.

[0055] La dosis de β -glucano modificado cuando se utiliza un inmunopotenciador de la presente invención como medicamento se selecciona adecuadamente según el procedimiento de administración o la frecuencia de administración. Por ejemplo, cuando un inmunopotenciador de la presente invención se administra por vía subcutánea a humanos, se administran entre 0,01 y 1.000 mg por administración como una cantidad de un β -glucano modificado.

[0056] La dosis de otros fármacos tales como el antígeno cuando se utiliza un inmunopotenciador de la presente invención en combinación con un antígeno es preferentemente 0,001 a 100 mg.

[0057] Según una realización preferible de la presente invención, se proporciona un inmunopotenciador que incluye, como ingrediente activo, un β -glucano modificado al que se unen covalentemente β -glucano y poli(hidroxiácido), donde el β -glucano es curdlano, paquimano, laminarano, sizofirano, escleroglucano, *Aureobasidium*

pullulans glucano o paquimarano, y el poli(hidroxiácido) es poli(ácido láctico-co-glicólico).

[0058] Según otra realización preferible de la presente invención, se proporciona una vacuna que incluye un inmunopotenciador que incluye, como ingrediente activo, un β -glucano modificado al que se unen covalentemente β -glucano y poli(hidroxiácido) y un antígeno de cáncer como ingrediente activo, donde el β -glucano es curdlano, paquimano, laminarano, sizofirano, escleroglucano, *Aureobasidium pullulans* glucano o paquimarano, y el poli(hidroxiácido) es poli(ácido láctico-co-glicólico).

EJEMPLOS

10 **[0059]** Ejemplos se muestran a continuación.

Ejemplo 1: Síntesis de laminarano en la que se modifica el ácido poli(láctico-co-glicólico) (laminaranos modificados (1) a (8))

15 (1) Reacción de hidrólisis de laminarano (síntesis de hidrolizados de laminarano (1) a (3))

[0060] Después de que se disolvieron 10 g de laminarano (número de peso molecular promedio 25.000, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en 120 ml de dimetilsulfóxido, se añadieron 15 ml de solución de ácido clorhídrico 0,5 N, seguido de agitación a 105 °C durante 0,5 horas. La solución de reacción se transfirió a una membrana de diálisis y se dializó en agua, y a continuación se liofilizó para obtener un hidrolizado de laminarano (1) (número de peso molecular promedio 12.700) como un polvo. En las mismas condiciones, un hidrolizado de laminarano (2) (número de peso molecular promedio 6.700) y un hidrolizado de laminarano (3) (número de peso molecular promedio 4.100) se sintetizaron por reacción durante 1,5 horas y 2 horas, respectivamente.

25 **[0061]** El peso molecular medio en número de hidrolizado de laminarano y laminarano se determinó mediante medición de GPC (columna, Tosoh Corporation TSK-gel G3000PW_{XL}-CP32, solvente tampón de ácido acético [10 mM, pH =5]; detector, RI; estándar de referencia, pululano) (Fig. 1: hidrolizados de laminarano e laminarano (1) a (3)).

30 (2) Reacción de trimetilsililación (TMS) de laminarano (síntesis de laminaranos trimetilsililados (1) a (4))

[0062] Después, 2,4 g de laminarano (número de peso molecular medio 25.000, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) se añadieron a 48 ml de formamida y la solución se calentó a 80 °C. A esta solución, se añadieron 48 ml de 1,1,1,3,3,3-hexametil-disilazano gota a gota durante 20 minutos, seguido de agitación a 80 °C durante 2,5 horas. La solución de reacción se transfirió a un embudo de separación y se dejó reposar hasta que se separó en dos capas. La capa superior se recogió y concentró a presión reducida, y a continuación se añadieron 144 ml de metanol y el sólido obtenido se filtró y secó para obtener 3.14 g de un laminarano trimetilsililado (1) como un sólido blanco. De la misma manera, un laminarano trimetilsililado (2) se sintetizó a partir del hidrolizado de laminarano (1), un laminarano trimetilsililado (3) se sintetizó a partir del hidrolizado de laminarano (2), y un laminarano trimetilsililado (4) se sintetizó a partir del hidrolizado de laminarano

(3).

45 **[0063]** El progreso de la reacción de trimetilsililación se confirmó mediante la medición de ¹H-RMN (Fig. 3: laminarano trimetilsililado (3)).

(3) Reacción de modificación de poli(ácido láctico-co-glicólico) a laminarano (síntesis de laminaranos modificados (1) a (8))

50 **[0064]** Después de que se secaron 0,5 g de un laminarano trimetilsililado (1) y 26 mg de terc-butoxipotasio (tBuOK) con calentamiento a presión reducida durante 2 horas, se añadieron 10 ml de tetrahidrofurano, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 1,5 horas para obtener una solución activada. Se disolvió un monómero (una mezcla de (DL)-lactida y glicólido con una relación molar de 1:1) de 35 veces mol de tBuOK utilizado para la preparación de la solución activada en tetrahidrofurano para obtener una solución monomérica. La solución monomérica se añadió gota a gota a la solución activada, seguido de agitación durante 30 minutos, y a continuación se añadieron 0,5 ml de ácido acético para detener la reacción. La solución después de completar la reacción se concentró a presión reducida, y se reprecipitó y purificó con un sistema de cloroformo (solvente bueno)-metanol (solvente pobre) y un sistema de cloroformo (solvente bueno)-ciclohexano (solvente pobre) para obtener un sólido blanco. El sólido blanco obtenido se disolvió en 5 ml de cloroformo y se añadieron 0,5 ml de ácido trifluoroacético, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de reacción se concentró a presión reducida, y se reprecipitó y purificó con un sistema de cloroformo (solvente bueno) - éter dietílico (solvente pobre) para obtener un laminarano modificado (1) como un sólido blanco.

60 **[0065]** De la misma manera, se sintetizó un laminarano modificado (2) mediante la reacción de un laminarano trimetilsililado (1) con un monómero de 50 veces mol de tBuOK, se sintetizó un laminarano modificado (3) mediante la

reacción de un laminarano trimetilsililado (2) con un monómero de 35 veces mol de tBuOK, se sintetizó un laminarano modificado (4) mediante la reacción del laminarano trimetilsililado (2) con un monómero de 50 veces mol de tBuOK, se sintetizó un laminarano modificado (5) mediante la reacción del laminarano trimetilsililado (3) con un monómero de 30 veces mol de tBuOK, se sintetizó un laminarano modificado (6) mediante la reacción del laminarano trimetilsililado (3) con un monómero de 35 veces mol de tBuOK, se sintetizó un laminarano modificado (7) mediante la reacción del trimetilsililado (3) con un monómero de 50 veces mol de tBuOK, y se sintetizó un laminarano modificado (8) mediante la reacción del laminarano trimetilsililado (4) con un monómero de 35 veces mol de tBuOK.

[0066] Los resultados de la evaluación de los laminaranos modificados (1) a (8) se muestran en la Tabla 1. El peso molecular medio en número de laminarano modificado se determinó mediante medición de GPC (columna, Tosoh Corporation TSK-gel α -500032, disolvente DMF; detector, RI; estándar de referencia, pululano) (Fig. 2: laminarano modificado (5)). La proporción (p/p) de segmentos de laminaranos contenidos en el laminarano modificado se determinó a partir del peso molecular medio numérico del laminarano utilizado para la síntesis y el peso molecular medio numérico del laminarano modificado. El peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto se determinó mediante la medición de $^1\text{H-RMN}$ (Fig. 4: laminarano modificado (5)). El número medio de cadenas de injerto se determinó dividiendo el valor obtenido restando el peso molecular medio numérico de laminarano del peso molecular medio numérico del laminarano modificado por el peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto.

[Tabla 1]

20

[0067]

Tabla 1: Resultados del análisis de laminaranos modificados (1) a (8)

	Peso molecular del laminarano modificado	Peso molecular del laminarano	Proporción de laminarano	Peso molecular de la cadena del injerto	Número de cadenas de injerto
Laminarano modificado (1)	67.000	25.000	37,3%	3.700	11,4
Laminarano modificado (2)	84.000		29,8%	4.400	13,4
Laminarano modificado (3)	68.000	12.700	18,6%	3.600	15,4
Laminarano modificado (4)	81.000		15,7%	5.600	12,2
Laminarano modificado (5)	29.000	6.700	23,1%	1.600	13,4
Laminarano modificado (6)	31.000		21,6%	1.900	12,8
Laminarano modificado (7)	40.000		16,8%	3.300	10,1
Laminarano modificado (8)	24.000	4.100	17,1%	6.400	3,1

Ejemplo 2: Síntesis de curdlano en la que se modifica el ácido poli(láctico-co-glicólico) (curdlanos modificados (9) a (14))

(1) Reacción de hidrólisis de curdlano (síntesis de hidrolizados de curdlano (4) a (6))

[0068] Después, 12,8 g de curdlano (número de peso molecular medio, aproximadamente 90.000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se disolvieron en 384 ml de dimetilsulfóxido y se añadieron 19,2 ml de solución de ácido clorhídrico 1 N, seguido de agitación a 110 °C durante 0,75 horas. La solución de reacción se transfirió a una membrana de diálisis y se dializó en agua, y a continuación se liofilizó para obtener hidrolizado de curdlano (4) (número de peso molecular promedio 2,800) como un polvo. En las mismas condiciones, se sintetizaron un hidrolizado de curdlano (5) (peso molecular promedio en número 2.300) y un hidrolizado de curdlano (6) (peso molecular promedio en número 1.900) por reacción durante 0,8 horas y 0,85 horas, respectivamente.

[0069] El peso molecular medio numérico de curdlano se determinó mediante medición de GPC (columna, Tosoh Corporation TSK-gel G3000PW_{XL}-CP32, solvente tampón de ácido acético [10 mM, pH = 5]; detector, RI; estándar de referencia, pululano) (Fig. 5: hidrolizados de curdlano (4) a (6)).

(2) Reacción de trimetilsililación (TMS) de curdlano (síntesis de curdlanos trimetilsililados (5) a (7))

[0070] Después de añadir 1 g de un hidrolizado de curdlano (4) a 20 ml de formamida, la solución se calentó hasta 80 °C. A esta solución, se añadieron por goteo 20 ml de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano durante 20 minutos, seguido de agitación a 80 °C durante 2,5 horas. La solución de reacción se transfirió a un embudo de separación y se dejó reposar hasta que se separó en dos capas. La capa superior se recogió y se concentró a presión reducida y se añadieron 60 ml de metanol, y a continuación el sólido obtenido se filtró y se secó para obtener 1 g de un curdlano trimetilsililado (5) como un sólido blanco. De la misma manera, se sintetizó un curdlano trimetilsililado (6) a partir del hidrolizado de curdlano (5), y se sintetizó un curdlano trimetilsililado (7) a partir del hidrolizado de curdlano (6).

[0071] El progreso de la reacción de trimetilsililación se confirmó mediante la medición de ¹H-RMN (Fig. 7: curdlano trimetilsililado (5)).

15 (3) Reacción de modificación de curdlano a poli(ácido láctico-co-glicólico) (síntesis de curdlanos modificados (9) a (14))

[0072] Después de que se secaron 0,2 g de un curdlano trimetilsililado (5) y 14 mg de terc-butoxipotasio (tBuOK) con calentamiento a presión reducida durante 2 horas, se añadieron 5 ml de tetrahidrofurano, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 1,5 horas para obtener una solución activada. Se disolvió un monómero (una mezcla de (DL)-lactida y glicólido con una relación molar de 1:1) de 35 veces mol de tBuOK utilizado para la preparación de la solución activada en tetrahidrofurano para obtener una solución monomérica. La solución monomérica se añadió gota a gota a la solución activada, seguido de agitación durante 30 minutos, y a continuación se añadieron 0,2 ml de ácido acético para detener la reacción. La solución después de completar la reacción se concentró a presión reducida, y se reprecipitó y purificó con un sistema de cloroformo (solvente bueno)-metanol (solvente pobre) y un sistema de cloroformo (solvente bueno)-ciclohexano (solvente pobre) para obtener un sólido blanco. El sólido blanco obtenido se disolvió en 5 ml de cloroformo, se añadieron 0,4 ml de ácido trifluoroacético, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de reacción se concentró a presión reducida, y se reprecipitó y purificó con un sistema de cloroformo (disolvente bueno) - éter dietílico (disolvente pobre) para obtener un curdlano modificado (9) como un sólido blanco.

[0073] De la misma manera, se sintetizó un curdlano modificado (10) al hacer reaccionar un curdlano trimetilsililado (5) con un monómero de 50 veces mol de tBuOK, se sintetizó un curdlano modificado (11) al hacer reaccionar un curdlano trimetilsililado (6) con un monómero de 35 veces mol de tBuOK, se sintetizó un curdlano modificado (12) al hacer reaccionar el curdlano trimetilsililado (6) con un monómero de 50 veces mol de tBuOK, se sintetizó un curdlano modificado (13) al hacer reaccionar un curdlano trimetilsililado (7) con un monómero de 35 veces mol de tBuOK, y se sintetizó un curdlano modificado (14) al hacer reaccionar el curdlano trimetilsililado (7) con un monómero de 50 veces mol de tBuOK.

[0074] Los resultados de la evaluación de curdlanos modificados (9) a (14) se muestran en la Tabla 2. El peso molecular medio numérico de curdlano modificado se determinó mediante medición de GPC (columna, Tosoh Corporation TSK-gel α-5000 3 2, disolvente DMF; detector, RI; estándar de referencia, pululano) (Fig. 6: curdlano modificado (9)). La proporción (p/p) de segmentos de curdlano contenidos en el curdlano modificado se determinó a partir del peso molecular medio numérico del curdlano utilizado para la síntesis y el peso molecular medio numérico del curdlano modificado. El peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto se determinó mediante la medición de ¹H-RMN (Fig. 8: curdlano modificado (9)). El número medio de cadenas de injerto se determinó dividiendo el valor obtenido restando el peso molecular medio numérico de curdlano del peso molecular medio numérico del curdlano modificado por el peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto.

[Tabla 2]

50

[0075]

Tabla 2: Resultados del análisis de curdlanos modificados (9) a (14)

	Peso molecular de curdlano modificado	Peso molecular de curdlano	Proporción de curdlano	Peso molecular de la cadena del injerto	Número de cadenas de injerto
Curdlano modificado (9)	18.000	2.800	15,6%	2.500	6,1
Curdlano modificado (10)	25.000		11,2%	4.400	5,0

(continuación)

	Peso molecular de curdlano modificado	Peso molecular de curdlano	Proporción de curdlano	Peso molecular de la cadena del injerto	Número de cadenas de injerto
Curdlano modificado (11)	17.000	2.300	13,5%	2.900	5,1
Curdlano modificado (12)	22.000		10,5%	3.900	5,1
Curdlano modificado (13)	23.000	1.900	8,3%	3.600	5,9
Curdlano modificado (14)	20.000		9,5%	4.900	3,7

Ejemplo Comparativo 1: Síntesis de dextrano en la que se modifica poli(ácido láctico-co-glicólico) (dextrano modificado (15))

5

[0076] Usando 5 g de dextrano (número de peso molecular promedio 4,100, SERVA), se obtuvieron 5,2 g de un dextrano trimetilsililado (8) como un sólido blanco de la misma manera que en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 mencionados anteriormente. De la misma manera que en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 mencionados anteriormente, 0,5 g de un dextrano trimetilsililado (8) a continuación se hizo reaccionar con terc-butoxipotasio (tBuOK) y un monómero (una mezcla de (DL)-lactida y glicólido con una relación molar de 1:1) de 35 veces mol de tBuOK para obtener 0,9 g de un dextrano modificado (15) como un sólido blanco.

10

[0077] Los resultados de la evaluación de dextrano modificado (15) se muestran en la Tabla 3. Cada valor se calculó de la misma manera que en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 mencionados anteriormente.

15

[Tabla 3]

[0078]

20

Tabla 3: Resultados del análisis de dextrano modificado (15)

	Peso molecular de dextrano modificado	Peso molecular de dextrano	Proporción de dextrano	Peso molecular de la cadena del injerto	Número de cadenas de injerto
Dextrano modificado (15)	21.000	4.100	19,5%	3.500	4,8

Ejemplo 3: Preparación de partículas (partículas de curdlano (1) a (5), partículas de laminarano (6) y (7), partícula comparativa de PLGA (8), partícula comparativa de dextrano (9)) utilizando el procedimiento de emulsión O/W

25 **[0079]**

Al disolver 10 mg de curdlanos modificados (9) a (13) que se muestran en la Tabla 4 en 1 ml de acetato de etilo, se preparó una solución de polímero. Se añadió la solución de polímero gota a gota a 4 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v), seguido de agitación a 11 000 rpm durante 1 minuto usando un mezclador (Polytron, PT2100S) para preparar una solución en emulsión O/W. El acetato de etilo se retiró de la solución de emulsión O/W mediante el procedimiento de evaporación del solvente, y la solución se utilizó como una suspensión de partículas. La suspensión se transfirió a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para precipitar la partícula. Después de retirar el sobrenadante, la partícula se volvió a suspender en 10 ml de agua destilada, y la partícula se reprecipitó mediante centrifugación en las condiciones anteriores. Esta operación de lavado se repitió una vez más, el sobrenadante se retiró y a continuación la partícula se suspendió en 1,8 ml de una solución acuosa que contenía manitol al 5% (p/v) y polisorbato 80 al 0,1% (p/v). La suspensión se pre congeló con nitrógeno líquido y a continuación se liofilizó a una temperatura de enfriamiento de trampa de -45 °C y a un vacío de 20 Pa durante 12 horas utilizando un dispositivo de liofilización (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., FD-1000) para obtener partículas de curdlano (1) a (5).

30

35

[0080] De la misma manera, se obtuvieron partículas de laminarano (6) y (7) con laminaranos modificados (3)

y (8) como material base, respectivamente.

[0081] Como ejemplo comparativo, una partícula comparativa de PLGA (8) con ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA, número de peso molecular promedio 5.000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como material base, y una partícula comparativa de dextrano (9) con dextrano modificado (15) como material base se obtuvieron de la misma manera.

[0082] El tamaño medio de partícula de la partícula se calculó mediante la medición de la distribución de la intensidad de dispersión de la luz y el coeficiente de difusión utilizando un dispositivo dinámico de dispersión de luz (Otsuka Electronics Co., Ltd., ELS-Z) y mediante el análisis por el procedimiento acumulante. Los resultados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

15 **[0083]**

Tabla 4: Resultados del análisis de partículas (partículas de curdlano (1) a (5), partículas de laminarano (6) y (7), partícula comparativa de PLGA (8), partícula comparativa de dextrano (9)) preparadas por el procedimiento de emulsión O/W

	Material base	Tamaño de partícula
Partícula (1)	Curdlano modificado (9)	1024,0 nm
Partícula (2)	Curdlano modificado (10)	1027,7 nm
Partícula (3)	Curdlano modificado (11)	1049,6 nm
Partícula (4)	Curdlano modificado (12)	1127,8 nm
Partícula (5)	Curdlano modificado (13)	1026,2 nm
Partícula (6)	Laminarano modificado (3)	1270,0 nm
Partícula (7)	Laminarano modificado (8)	1059,0 nm
Partícula comparativa (8)	Poli(ácido láctico-co-glicólico)	1095,3 nm
Partícula comparativa (9)	Dextrano modificado (15)	957,9 nm

20

Ejemplo 4: Preparación de partículas (partícula de curdlano que contiene OVA (10), partícula de curdlano (11), partículas de laminarano que contienen OVA (12) a (14), partícula comparativa de dextrano que contiene OVA (15)) utilizando el procedimiento de emulsión S/O/W

25 **[0084]** Al disolver 100 mg de curdlano modificado (13) en 1,8 ml de carbonato de dimetilo y 200 mL de terc-butanol, se preparó una solución de polímero. A la disolución de polímero, se agregó 1 ml de una disolución acuosa de OVA al 0,1% (p/v) (ovoalbúmina, Sigma-Aldrich Co. LLC.) gota a gota, seguido de agitación a 11.000 rpm durante 1 minuto usando un mezclador (Polytron, PT2100S) para preparar una disolución de emulsión W/O. La solución de emulsión W/O se pre congeló con nitrógeno líquido, y a continuación se liofilizó durante 12 horas a una temperatura de enfriamiento de trampa de -45 °C y a un vacío de 20 Pa usando un dispositivo de liofilización (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., FD-1000). El contenido sólido obtenido se dispersó en 10 ml de acetato de etilo para preparar una solución de suspensión de S/O. La solución en suspensión de S/O se añadió gota a gota a 40 ml de solución acuosa de alcohol polivinílico al 1%(p/v), seguido de agitación a 6.000 rpm durante 5 minutos usando un mezclador (Silverson Nippon Ltd, L5M-A) para preparar una solución en emulsión de S/O/W. El acetato de etilo se retiró de la solución en emulsión S/O/W mediante el procedimiento de evaporación del solvente, y la solución se utilizó como una suspensión de partículas. La suspensión se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para precipitar la partícula. Después de retirar el sobrenadante, la partícula se volvió a suspender en 50 ml de agua destilada, y la partícula se reprecipitó mediante centrifugación en las condiciones anteriores. Esta operación de lavado se repitió una vez más, el sobrenadante se retiró y a continuación la partícula se suspendió en 8 ml de una solución acuosa que contenía manitol al 5% (p/v) y polisorbato 80 al 0,1% (p/v). La suspensión se pre congeló con nitrógeno líquido y a continuación se liofilizó durante 12 horas a una temperatura de enfriamiento de trampa de -45 °C y a un vacío de 20 Pa utilizando un dispositivo de liofilización para obtener una partícula de curdlano que contenía OVA (10).

[0085] Utilizando agua destilada en lugar de una solución de OVA, se obtuvo de la misma manera una partícula de curdlano que no contenía OVA (11). Usando laminaranos modificados (1), (3) y (5), las partículas de laminarano que contienen OVA (12) a (14) se obtuvieron de la misma manera.

[0086] Como ejemplo comparativo, utilizando dextrano modificado (15) como material base, se obtuvo una

partícula comparativa de dextrano que contenía OVA (15) de la misma manera.

[0087] Los resultados de las evaluaciones de partículas se muestran en la Tabla 5. El tamaño medio de partícula de las partículas se calculó mediante el procedimiento acumulante usando un dispositivo de dispersión de luz dinámica (Otsuka Electronics Co., Ltd., ELS-Z). La velocidad de encapsulación (p/p) de un antígeno se determinó extrayendo el antígeno de la partícula usando un solvente orgánico, realizando electroforesis en gel para el antígeno extraído usando un dispositivo de electroforesis en gel (TEFCO), y a continuación tiñendo el antígeno usando un kit de tinción de coloide CBB (TEFCO).

10 [Tabla 5]

[0088]

15 Tabla 5: Resultados del análisis de partículas (partícula de curdlano que contiene OVA (10), partícula de curdlano (11), partículas de laminarano que contienen OVA (12) a (14), partícula comparativa de dextrano que contiene OVA (15) preparado por el procedimiento de emulsión S/O/W

	Material base	Tamaño de partícula	Tasa de encapsulación de antígeno
Partícula (10)	Curdlano modificado (13)	483,9 nm	0,96%
Partícula (11)	Curdlano modificado (13)	484,4 nm	-
Partícula (12)	Laminarano modificado (1)	508,0 nm	0,94%
Partícula (13)	Laminarano modificado (3)	556,3 nm	0,93%
Partícula (14)	Laminarano modificado (5)	517,9 nm	0,85%
Partícula comparativa (15)	Dextrano modificado (15)	537,2 nm	0,89%

Ejemplo de Referencia 1: Inducción de células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BMDC)

20 **[0089]** Después de que los ratones C57BL/6 macho de 8 semanas de edad se sometieron a eutanasia con gas ácido carbónico, se retiró el fémur. Ambos extremos del fémur se cortaron con tijeras, se inyectó un medio RPMI1640 (en lo sucesivo denominado medio RPMI) que contenía FBS al 10% (Sigma-Aldrich Co. LLC.), 100 UI/ml de penicilina (Life Technologies, Inc.) y 100 UI/ml de estreptomycin (Life Technologies, Inc.) en el interior del fémur con un inyector, y se recolectó una solución de médula ósea. La solución de médula ósea se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos para precipitar las células, y el sobrenadante se retiró. Las células recolectadas se suspendieron en 1 ml de un tampón de hemólisis (1,66% [p/v] de solución acuosa de cloruro de amonio), y a continuación se dejaron reposar a 4 °C durante 4 minutos para hemolizar las células. A la suspensión celular después de la hemólisis, se añadieron 10 ml de un medio RPMI, la solución se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos para precipitar las células y se retiró el sobrenadante. Las células se suspendieron en un medio RPMI1640 (en lo sucesivo denominado medio de cultivo) que contenía FBS al 10% (Sigma-Aldrich Co. LLC.), 10 ng/ml de GM-CSF, 100 UI/ml de penicilina (Life Technologies, Inc.) y 100 UI/ml de estreptomycin (Life Technologies, Inc.), y a continuación se sembraron en una placa de 6 pocillos (IWAKI & Co., Ltd., Flat Bottom Tissue Culture Treated, Polystyrene). La placa sembrada se incubó durante 3 horas en una incubadora de CO₂ (NAPCO) en las condiciones de CO₂ al 5%, 37 °C y humedad al 100%, y las células se suspendieron fuertemente usando una micropipeta para recolectar solo células no adheridas en la placa. Las células recolectadas se resuspendieron en un medio de cultivo, y a continuación se sembraron en una placa de 6 pocillos y se incubaron en una incubadora de CO₂. El medio de cultivo se intercambió en los días 2 y 4 de cultivo, y las células se suspendieron fuertemente usando una micropipeta en el día 5 de cultivo para recolectar solo células no adheridas en la placa, a saber, células dendríticas inducidas.

40 Ejemplo 5: Prueba de estimulación in vitro de β -glucano modificado en células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BMDC)

<Procedimientos>

45 **[0090]** Después de pesar 10 mg del β -glucano modificado obtenido en el Ejemplo 2 (curdlanos modificados (9) a (12)), el β -glucano modificado se disolvió en 10 ml de acetonitrilo para obtener una solución polimérica. Al dejar caer 100 ml de la solución de polímero (100 mg de polímero) en una placa de 6 pocillos y secar la placa, se obtuvo una placa recubierta con polímero. En la placa recubierta con polímero, las células dendríticas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1 se sembraron junto con un medio de cultivo de modo que la cantidad de células fuera 1310^6 por pocillo. La placa sembrada se incubó durante 2 días en una incubadora de CO₂, y a continuación las células se suspendieron fuertemente usando una micropipeta para recolectar solo células no adheridas en la placa. Las células recolectadas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos para precipitar las células, el sobrenadante se retiró y las células se suspendieron en 100 ml de un medio RPMI. A la suspensión celular, se añadieron anticuerpos anti-CD86 marcados

con FITC y anticuerpos anti-CD11c marcados con PE, y la suspensión se dejó reposar a 4 °C durante 15 minutos para realizar la reacción de etiquetado de anticuerpos. Después de completar la reacción de etiquetado de anticuerpos, se evaluó el nivel de expresión de un marcador de activación (CD86) en función de la intensidad de fluorescencia media (MFI) mediante citometría de flujo.

5

[0091] Como ejemplo comparativo, utilizando una placa en la que se obtuvo dextrano modificado (15) en el ejemplo comparativo 1, se recubrió de la misma manera un curdlano trimetilsililado (1) obtenido en el ejemplo 1, o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., PLGA-5020), y se comparó el nivel de expresión del marcador de activación de la misma manera. Como otro ejemplo comparativo, se agregaron 100 mg de hidrolizado de curdlano (1) obtenido en el ejemplo 1 o 100 mg de poli I:C (Sigma-Aldrich Co. LLC.) con capacidad inmunopotenciadora conocida a un medio de cultivo, y el nivel de expresión del marcador de activación se comparó de la misma manera.

<Resultados>

15

[0092] La intensidad de fluorescencia media (MFI), un índice del nivel de expresión de CD86, se muestra en la Fig. 9. CD86 es uno de los marcadores de activación de las células dendríticas. Cuando se utilizaron curdlanos modificados (9) a (12), el nivel de expresión de CD86 fue mayor que cuando se utilizaron dextrano modificado (15) y poli(ácido láctico-co-glicólico), lo que revela que el β -glucano modificado tiene una potente capacidad de activación de células dendríticas. Cuando se utilizaron un hidrolizado de curdlano (1) y un curdlano trimetilsililado (1), el nivel de expresión de CD86 fue menor que cuando se utilizó β -glucano modificado, lo que revela que la modificación de poli(hidroxiácido) a β -glucano es importante para la activación de células dendríticas.

20

Ejemplo 6: Prueba de estimulación in vitro 1 de partículas con β -glucano modificado como material base en células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BMDC)

25

<Procedimientos>

[0093] Las células dendríticas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1 se sembraron junto con un medio de cultivo en una placa de 6 pocillos de modo que la cantidad de células fuera 1.3×10^6 por pocillo, y se agregaron además 0.2 mg de las partículas preparadas en el Ejemplo 3 (partículas de curdlano (1) a (5), partícula comparativa de PLGA (8), partícula comparativa de dextrano (9)). La placa sembrada se incubó durante 2 días en una incubadora de CO₂, y a continuación las células se suspendieron fuertemente usando una micropipeta para recolectar solo células no adheridas en la placa. Las células recolectadas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos para precipitar las células, el sobrenadante se retiró y las células se suspendieron en 100 ml de un medio RPMI. A la suspensión celular, se añadieron anticuerpos anti-CD86 marcados con FITC y anticuerpos anti-CD11c marcados con PE, y la suspensión se dejó reposar a 4 °C durante 15 minutos para realizar la reacción de etiquetado de anticuerpos. Después de completar la reacción de etiquetado de anticuerpos, se evaluó el nivel de expresión de un marcador de activación (CD86) en función de la intensidad de fluorescencia media (MFI) mediante citometría de flujo.

35

[0094] Como ejemplo comparativo, se agregaron 100 mg de poli I:C (Sigma-Aldrich Co. LLC.) a un medio de cultivo y el nivel de expresión del marcador de activación se comparó de la misma manera.

<Resultados>

45

[0095] La intensidad de fluorescencia media (MFI), un índice del nivel de expresión de CD86 en cada partícula, se muestra en la Fig. 10. Cuando se utilizaron partículas (partículas de curdlano (1) a (5), partícula comparativa de PLGA (8), partícula comparativa de dextrano (8)), el nivel de expresión de CD86 fue mayor que cuando no se agregaron partículas, lo que revela que las partículas tienen capacidad de activación de células dendríticas. Además, cuando se utilizaron partículas con curdlano modificado como material base (partículas de curdlano (1) a (5)), se reveló que tenían una capacidad de activación de células dendríticas más potente que una partícula con dextrano modificado como material base (partícula comparativa de dextrano (9)) o partícula con PLGA como material base (partícula comparativa de PLGA (8)). Se descubrió que las partículas con β -glucano modificado como material base tenían una capacidad inmunopotenciadora potente.

55

Ejemplo 7: Prueba de estimulación in vitro 2 de partículas con β -glucano modificado como material base en células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BMDC)

<Procedimientos>

60

[0096] De la misma manera que en el Ejemplo 6, se agregaron 0,2 mg de las partículas preparadas en el Ejemplo 3 (partículas de laminarano (6) y (7), partícula comparativa de PLGA (8), partícula comparativa de dextrano (9)) en una placa en la que se sembraron las células dendríticas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1, y se evaluó el nivel de expresión de un marcador de activación (CD86) en función de la intensidad de fluorescencia media (MFI).

65

[0097] Como ejemplo comparativo, se agregaron 100 mg de poli I:C (Sigma-Aldrich Co. LLC.) a un medio de cultivo y el nivel de expresión del marcador de activación se comparó de la misma manera.

<Resultados>

5 **[0098]** La intensidad de fluorescencia media (MFI), un índice del nivel de expresión de CD86 en cada partícula, se muestra en la Fig. 11. Cuando se utilizaron partículas con laminarano modificado como material base (partículas laminarano (6) y (7)), se reveló que tenían una capacidad de activación de células dendríticas más potente que una partícula con dextrano modificado como material base (partícula comparativa de dextrano (9)) o una partícula con PLGA como material base (partícula comparativa de PLGA (8)). En otras palabras, se reveló que las partículas con laminarano modificado como material base tienen una potente capacidad de activación de células dendríticas, como las partículas con curdlano modificado como material base en el Ejemplo 6.

Ejemplo 8: Prueba in vivo 1 de β -glucano modificado en ratones (evaluación por capacidad de producción de IFN- γ)

15 <Procedimientos>

[0099] Los ratones utilizados para el experimento fueron ratones C57BL/6NCR macho de 5 semanas comprados a Japan SLC, Inc. Los ratones se criaron en condiciones de alimentación libre con un ciclo día/noche de 12 horas en una instalación de cría interna durante 1 semana y se aclimataron al ambiente.

20 **[0100]** La administración se realizó a los ratones en las condiciones mostradas en la Tabla 6. En las condiciones (1) y (2) y condición comparativa (3), las partículas preparadas en el Ejemplo 4 (partícula de curdlano que contiene OVA (10), partícula comparativa de dextrano que contiene OVA (15)) se dispersaron en 50 ml de solución acuosa de manitol al 4%(p/v), y la solución se administró a las almohadillas de los pies en ambas patas traseras usando una aguja de inyección 29G (Terumo Myjector). En condiciones comparativas (4), OVA (Sigma-Aldrich Co. LLC.) y poli I:C (Sigma-Aldrich Co. LLC.) se administraron de la misma manera. En condiciones comparativas (5), se administró una solución que no contenía antígenos de la misma manera.

25 **[0101]** En la condición (2) y las condiciones comparativas (3) y (4), la segunda administración se realizó 3 días después de la primera administración de la misma manera, y la tercera administración se realizó 6 días después de la primera administración de la misma manera.

30 **[0102]** Los ratones después de la administración se criaron en condiciones de alimentación libre y en un entorno donde es posible el suministro de agua, y se sometieron a eutanasia con gas ácido carbónico 2 semanas después de la primera administración. Los ganglios linfáticos por debajo de la rodilla cerca del sitio de administración se eliminaron de forma aséptica, las células contenidas se dispersaron y a continuación se filtraron con un filtro de 200 mm (AS ONE Corporation, FILCONS, 120-22S) para eliminar los residuos. Las células recolectadas se suspendieron en un medio RPMI1640 (en lo sucesivo denominado medio RPMI) que contenía FBS al 10% (Sigma-Aldrich Co. LLC.), 100 UI/ml de penicilina (Life Technologies, Inc.) y 100 UI/ml de estreptomycin (Life Technologies, Inc.), se sembraron en una placa de 96 pocillos (IWAKI & Co., Ltd., poliestireno de cultivo de tejido de fondo plano) de modo que la cantidad de células fue de 5×10^5 por pocillo, y se agregó adicionalmente un medio RPMI que contenía 10 mg de OVA y 0,75 mg de 2-mercaptoetanol para estimular las células. La placa sembrada se incubó en una incubadora de CO₂ durante 48 horas, se recolectó el sobrenadante de cultivo y se midió la concentración de IFN- γ producida de cada grupo celular mediante el procedimiento ELISA (Mabtech AB, kit de ELISA IFN-gamma de ratón [HRP]).

45 <Resultados>

[0103] La cantidad de IFN- γ producida por las células de los ganglios linfáticos se muestra en la Fig. 12. IFN- γ es un índice de activación de la inmunidad mediada por células. En las condiciones en las que se administró una partícula que contenía OVA (condiciones (1) y (2) y condición comparativa (3)), se encontró una producción más fuerte de IFN- γ que en la condición en la que no se administró un antígeno (condición comparativa (5)) y la condición en la que se administraron OVA y poli I:C (condición comparativa (4)), lo que revela que una partícula que contiene un antígeno es eficaz para la activación de la inmunidad específica del antígeno. En las condiciones en las que se administró una partícula con curdlano modificado como material base (condiciones (1) y (2)), se encontró una producción más fuerte de IFN- γ que en la condición en la que se administró una partícula con dextrano modificado como material base (condición comparativa (3)). En otras palabras, se reveló que una partícula con β -glucano modificado como material base y que contiene un antígeno mejora la inmunidad específica del antígeno. Bajo la condición en la que se administró una partícula 3 veces (condición (2)), se encontró una mayor producción de IFN- γ que bajo la condición en la que se administró la partícula una vez (condición (1)), lo que revela que la administración múltiple también es eficaz para mejorar aún más la inmunidad.

[Tabla 6]

[0104]

5 Tabla 6: Condiciones de administración en la prueba in vivo 1 de β -glucano modificado en ratones

	Sustancia administrada	Frecuencia de administración
Condición (1)	2,5 mg de partícula de curdlano que contiene OVA (10)	1
Condición (2)	2,5 mg de partícula de curdlano que contiene OVA (10)	3
Condición comparativa (3)	2,5 mg de partícula comparativa de dextrano que contiene OVA (15)	3
Condición comparativa (4)	25 mg de OVA, 25 mg de poli I:C	3
Condición comparativa (5)	-	1

Ejemplo 9: Prueba in vivo 2 de β -glucano modificado en ratones (evaluación por capacidad de producción de IFN- γ)

<Procedimientos>

10

[0105] La administración se realizó en las condiciones mostradas en la Tabla 7 a ratones criados en las mismas condiciones que en el Ejemplo 8. En las condiciones (6) a (8) y la condición comparativa (9), las partículas preparadas en el Ejemplo 4 (partículas de laminarano que contienen OVA (12) a (14), partículas comparativas de dextrano que contienen OVA (15)) se dispersaron en 100 ml de solución acuosa de manitol al 4% (p/v), y la solución se administró a las almohadillas de los pies en ambas patas traseras usando una aguja de inyección 29G (Terumo Myjector). En condiciones comparativas (10), OVA (Sigma-Aldrich Co. LLC.) y poli I:C (Sigma-Aldrich Co. LLC.) se administraron de la misma manera. En condiciones comparativas (11), OVA (Sigma-Aldrich Co. LLC.) se administró de la misma manera. En condiciones comparativas (12), se administró una solución que no contenía antígenos de la misma manera.

20

[0106] Los ratones después de la administración se criaron en condiciones de alimentación libre y en un entorno donde es posible el suministro de agua, y se sometieron a eutanasia con gas ácido carbónico 2 semanas después de la primera administración. De la misma manera que en el Ejemplo 8, se retiraron las células contenidas en los ganglios linfáticos y se midió la cantidad de producción de IFN- γ después de la estimulación con OVA.

25

<Resultados>

30

[0107] La cantidad de IFN- γ producida por las células de los ganglios linfáticos se muestra en la Fig. 13. En las condiciones en las que se administraron partículas de laminarano que contenían OVA (condiciones (6) a (8)), se observó una producción más fuerte de IFN- γ que en la condición en la que se administraron OVA que contenían partículas comparativas de dextrano (condición comparativa (9)) y la condición en la que se administraron OVA y poli I:C (condición comparativa (10)). Al igual que una partícula con curdlano modificado como material base y que contiene un antígeno en el Ejemplo 8, se reveló que una partícula con laminarano modificado como material base y que contiene un antígeno mejora la inmunidad específica del antígeno.

35

[Tabla 7]

[0108]

40 Tabla 7: Condiciones de administración en la prueba in vivo 2 de β -glucano modificado en ratones

	Sustancia administrada	Frecuencia de administración
Condición (6)	5 mg de partícula de laminarano que contiene OVA (12)	1
Condición (7)	5 mg de partícula de laminarano que contiene OVA (13)	1
Condición (8)	5 mg de partícula de laminarano que contiene OVA (14)	1
Condición comparativa (9)	5 mg de partícula comparativa de dextrano que contiene OVA (15)	1

(continuación)

	Sustancia administrada	Frecuencia de administración
Condición comparativa (10)	50 mg de OVA, 50 mg de poli I:C	1
Condición comparativa (11)	50 mg de OVA	1
Condición comparativa (12)		1

Ejemplo 10: Prueba in vivo 3 de β -glucano modificado en ratones (efectos antitumorales)

5 <Procedimientos>

[0109] Usando células cancerosas murinas que expresan OVA E.G7-OVA (ATCC) como células portadoras de tumores, se mantuvo un estado de crecimiento logarítmico de antemano, y las células se cultivaron durante 1 semana con un medio RPMI. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS esterilizado para preparar las células que se trasplantarían.

[0110] Como animales hospedadores, ratones machos C57BL/6NCR de 5 semanas de edad comprados a Japan SLC, Inc. se criaron en condiciones de alimentación libre con un ciclo día/noche de 12 horas en nuestras instalaciones de cría y se aclimataron al medio ambiente. A continuación, se administraron por vía subcutánea 100 ml de PBS que contenía 2×10^6 células E.G7-OVA en el abdomen utilizando una aguja de inyección de 25 G para desarrollar un tumor.

[0111] Los días 0, 3, 7, 10 y 15 después del desarrollo de un tumor, se realizó la administración a los ratones en las condiciones que se muestran en la Tabla 8. En las condiciones (13) y (14), las partículas preparadas en el Ejemplo 4 (partícula de curdlano que contiene OVA (10), partícula de curdlano (11)) se dispersaron en 100 ml de solución acuosa de manitol al 4% (p/v), y la solución se administró a las proximidades del sitio de soporte del tumor usando una aguja de inyección 29G (Terumo Myjector). En condiciones comparativas (15), OVA (Sigma-Aldrich Co. LLC.) y poli I:C (Sigma-Aldrich Co. LLC.) se administraron de la misma manera. En condiciones comparativas (16), se administró una solución que no contenía antígenos ni partículas de la misma manera.

[0112] Los ratones después de la administración se criaron en condiciones de alimentación libre y en un entorno donde es posible el suministro de agua, y se midió el volumen del tejido tumoral.

<Resultados>

[0113] El volumen medio del tejido tumoral en 5 ratones después del desarrollo de un tumor en cada condición se muestra en la Fig. 14. Bajo la condición en la que se administró una partícula que no contenía antígenos (condición (14)), el aumento en el volumen tumoral se suprimió más que bajo la condición en la que no se administraron antígenos ni partículas (condición comparativa (16)), lo que revela que una partícula con β -glucano modificado como material base tiene efectos antitumorales. Bajo la condición en la que se administró una partícula que contenía un antígeno (13), el aumento en el volumen tumoral se suprimió más que bajo la condición en la que se administró una partícula que no contenía antígenos (condición (14)) y la condición en la que se administraron OVA y poli I:C (condición comparativa (15)), lo que revela que una partícula con β -glucano modificado como material base y que contiene un antígeno tiene efectos antitumorales más potentes.

[Tabla 8]

[0114]

Tabla 8: Condiciones de administración en la prueba in vivo 3 de β -glucano modificado en ratones

	Sustancia administrada	Frecuencia de administración
Condición (13)	5 mg de partícula de curdlano que contiene OVA (10)	5
Condición (14)	5 mg de partícula de curdlano (11)	5
Condición comparativa (15)	50 ug de OVA, 50 mg de poli I:C	5
Condición comparativa (16)	-	5

Ejemplo 11: Síntesis de β -glucano en la que se modifica poli(ácido láctico-co-glicólico) (paquimano modificado (16), sizofirano modificado (17), *Aureobasidium pullulans* glucano modificado (18), escleroglucano modificado (19), curdlanos modificados (20) y (21))

(1) Reacción de hidrólisis de β -glucano (síntesis de hidrolizado de paquimano (7), hidrolizado de sizofirano (8), hidrolizado de glucano de *Aureobasidium pullulans* (9), hidrolizado de escleroglucano (10), hidrolizados de curdlano (11) y (12))

5

[0115] Después de disolver 320 mg de paquimano (Bio Supply) en 27 ml de dimetilsulfóxido, se añadieron 1,2 ml de solución de ácido clorhídrico 1 N, seguido de agitación a 110 °C durante 0,5 horas. La solución de reacción se transfirió a una membrana de diálisis y se dializó en agua, y a continuación se liofilizó para obtener hidrolizado de paquimano (7) (número de peso molecular promedio 1.900) como un polvo.

10

[0116] En las mismas condiciones, se obtuvo un hidrolizado de sizofirano (8) (peso molecular promedio en número 4.400) mediante reacción de sizofirano (InvivoGen) durante 1,3 horas, se obtuvo un hidrolizado de glucano de *Aureobasidium pullulans* (9) (peso molecular promedio en número 2.700) mediante reacción de glucano de *Aureobasidium pullulans* (DAISO Co., Ltd.) durante 0,15 horas, se obtuvo un hidrolizado de escleroglucano (10) (peso molecular promedio en número 3.000) mediante reacción de escleroglucano (Ethy-cythyl) durante 1,15 horas, y se obtuvo un hidrolizado de curdlano (11) (peso molecular promedio en número 18.700) y un hidrolizado de curdlano (12) (peso molecular promedio en número 1.900) mediante reacción de curdlano (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) durante 0,1 y 0,75 horas, respectivamente.

15

20 **[0117]** El peso molecular medio numérico de β -glucano se determinó mediante medición de GPC (columna, Tosoh Corporation TSK-gel G3000PW_{XL}-CP 3 2, solvente tampón de ácido acético [10 mM, pH = 5], detector, RI; estándar de referencia, pululano).

25 (2) Reacción de trimetilsililación (TMS) de β -glucano (síntesis de paquimano trimetilsililado (9), sizofirano trimetilsililado (10), *Aureobasidium pullulans* glucano trimetilsililado (11), escleroglucano trimetilsililado (12), curdlano trimetilsililado (13) y (14))

30 **[0118]** Después de añadir 180 mg de un hidrolizado de paquimano (7) a 25 ml de dimetilsulfóxido, la solución se calentó hasta 80 °C. A esta solución, se añadieron 20 ml de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano gota a gota durante 20 minutos, seguido de agitación a 80 °C durante 16 horas. La solución de reacción se transfirió a un embudo de separación y se dejó reposar hasta que se separó en dos capas. La capa superior se recogió y se concentró a presión reducida y se añadieron 5 ml de metanol, y a continuación el sólido obtenido se filtró y se secó para obtener 250 mg de un paquimano trimetilsililado (9) como un sólido blanco.

35 **[0119]** De la misma manera, se sintetizó un sizofirano trimetilsililado (10) a partir de un hidrolizado de sizofirano (8), se sintetizó un *Aureobasidium pullulans* glucano trimetilsililado (11) a partir de un hidrolizado de *Aureobasidium pullulans* glucano (9), se sintetizó un escleroglucano trimetilsililado (12) a partir de un hidrolizado de escleroglucano (10), se sintetizó un curdlano trimetilsililado (13) a partir de un hidrolizado de curdlano (11) y se sintetizó un curdlano trimetilsililado (14) a partir de un hidrolizado de curdlano (12).

40

[0120] El progreso de la reacción de trimetilsililación se confirmó mediante la medición de ¹H-RMN.

45 (3) Reacción de modificación de poli(ácido láctico-co-glicólico) a β -glucano (síntesis de paquimano modificado (16), sizofirano modificado (17), glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18), escleroglucano modificado (19), curdlano modificado (20) y (21))

50 **[0121]** Después de que se secaron 230 mg de un paquimano trimetilsililado (9) y 22 mg de terc-butoxipotasio (tBuOK) con calentamiento a presión reducida durante 2 horas, se añadieron 10 ml de tetrahidrofurano, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 1,5 horas para obtener una solución activada. Se disolvió un monómero (una mezcla de (DL)-lactida y glicólido con una relación molar de 1:1) de 35 veces mol de tBuOK utilizado para la preparación de la solución activada en tetrahidrofurano para obtener una solución monomérica. La solución monomérica se añadió gota a gota a la solución activada, seguido de agitación durante 30 minutos, y a continuación se añadieron 0,2 ml de ácido acético para detener la reacción. La solución después de completar la reacción se concentró a presión reducida, y se reprecipitó y purificó con un sistema de cloroformo (solvente bueno)-metanol (solvente pobre) y un sistema de cloroformo (solvente bueno)-ciclohexano (solvente pobre) para obtener un sólido blanco. El sólido blanco obtenido se disolvió en 9 ml de cloroformo, se añadieron 1 ml de ácido trifluoroacético, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de reacción se concentró a presión reducida, y se reprecipitó y purificó con un sistema de cloroformo (solvente bueno) - éter dietílico (solvente pobre) para obtener 287 mg de un paquimano modificado (16) como un sólido blanco.

60

65 **[0122]** De la misma manera, se sintetizó un sizofirano modificado (17) a partir de un sizofirano trimetilsililado (10), se sintetizó un glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18) a partir de un glucano de *Aureobasidium pullulans* trimetilsililado (11), se sintetizó un escleroglucano modificado (19) a partir de un escleroglucano trimetilsililado (12), se sintetizó un curdlano modificado (20) a partir de un curdlano trimetilsililado (13) y se sintetizó un curdlano modificado (21) a partir de un curdlano trimetilsililado (14).

[0123] Los resultados de la evaluación de β -glucano modificado se muestran en la Tabla 9. El peso molecular medio numérico de β -glucano modificado se determinó mediante medición de GPC (columna, Tosoh Corporation TSK-gel α -500032, disolvente DMF; detector, RI; estándar de referencia, pululano). La proporción (p/p) de segmentos de β -glucano contenidos en β -glucano modificado se determinó a partir del peso molecular medio en número de β -glucano utilizado para la síntesis y el peso molecular medio en número de β -glucano modificado. El peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto se determinó mediante la medición de $^1\text{H-RMN}$ (Fig. 15, paquimano modificado (16); Fig. 16, sizofirano modificado (17); Fig. 17, glucano de *Aureo-basidium pullulans* modificado (18); Fig. 18, escleroglucano modificado (19)). El número medio de cadenas de injerto se determinó dividiendo el valor obtenido restando el peso molecular medio numérico de β -glucano del peso molecular medio numérico de β -glucano modificado por el peso molecular medio numérico de cada cadena de injerto.

[Tabla 9]

15 **[0124]**

Tabla 9: Resultados del análisis de β -glucanos modificados [paquimano modificado (16), sizofirano modificado (17), glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18), escleroglucano modificado (19), curdlano modificado (20) y (21)]

	Peso molecular de β -glucano modificado	Peso molecular de β -glucano	Proporción de β -glucano	Peso molecular de la cadena del injerto	Número de cadenas de injerto
Paquimano modificado (16)	13.800	1.900	13,8%	1.300	9,2
Sizofirano modificado (17)	14.700	4.400	29,9%	4.200	2,5
<i>Aureobasidium pullulans</i> β -glucano modificado (18)	15.100	2.700	17,9%	4.900	2,5
Escleroglucano modificado (19)	14.200	3.000	21,1%	1.950	5,7
Curdlano modificado (20)	44.000	18.700	42,5%	2.800	9,0
Curdlano modificado (21)	21.300	1.900	8,9%	3.900	5,0

20

Ejemplo 12: Síntesis de paquimarano en la que se modifica poli(ácido láctico-co-glicólico) (paquimarano modificado (22))

(1) Reacción de escisión oxidativa de paquimano (síntesis de paquimarano)

25

[0125] Después de mezclar 1 g de paquimano (Bio Supply) con 120 ml de agua, se añadieron 40 ml de solución de periodato de sodio 0,1 M, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 40 horas, y a continuación el reactivo se recogió mediante centrifugación. El reactivo se mezcló con 54 ml de agua, se añadieron 27 ml de una solución que contenía 216 mg de borohidruro de sodio, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 28 horas, y a continuación el reactivo se recogió por centrifugación. El reactivo se mezcló con 70 mL de solución de ácido sulfúrico 0,05 M y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, y a continuación se recolectaron 0,91 g de paquimarano.

(2) Reacción de hidrólisis de paquimarano (síntesis de hidrolizado de paquimarano (13))

35

[0126] La hidrólisis se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 11 anterior, y usando 360 mg de paquimarano, se obtuvieron 229 mg de hidrolizado de paquimarano (13) (peso molecular promedio en número 2.100) como un polvo.

(3) Reacción de trimetilsililación (TMS) de paquimarano (síntesis de paquimarano trimetilsililado (15))

40

[0127] La trimetilsililación se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 11 mencionado anteriormente y, utilizando 200 mg de hidrolizado de paquimarano (13), se obtuvieron 325 mg de paquimarano trimetilsililado (15) como un sólido blanco.

45

(4) Reacción de modificación de poli(ácido láctico-co-glicólico) a paquimarano (síntesis de paquimarano modificado (22))

[0128] De la misma manera que en el Ejemplo 11 anterior, se hicieron reaccionar 300 mg de un paquimarano trimetilsililado (15) con terc-butoxipotasio (tBuOK) y un monómero (una mezcla de (DL)-lactida y glicólido con una relación molar de 1:1) de 35 veces mol de tBuOK para obtener 353 mg de un paquimarano modificado (22) como un sólido blanco.

5

[0129] Los resultados de la evaluación del paquimarano modificado (22) se muestran en la Tabla 10. Cada valor se determinó mediante medición de GPC y medición de ¹H-RMN de la misma manera que en el Ejemplo 11 mencionado anteriormente (Fig. 19: ¹ medición de H-RMN de paquimarano modificado (22)).

10 [Tabla 10]

[0130]

Tabla 10: Resultados del análisis de paquimarano modificado (22)

	Peso molecular de paquimarano modificado	Peso molecular del paquimarano	Proporción de paquimarano	Peso molecular de la cadena del injerto	Número de cadenas de injerto
Paquimarano modificado (22)	13.800	2.100	15,2%	1.300	9,0

15

Ejemplo 13: Preparación de partículas 2 (partícula de paquimano (16), partícula de sizofirano (17), partícula de glucano de *Aureobasidium pullulans* (18), partícula de escleroglucano (19), partícula de curdlano (20), partícula de paquimarano (21), partícula comparativa de dextrano (22)) preparada por el procedimiento de emulsión O/W

20 **[0131]** Al disolver 10 mg de paquimano modificado (16) en 1 ml de acetato de etilo, se preparó una solución de polímero. Se añadió la solución de polímero gota a gota a 4 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v), seguido de agitación a 11 000 rpm durante 5 minutos usando un mezclador (Polytron, PT2100S) para preparar una solución en emulsión O/W. El acetato de etilo se retiró de la solución de emulsión O/W mediante el procedimiento de evaporación del solvente, y la solución se utilizó como una suspensión de partículas. La suspensión se transfirió a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para precipitar la partícula. Después de retirar el sobrenadante, la partícula se volvió a suspender en 10 ml de agua destilada, y la partícula se reprecipitó mediante centrifugación en las condiciones anteriores. Esta operación de lavado se repitió una vez más, el sobrenadante se retiró y a continuación la partícula se suspendió en 1,8 ml de una solución acuosa que contenía manitol al 5% (p/v) y polisorbato 80 al 0,1% (p/v). La suspensión se pre congeló con nitrógeno líquido y a continuación se liofilizó durante 12 horas a una temperatura de enfriamiento de trampa de -45 °C y a un vacío de 20 Pa utilizando un dispositivo de liofilización (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., FD-1000) para obtener una partícula de paquimano (16).

35 **[0132]** De la misma manera, se obtuvieron partícula de sizofirano (17) con sizofirano modificado (17) como material base, partícula de glucano de *Aureobasidium pullulans* (18) con glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18) como material base, partícula de escleroglucano (19) con escleroglucano modificado (19) como material base, partícula de curdlano (20) con curdlano modificado (20) como material base y partícula de paquimarano (21) con paquimarano modificado (22) como material base.

40 **[0133]** Como ejemplo comparativo, se obtuvo una partícula comparativa de dextrano (22) con dextrano modificado (15) como material base de la misma manera.

[0134] Los resultados del cálculo del tamaño medio de partícula de la partícula por el procedimiento acumulante utilizando un dispositivo dinámico de dispersión de luz (Otsuka Electronics Co., Ltd., ELS-Z) se muestran en la Tabla 11.

45

[Tabla 11]

[0135]

50 Tabla 11: Resultados del análisis de partículas (partícula de paquimano (16), partícula de sizofirano (17), partícula de glucano de *Aureobasidium pullulans* (18), partícula de escleroglucano (19), partícula de curdlano (20), partícula de paquimarano (21), partícula comparativa de dextrano (22)) preparada por el procedimiento de emulsión O/W

	Material base	Tamaño de partícula
Partícula de Paquimano (16)	Paquimano modificado (16)	585 nm
Partícula de sizofirano (17)	Sizofirano modificado (17)	504 nm

(continuación)

	Material base	Tamaño de partícula
Partícula de glucano de <i>Aureobasidium pullulans</i> (18)	Glucano modificado de <i>Aureobasidium pullulans</i> (18)	460 nm
Partícula de escleroglucano (19)	Escleroglucano modificado (19)	470 nm
Partícula de curdlano (20)	Curdlano modificado (20)	524 nm
Partícula de paquimarano (21)	Paquimarano modificado (22)	428 nm
Partícula comparativa de dextrano (22)	Dextrano modificado (15)	543 nm

Ejemplo 14: Preparación de partículas (partículas de curdlano que contienen OVA (23) y (24), partículas de escleroglucano que contienen OVA (25)) utilizando el procedimiento de emulsión S/O/W

5

[0136] Al disolver 100 mg de curdlano modificado (21) en 2,6 ml de carbonato de dimetilo y 200 mL de terc-butanol, se preparó una solución de polímero. A la solución polimérica, se añadió por goteo 1 ml de una disolución de OVA (ovoalbúmina, Sigma-Aldrich Co. LLC.) al 0,5% (p/v), seguido de agitación a 11.000 rpm durante 1 minuto usando un mezclador (Polytron, PT2100S) para preparar una disolución de emulsión W/O. La solución de emulsión W/O se pre congeló con nitrógeno líquido, y a continuación se liofilizó durante 12 horas a una temperatura de enfriamiento de trampa de -45 °C y a un vacío de 20 Pa usando un dispositivo de liofilización (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., FD-1000). El contenido sólido obtenido se dispersó en 10 ml de acetato de etilo para preparar una solución de suspensión de S/O. La solución en suspensión de S/O se añadió gota a gota a 40 ml de solución acuosa de alcohol polivinílico al 1%(p/v), seguido de agitación a 6.000 rpm durante 5 minutos usando un mezclador (Silverson Nippon Ltd, L5M-A) para preparar una solución en emulsión de S/O/W. El acetato de etilo se retiró de la solución en emulsión S/O/W mediante el procedimiento de evaporación del solvente, y la solución se utilizó como una suspensión de partículas. La suspensión se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para precipitar la partícula. Después de retirar el sobrenadante, la partícula se volvió a suspender en 50 ml de agua destilada, y la partícula se reprecipitó mediante centrifugación en las condiciones anteriores. Esta operación de lavado se repitió una vez más, el sobrenadante se retiró y a continuación la partícula se suspendió en 8 ml de una solución acuosa que contenía manitol al 5% (p/v) y polisorbato 80 al 0,1% (p/v). La suspensión se pre congeló con nitrógeno líquido y a continuación se liofilizó durante 12 horas a una temperatura de enfriamiento de trampa de -45 °C y a un vacío de 20 Pa utilizando un dispositivo de liofilización para obtener una partícula de curdlano que contenía OVA (23).

25 **[0137]** De la misma manera, utilizando un curdlano modificado (20), se obtuvo una partícula de curdlano que contenía OVA (24) y, utilizando un escleroglucano modificado (19), se obtuvo una partícula de escleroglucano que contenía OVA (25).

30 **[0138]** Los resultados de las evaluaciones de partículas se muestran en la Tabla 12. El tamaño medio de partícula de las partículas se calculó mediante el procedimiento acumulante usando un dispositivo de dispersión de luz dinámica (Otsuka Electronics Co., Ltd., ELS-Z). La velocidad de encapsulación (p/p) de un antígeno se determinó extrayendo el antígeno de la partícula usando un solvente orgánico, realizando electroforesis en gel para el antígeno extraído usando un dispositivo de electroforesis en gel (TEFCO), y a continuación tiñendo el antígeno usando un kit de tinción de coloide CBB (TEFCO).

35

[Tabla 12]

[0139]

40 Tabla 12: Resultados del análisis de partículas (partículas de curdlano que contienen OVA (23) y (24), partículas de escleroglucano que contienen OVA (25)) preparadas mediante el procedimiento de emulsión S/O/W

	Material base	Tamaño de partícula	Tasa de encapsulación de antígeno
Partícula de curdlano que contiene OVA (23)	Curdlano modificado (21)	486,9 nm	4,97%
Partícula de curdlano que contiene OVA (24)	Curdlano modificado (20)	563,2 nm	4,41%
Partícula de escleroglucano que contiene OVA (25)	Escleroglucano modificado (19)	441,9 nm	4,41%

Ejemplo 15: Prueba de estimulación in vitro 2 de β -glucanos modificados (paquimano modificado (16), sizofirano modificado (17), glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18), paquimarano modificado (22)) en células dendríticas derivadas de la médula ósea murina (BMDC) <Procedimientos>

- 5 **[0140]** Después de que se pesaron 10 mg de β -glucanos modificados obtenidos en el Ejemplo 11 (paquimano modificado (16), sizofirano modificado (17), glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18), paquimarano modificado (22)), se disolvieron en 1 ml de acetónitrilo para obtener una solución de polímero. Al dejar caer la solución polimérica (correspondiente a 1 mg de polímero) (100 ml) en una placa de 12 pocillos y secar la placa, se obtuvo una placa recubierta con polímero. En la placa recubierta con polímero, las células dendríticas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1 se sembraron junto con un medio de cultivo de modo que la cantidad de células fuera 3×10^5 por pocillo. La placa sembrada se incubó durante 2 días en una incubadora de CO₂, y a continuación las células se suspendieron fuertemente usando una micropipeta para recolectar solo células no adheridas en la placa. Las células recolectadas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos para precipitar las células, el sobrenadante se retiró y las células se suspendieron en 100 ml de un medio RPMI. A la suspensión celular, se añadieron anticuerpos anti-CD86 marcados con FITC y anticuerpos anti-CD11c marcados con PE, y la suspensión se dejó reposar a 4 °C durante 15 minutos para realizar la reacción de etiquetado de anticuerpos. Después de completar la reacción de etiquetado de anticuerpos, se evaluó el nivel de expresión de un marcador de activación (CD86) en las células dendríticas (células positivas para CD11c) en función de la intensidad de fluorescencia media (MFI) mediante citometría de flujo.
- 10
- 15
- 20 **[0141]** Como ejemplo comparativo, utilizando una placa en la que se recubrió de la misma manera de dextrano modificado (15) obtenido en el ejemplo comparativo 1, se comparó el nivel de expresión del marcador de activación de la misma manera. Como otro Ejemplo Comparativo, se agregaron 1 mg de β -glucanos no modificados (hidrolizado de paquimano (7), hidrolizado de sizofirano (8), hidrolizado de glucano de *Aureobasidium pullulans* (9), hidrolizado de paquimarano (13)) obtenido en el Ejemplo 11 o 100 mg de poli I:C (Sigma-Aldrich Co. LLC.) con capacidad inmunopotenciadora conocida a un medio de cultivo, y el nivel de expresión del marcador de activación se comparó de la misma manera.
- 25

<Resultados>

- 30 **[0142]** La intensidad de fluorescencia media (MFI), un índice del nivel de expresión de CD86, un marcador de activación de células dendríticas, se muestra en la Fig. 20. Cuando se utilizó un β -glucano modificado, el nivel de expresión de CD86 fue mayor que cuando se utilizó dextrano modificado (15), lo que revela que el β -glucano modificado tiene una potente capacidad de activación de células dendríticas. Cuando se utilizó un β -glucano no modificado, el nivel de expresión de CD86 fue menor que cuando se utilizó β -glucano modificado, lo que revela que la modificación de poli(hidroxiácido) a β -glucano es importante para la capacidad inmunopotenciadora. No solo β -glucanos modificados linealmente (Ejemplo 4, curdlanos modificados (9) a (12); presente Ejemplo, paquimano modificado (16)) pero también β -glucanos modificados ramificados (presente Ejemplo: sizofirano modificado (17), glucano de *Aureobasidium pullulans* modificado (18)) y β -glucano modificado derivatizado (presente Ejemplo: paquimarano modificado (22)) se descubrió que tenían capacidad inmunopotenciadora.
- 35
- 40
- Ejemplo 16: Prueba de estimulación in vitro 2 de partículas con β -glucano modificado como material base (partícula de paquimano (16), partícula de sizofirano (17), partícula de glucano de *Aureobasidium pullulans* (18), partícula de escleroglucano (19), partícula de curdlano (20), partícula de paquimarano (21)) en células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BMDC)
- 45
- [0143]** Las células dendríticas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1 se sembraron junto con un medio de cultivo en una placa de 12 pocillos de modo que la cantidad de células fuera 3×10^5 por pocillo, y se agregaron además 0,05 mg de partículas con β -glucano modificado como material base (partícula de paquimano (16), partícula de sizofirano (17), partícula de glucano de *Aureobasidium pullulans* (18), partícula de escleroglucano (19), partícula de curdlano (20), partícula de paquimarano (21)). La placa sembrada se incubó durante 2 días en una incubadora de CO₂, y a continuación las células se suspendieron fuertemente usando una micropipeta para recolectar solo células no adheridas en la placa. Las células recolectadas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos para precipitar las células, el sobrenadante se retiró y las células se suspendieron en 100 ml de un medio RPMI. A la suspensión celular, se añadieron anticuerpos anti-CD86 marcados con FITC y anticuerpos anti-CD11c marcados con PE, y la suspensión se dejó reposar a 4 °C durante 15 minutos para realizar la reacción de etiquetado de anticuerpos. Después de completar la reacción de etiquetado de anticuerpos, se evaluó el nivel de expresión de un marcador de activación (CD86) en las células dendríticas (células positivas para CD11c) en función de la intensidad de fluorescencia media (MFI) mediante citometría de flujo.
- 50
- 55
- 60 **[0144]** Como ejemplo comparativo, se agregaron 0,05 mg de una partícula con dextrano como material base (partícula comparativa de dextrano (22)) a un medio de cultivo y el nivel de expresión del marcador de activación se comparó de la misma manera. <Resultados>

- [0145]** La intensidad de fluorescencia media (MFI), un índice del nivel de expresión de CD86 en cada partícula, se muestra en la Fig. 21. Cuando se utilizaron partículas con un material base de β -glucano modificado (partícula de
- 65

paquimano (16), partícula de sizofirano (17), partícula de glucano de *Aureobasidium pullulans* (18), partícula de escleroglucano (19), partícula de curdlano (20), partícula de paquimarano (21)), el nivel de expresión de CD86 fue mayor que cuando no se agregaron partículas y cuando se utilizó una partícula con dextrano modificado como material base (partícula comparativa de dextrano (22)), lo que revela que las partículas con β -glucano modificado como material base activan fuertemente las células dendríticas.

Ejemplo 17: Prueba in vivo 4 de β -glucano modificado en ratones (evaluación por capacidad de producción de IFN- γ)

<Procedimientos>

10

[0146] Los ratones utilizados para el experimento fueron ratones C57BL/6NCR macho de 5 semanas comprados a Japan SLC, Inc. Los ratones se criaron en condiciones de alimentación libre con un ciclo día/noche de 12 horas en una instalación de cría interna durante 1 semana y se aclimataron al ambiente.

15 **[0147]** La administración se realizó a los ratones en las condiciones mostradas en la Tabla 13. En las condiciones (17) a (19), las partículas preparadas en el Ejemplo 14 (partículas de curdlano que contienen OVA (23) y (24), una partícula de escleroglucano que contiene OVA (25)) se dispersaron en 50 ml de solución acuosa de manitol al 4% (p/v), y la solución se administró a las almohadillas de los pies en ambas patas traseras con una aguja de inyección 29G (Terumo Myjector). En condiciones comparativas (20), OVA (Sigma-Aldrich Co. LLC.) y un hidrolizado de curdlano (12) se administraron de la misma manera.

25 **[0148]** En todas las condiciones, la segunda administración se realizó 3 días después de la primera administración de la misma manera, la tercera administración se realizó 7 días después de la primera administración de la misma manera, y la cuarta administración se realizó 10 días después de la primera administración de la misma manera.

30 **[0149]** Los ratones después de la administración se criaron en condiciones de alimentación libre y en un entorno donde es posible el suministro de agua, y se sometieron a eutanasia con gas ácido carbónico 16 días después de la primera administración. Los ganglios linfáticos por debajo de la rodilla cerca del sitio de administración se eliminaron de forma aséptica, las células contenidas se dispersaron y a continuación se filtraron con un filtro de 200 mm (AS ONE Corporation, FILCONS, 120-22S) para eliminar los residuos. Las células recolectadas se suspendieron en un medio RPMI1640 (en lo sucesivo denominado medio RPMI) que contenía FBS al 10% (Sigma-Aldrich Co. LLC.), 100 UI/ml de penicilina (Life Technologies, Inc.) y 100 UI/ml de estreptomycin (Life Technologies, Inc.), se sembraron en una placa de 96 pocillos (IWAKI & Co., Ltd., poliestireno de cultivo de tejido de fondo plano) de modo que la cantidad de células fue de 5×10^5 por pocillo, y se agregó adicionalmente un medio RPMI que contenía 10 mg de OVA y 0,75 mg de 2-mercaptoetanol para estimular las células. La placa sembrada se incubó en una incubadora de CO₂ durante 48 horas, se recolectó el sobrenadante de cultivo y se midió la concentración de IFN- γ producida de cada grupo celular mediante el procedimiento ELISA (Mabtech AB, kit de ELISA IFN-gamma de ratón [HRP]).

40 <Resultados>

45 **[0150]** La cantidad de IFN- γ producida por las células de los ganglios linfáticos se muestra en la Fig. 22. IFN- γ es un índice de activación de la inmunidad mediada por células. En la condición en la que se administró una partícula que contenía OVA con curdlano modificado como material base (condición (17)), se encontró una producción más fuerte de IFN- γ que en la condición en la que se administraron OVA y curdlano no modificado (condición comparativa (20)), lo que revela que el β -glucano modificado tiene una capacidad inmunopotenciadora más potente que el β -glucano también in vivo. Bajo la condición en la que se administró una partícula que contenía OVA con curdlano modificado de alto peso molecular como material base (condición (18)) y la condición en la que se administró una partícula que contenía OVA con escleroglucano modificado ramificado como material base (condición (19)), también se encontró una producción más fuerte de IFN- γ , lo que muestra que el β -glucano modificado tiene una capacidad inmunopotenciadora potente independientemente del peso molecular y si es lineal o ramificado.

[Tabla 13]

55 **[0151]**

Tabla 13: Condiciones de administración in vivo de la prueba 4 de β -glucano modificado en ratones

	Sustancia administrada	Frecuencia de administración
Condición (17)	0,5 mg de partícula de curdlano que contiene OVA (23)	4
Condición (18)	0,5 mg de partícula de curdlano que contiene OVA (24)	4
Condición (19)	0,5 mg de partícula de escleroglucano que contiene OVA (25)	4

(continuación)

	Sustancia administrada	Frecuencia de administración
Condición comparativa (20)	25 mg de OVA, 0,5 mg de hidrolizado de curdlano (12)	4

[Aplicación Industrial]

- 5 **[0152]** Un inmunopotenciador de la presente invención se puede utilizar como un medicamento, particularmente como un inmunopotenciador para una vacuna para el tratamiento y/o prevención de infección, cáncer y similares.

REIVINDICACIONES

1. Un β -glucano modificado en el que β -glucano y poli(hidroxiácido) se unen covalentemente, para su uso como un medicamento, en el que el β -glucano es curdlano, paquimano, laminarano, liquenano, sizofirano, lentinano, escleroglucano, *Aureobasidium pullulans* glucano o paquimarano; el poli(hidroxiácido) es un poli(ácido láctico-co-glicólico), ácido poliláctico o ácido poliglicólico; y el β -glucano modificado tiene efecto inmunopotenciador.
- 5
2. El β -glucano modificado para su uso según la reivindicación 1, que es para su uso en un procedimiento de inmunopotenciación.
- 10
3. Una vacuna que comprende un β -glucano modificado en el que β -glucano y poli(hidroxiácido) están unidos covalentemente, en el que el β -glucano es curdlano, paquimano, laminarano, liquenano, sizofirano, prestinán, escleroglucano, *Aureobasidium pullulans* glucano o paquimarano; el poli(hidroxiácido) es un poli(ácido láctico-co-glicólico), ácido poliláctico o ácido poliglicólico; y el β -glucano modificado tiene efecto inmunopotenciador y donde la vacuna comprende además como ingrediente activo un antígeno.
- 15
4. La vacuna según la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
- 20
5. El β -glucano modificado para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, la vacuna según la reivindicación 3 o la vacuna para su uso según la reivindicación 4, donde β -glucano modificado es un polímero de tipo injerto compuesto por una cadena principal de β -glucano y una cadena lateral de poli(hidroxiácido).
- 25
6. El β -glucano modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5, la vacuna según la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o la vacuna para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en la que la proporción de segmentos de β -glucano es del 1 al 50% (p/p).
- 30
7. El β -glucano modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5-6, la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 3 y 5-6 o la vacuna para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende una partícula de un β -glucano modificado como ingrediente activo.

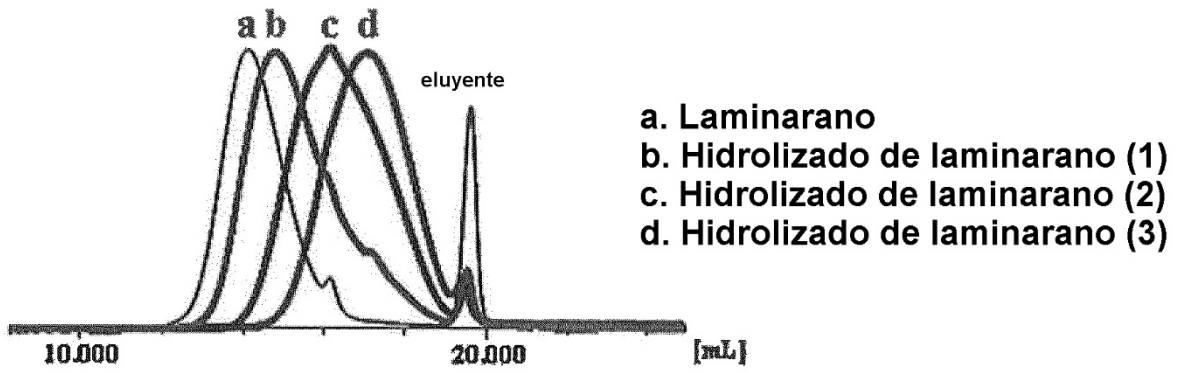


FIG. 1

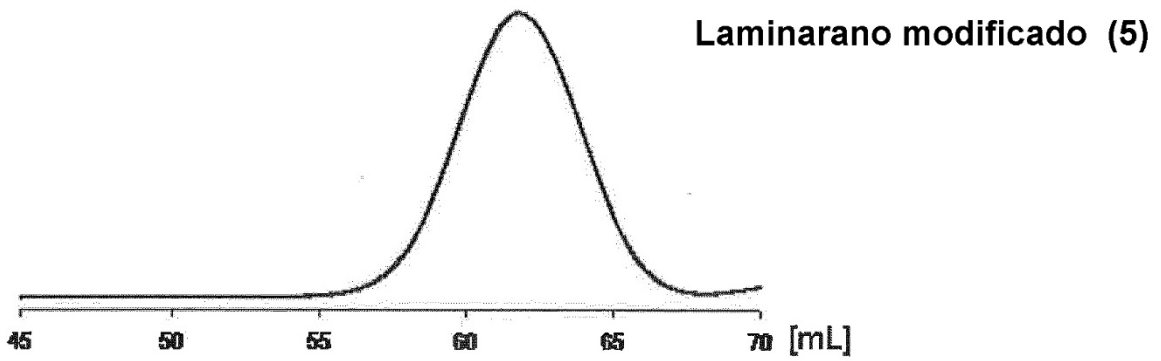


FIG. 2

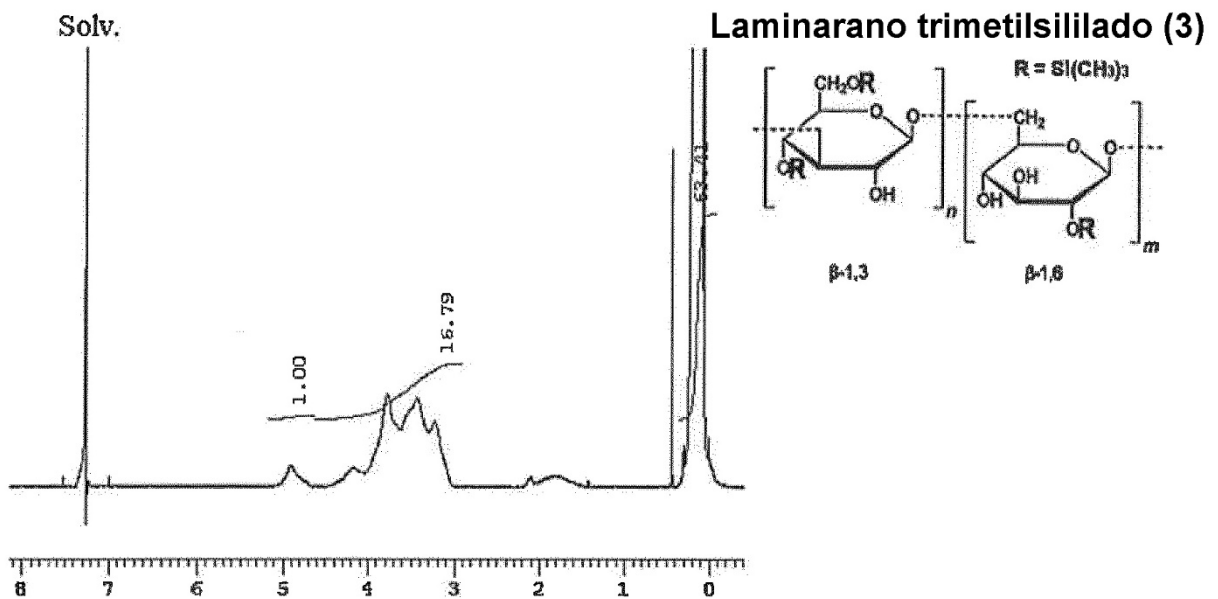


FIG. 3

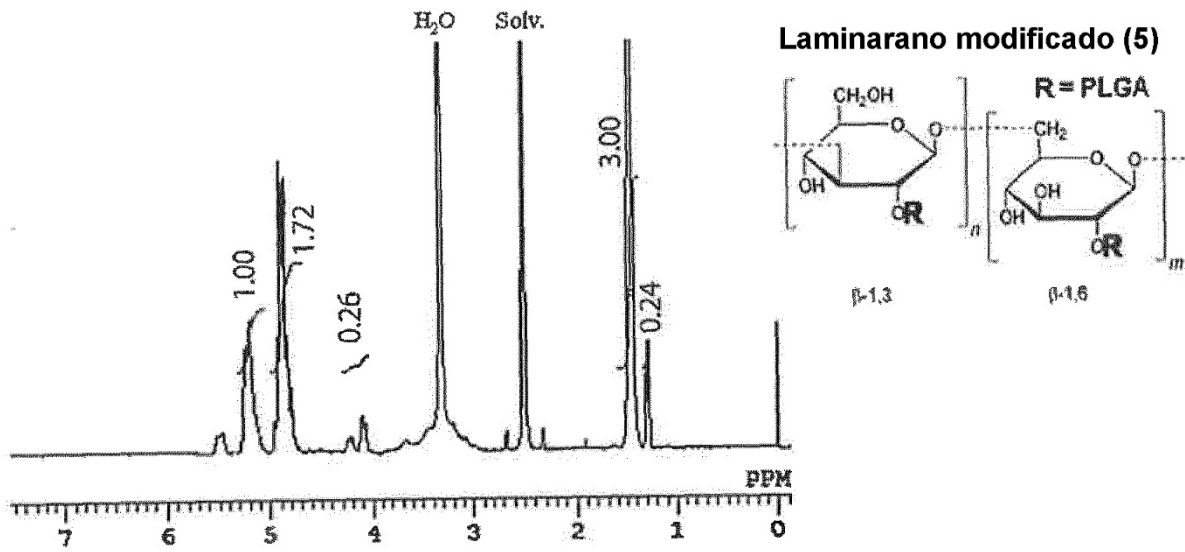


FIG. 4

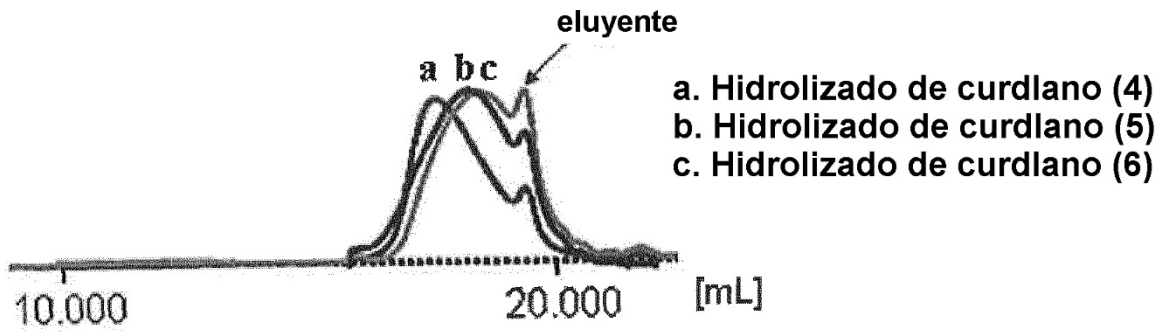


FIG. 5

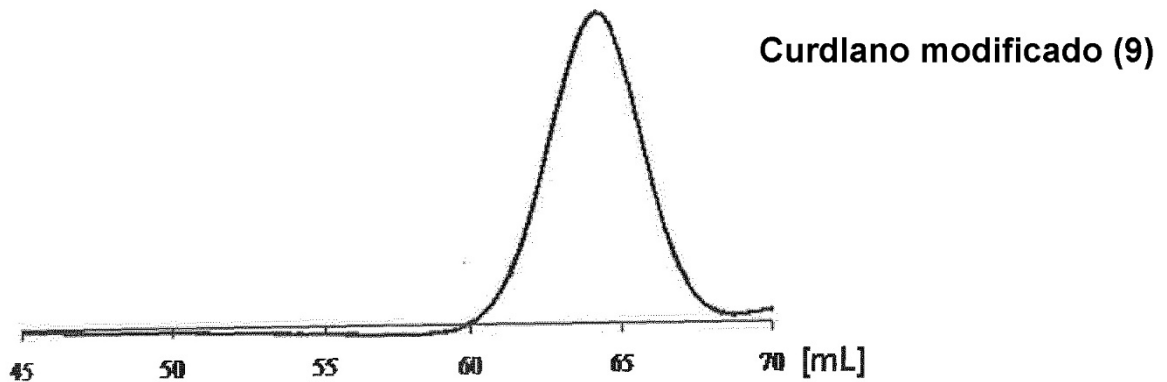


FIG. 6

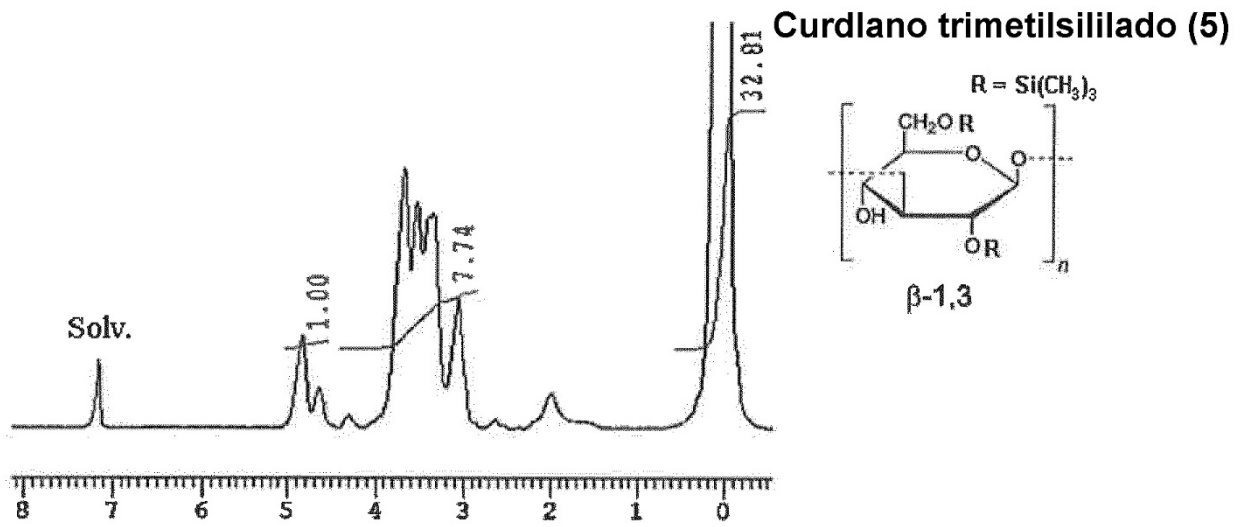


FIG. 7

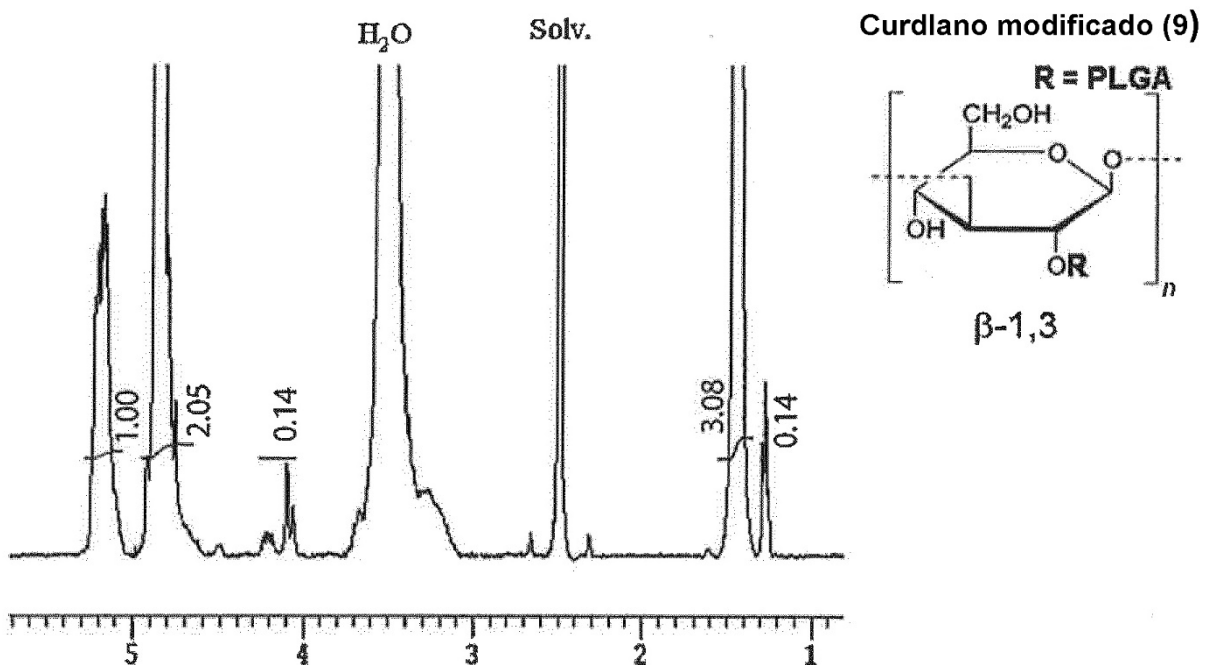


FIG. 8

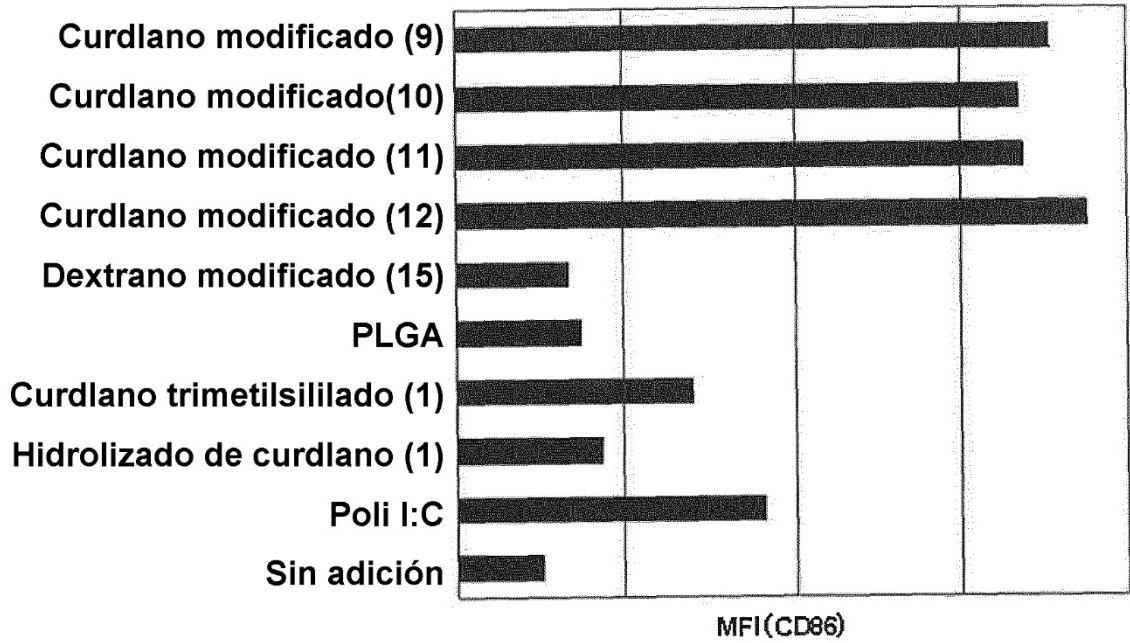


FIG. 9

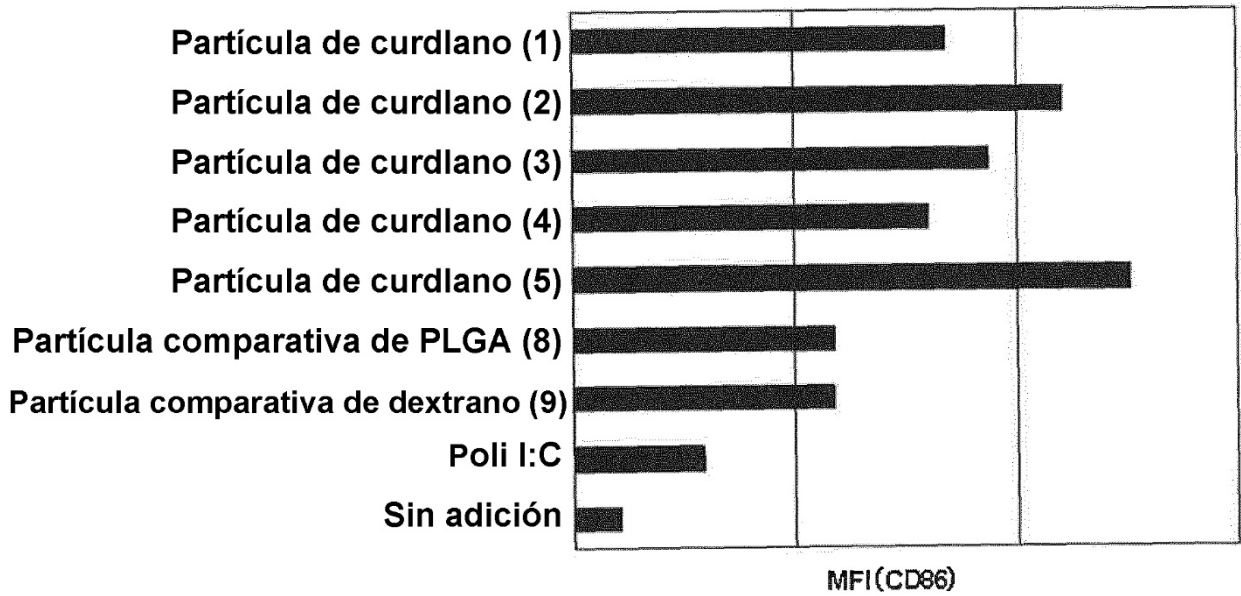


FIG. 10

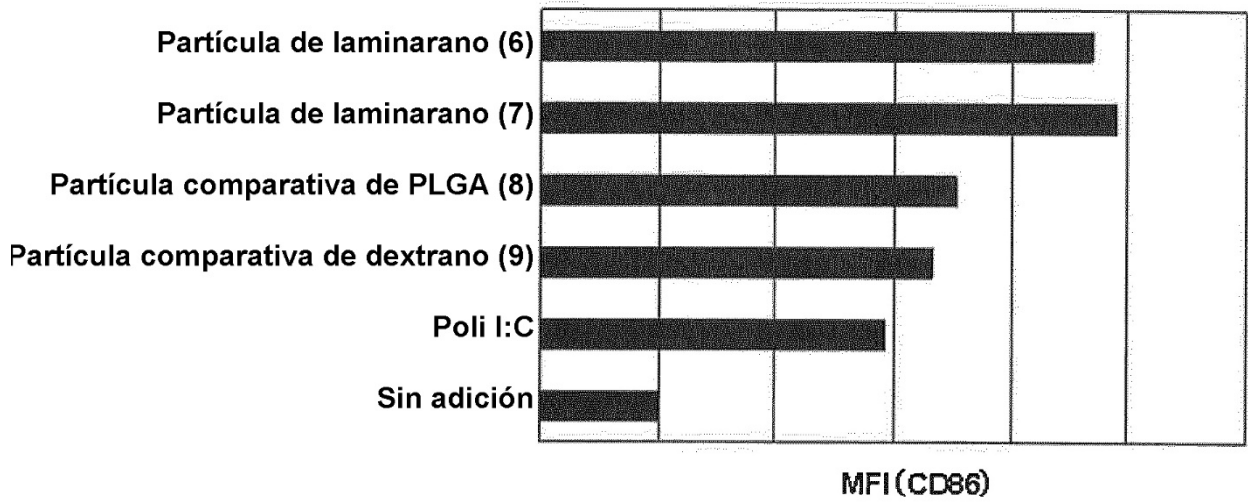


FIG. 11

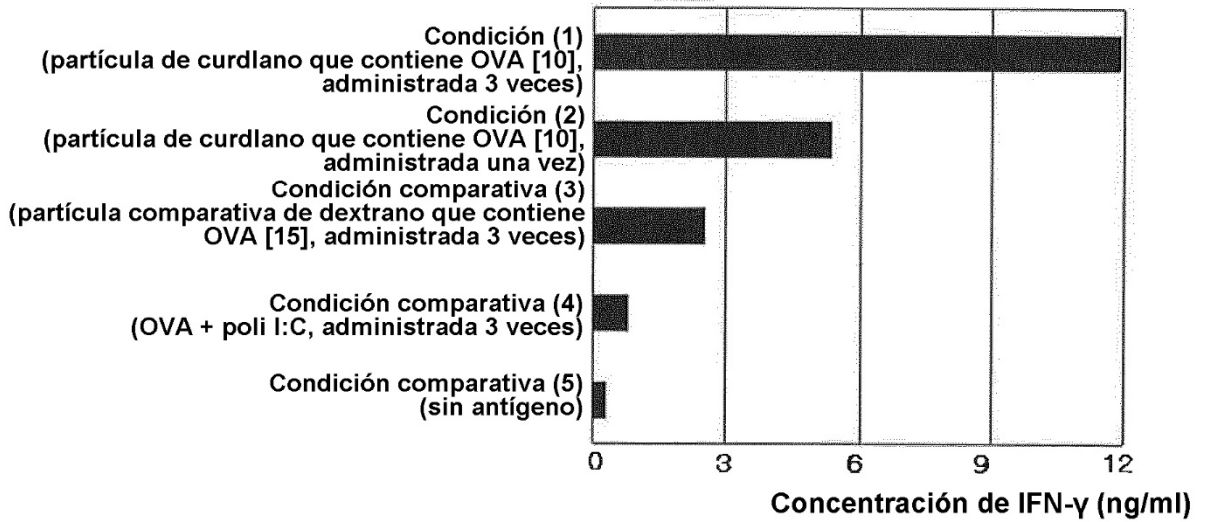


FIG. 12

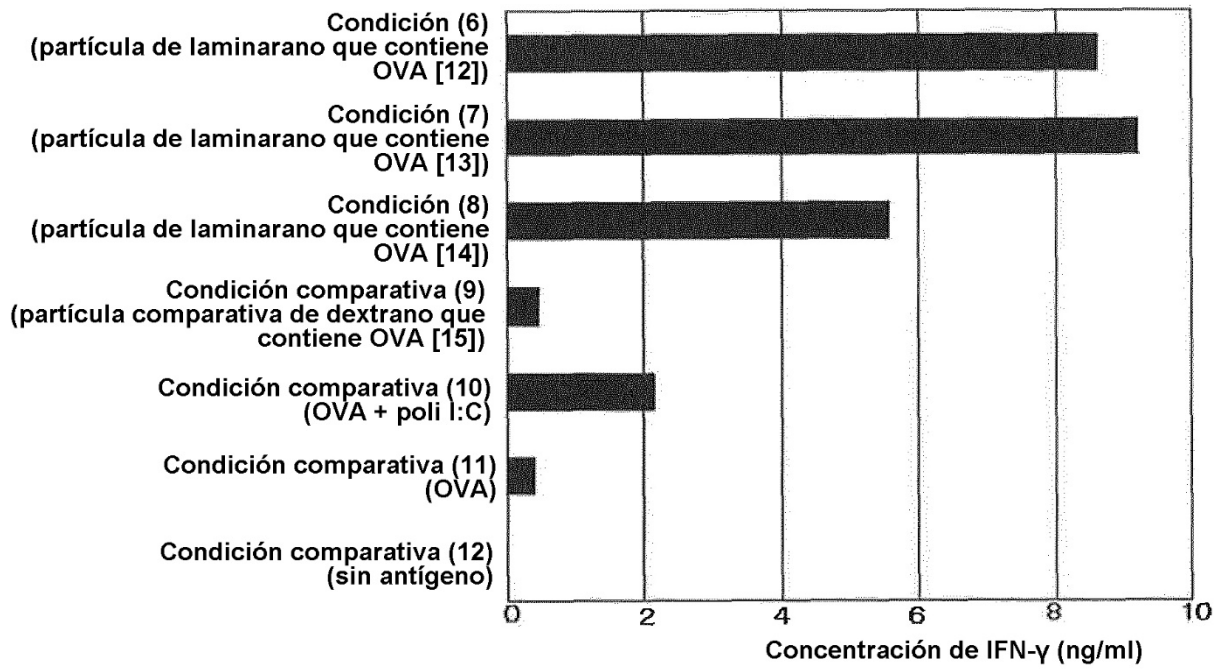


FIG. 13

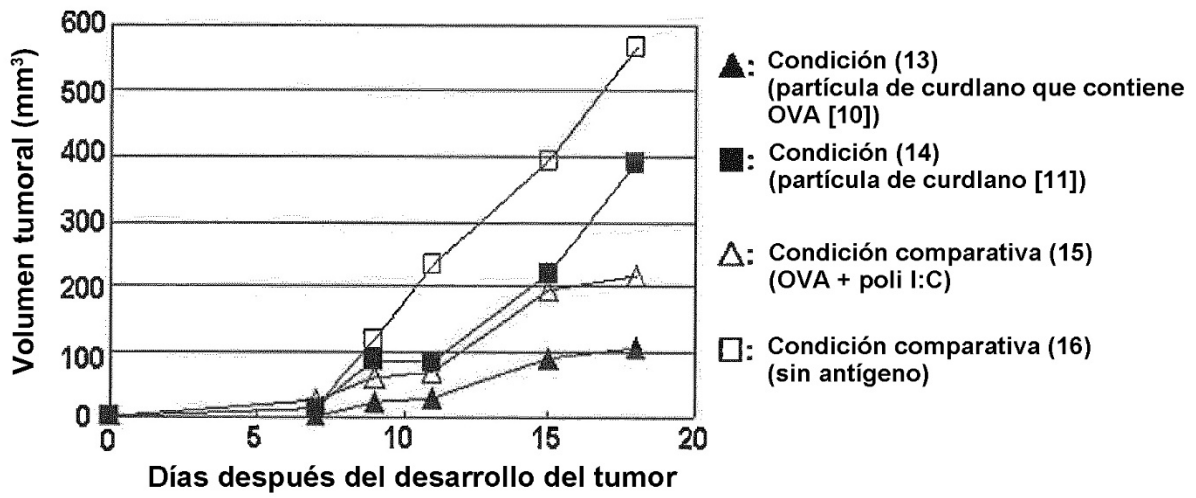


FIG. 14

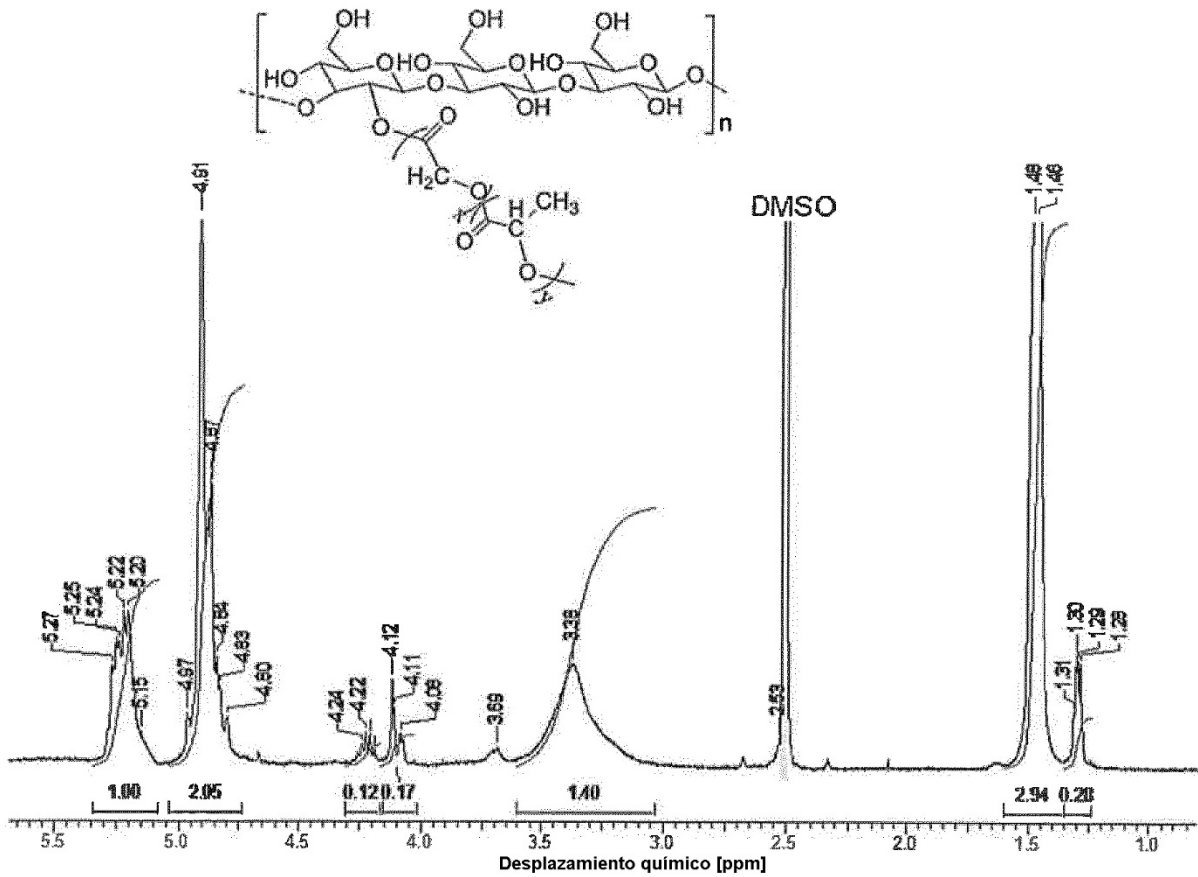


FIG. 15

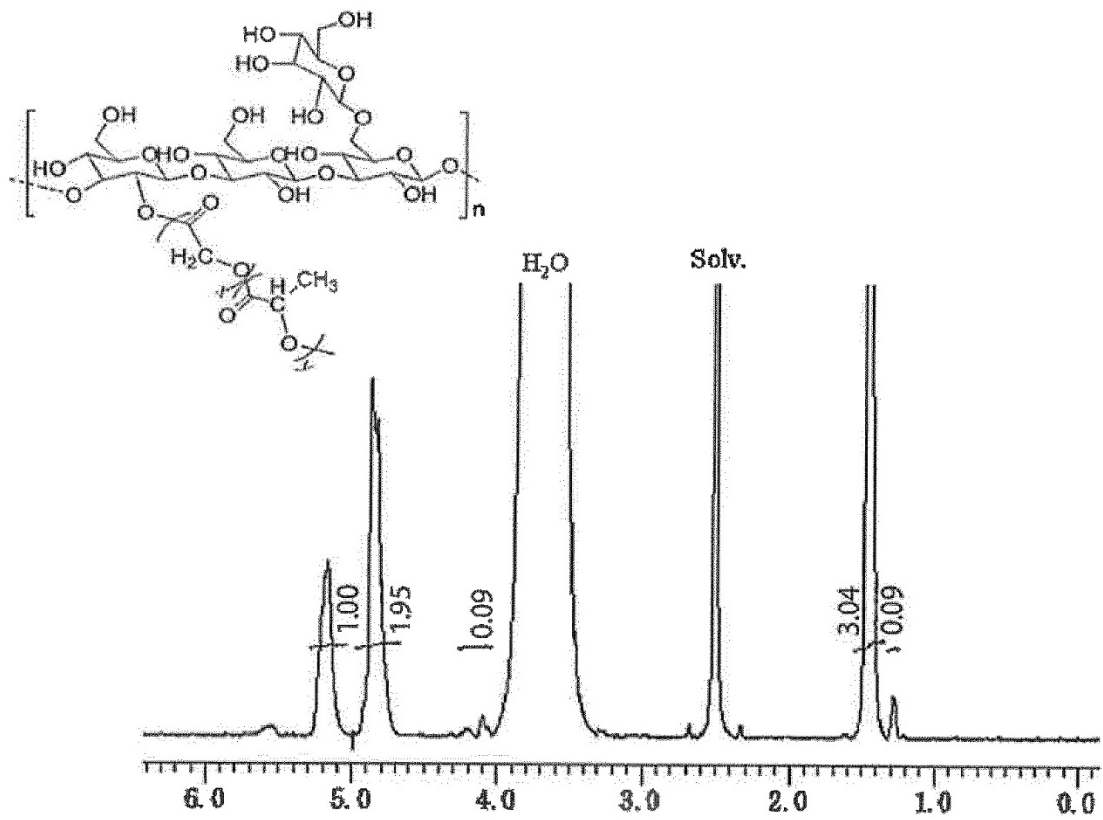


FIG. 16

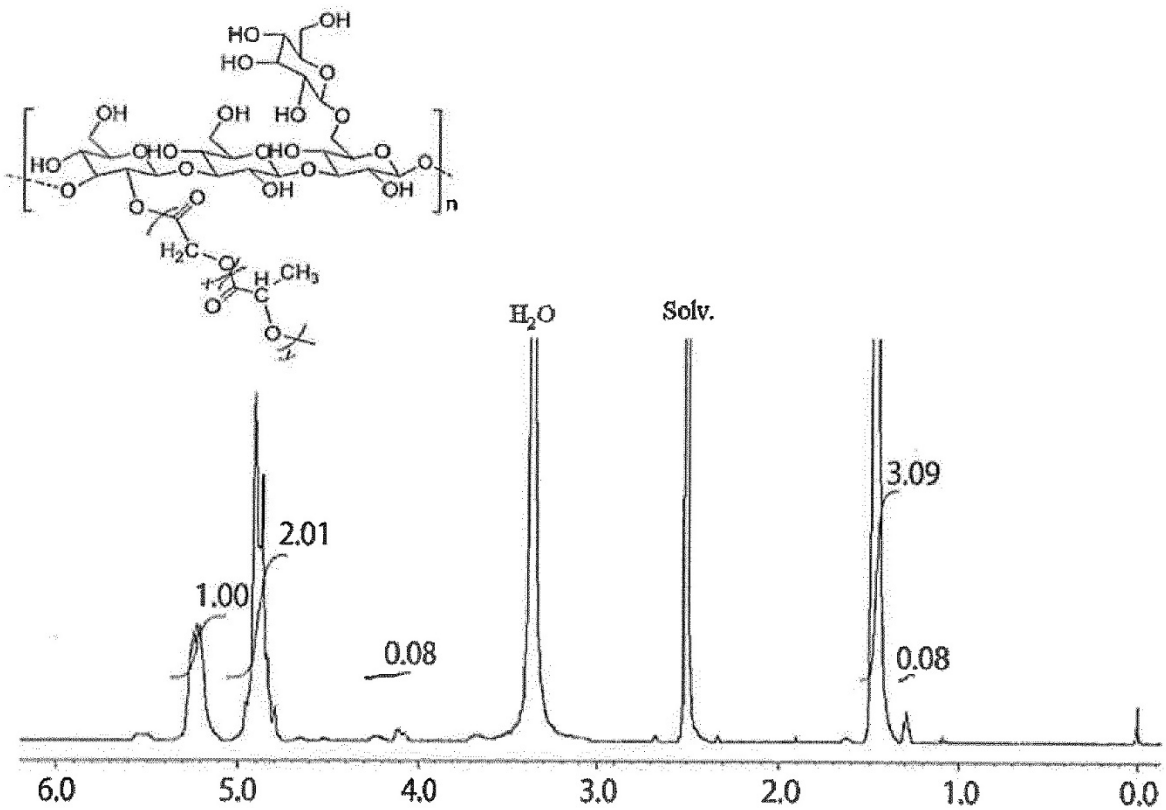


FIG. 17

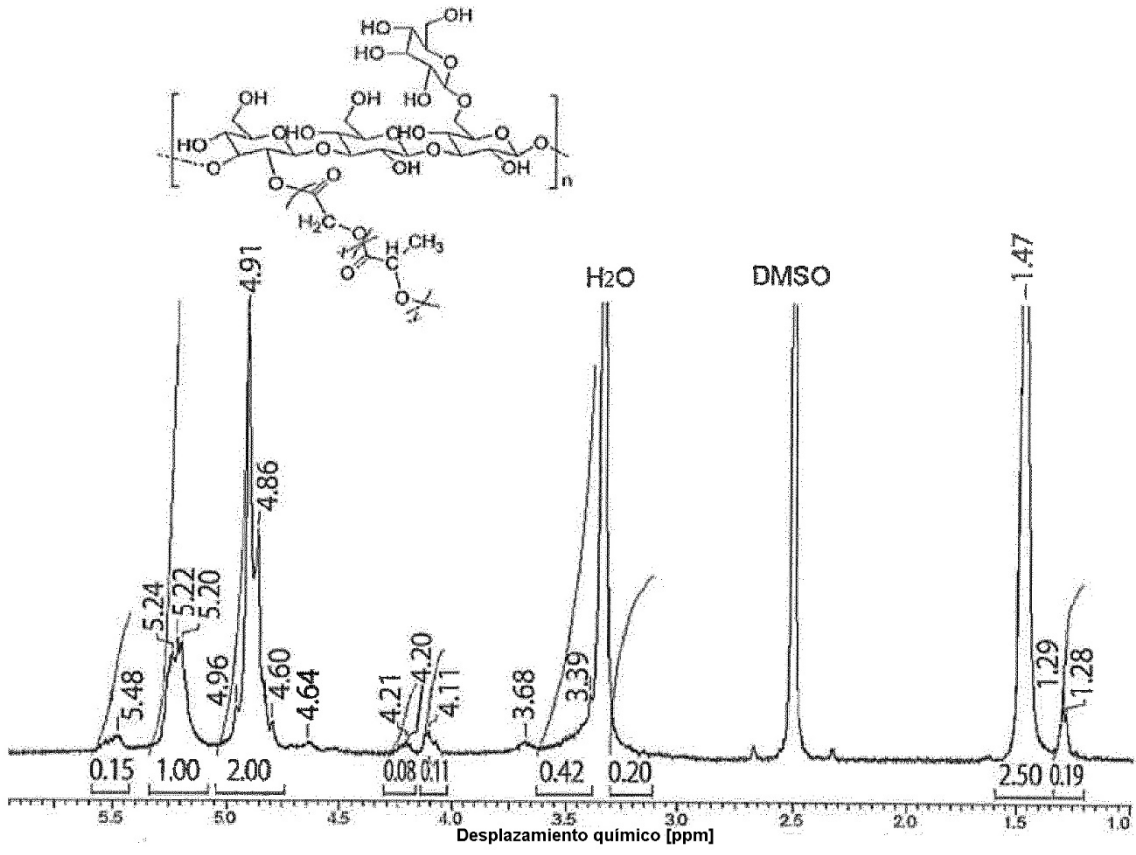


FIG. 18

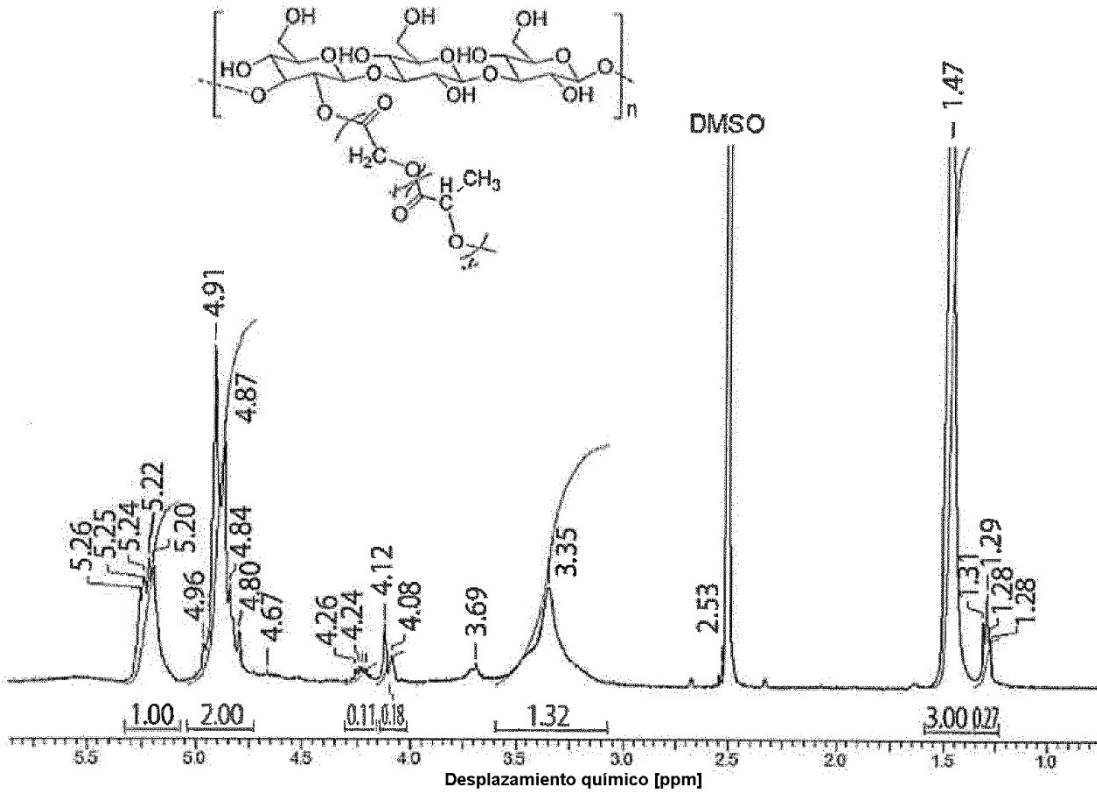


FIG. 19

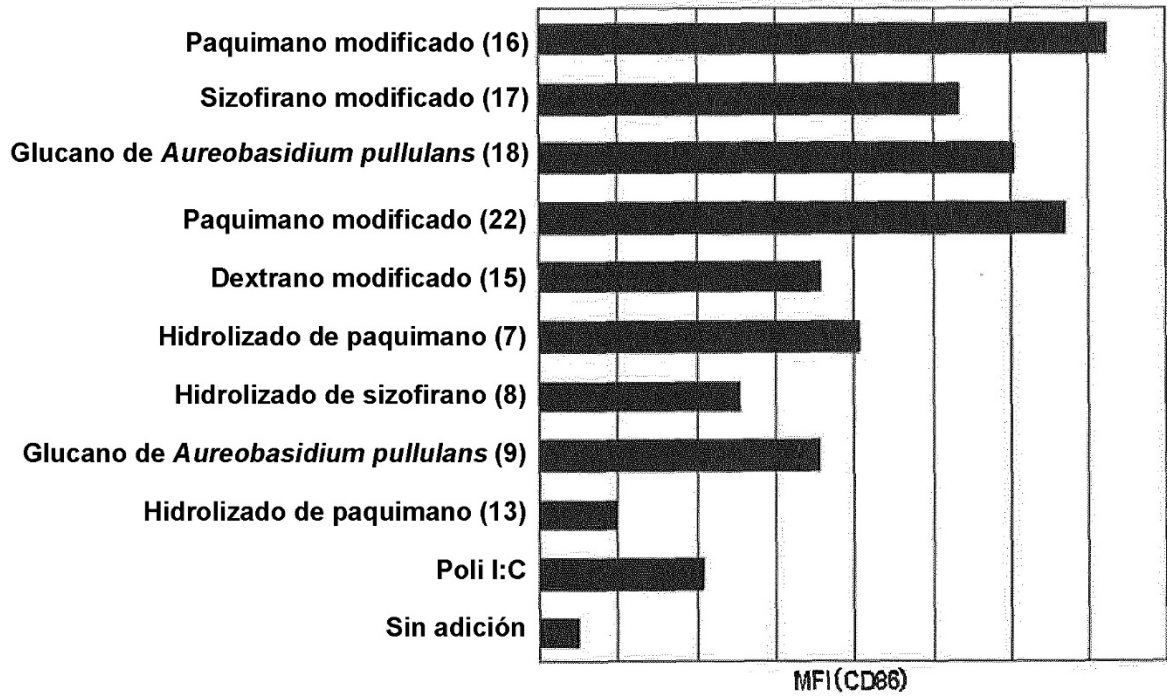


FIG. 20

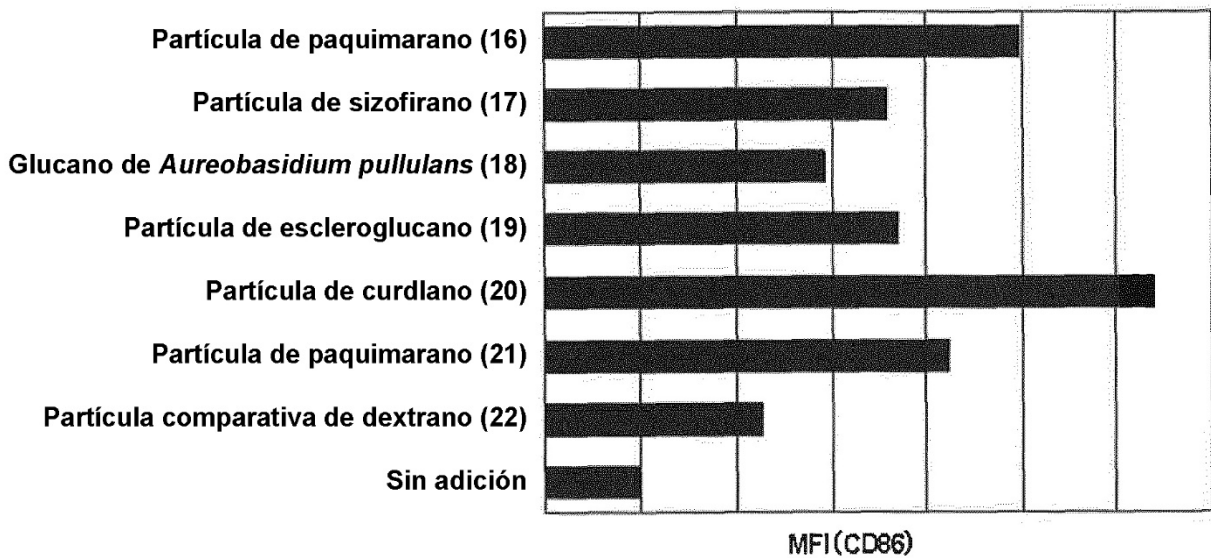


FIG. 21

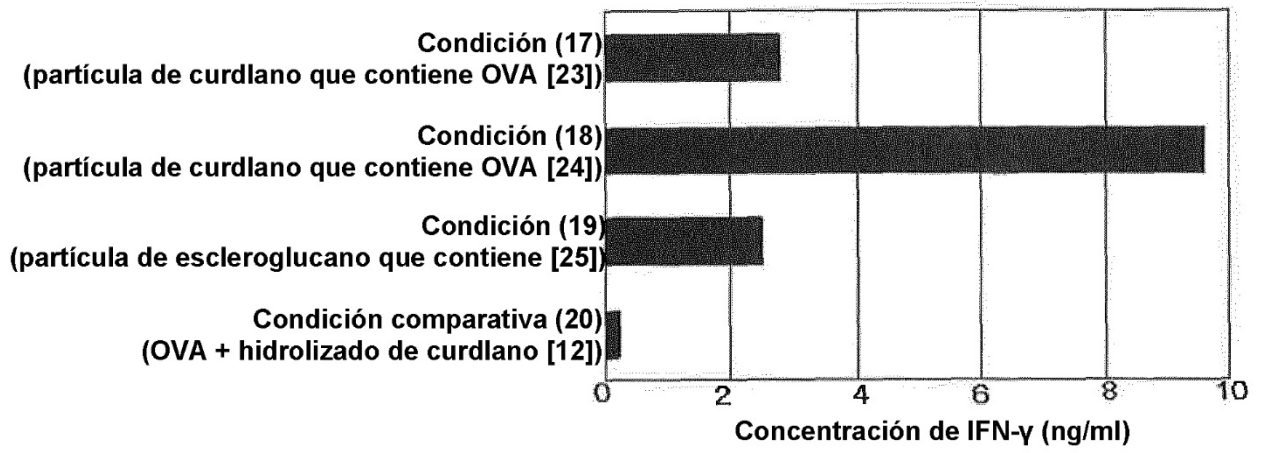


FIG. 22