

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 072**

51 Int. Cl.:

C07H 3/02 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2004 E 04703841 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **26.10.2005 EP 1587480**

54 Título: **Pirrolizidina polihidroxilada**

30 Prioridad:

23.01.2003 GB 0301554

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

16.01.2013

73 Titular/es:

**SUMMIT (WALES) LIMITED (100.0%)
91 MILTON PARK
ABINGDON OXFORDSHIRE OX14 4RY, GB**

72 Inventor/es:

**WATSON, ALISON ANN;
NASH, ROBERT JAMES y
EVINSON, EMMA LOUISA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 072 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

Pirrolizidina polihidroxilada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos de pirrolizidina polihidroxilada inmunomoduladores y a su uso en medicina. La casuarina y ciertos análogos de casuarina, como se describen en el presente documento, se pueden usar particularmente como fármacos inmunomoduladores (inmunoestimuladores o inmunosupresores).

Antecedentes de la invenciónInmunidad

10 Cuando el sistema inmune es provocado por un antígeno extraño, responde creando una respuesta protectora. Esta respuesta está caracterizada por la interacción coordinada de los sistemas inmune tanto innato como adquirido. Estos sistemas, que antes se creía que estaban separados y eran independientes, ahora se reconocen como dos partes interdependientes que cuando están integradas cumplen dos requisitos mutuamente excluyentes: velocidad (aportada por el sistema innato) y especificidad (aportada por el sistema adaptativo).

15 El sistema inmune innato sirve como la primera línea de defensa contra patógenos invasores, manteniendo el patógeno bajo control mientras maduran las respuestas adaptativas. Se desencadena en el intervalo de minutos desde la infección de un modo independiente de antígeno, respondiendo a patrones ampliamente conservados en los patógenos (aunque no es inespecífico y puede distinguir entre lo propio y patógenos). De forma crucial, también genera el medio inflamatorio y co-estimulador (denominado en ocasiones la *señal de peligro*) que potencia al sistema inmune adaptativo y lo dirige (o polariza el mismo) hacia las respuestas celulares o humorales más apropiadas para combatir el agente infeccioso (analizado con más detalle a continuación).

20 La respuesta adaptativa se vuelve eficaz a lo largo de días o semanas, pero finalmente proporciona la especificidad antigénica fina requerida para la eliminación completa del patógeno y la generación de memoria inmunológica. Principalmente está mediada por células T y B que se han sometido a redistribución de genes de línea germinal y están caracterizadas por una exquisita especificidad y memoria a largo plazo. Sin embargo, también implica el reclutamiento de elementos del sistema inmune innato, que incluyen fagocitos profesionales (macrófagos, neutrófilos, etc.) y granulocitos (basófilos, eosinófilos, etc.) que engullen bacterias e incluso parásitos protozoarios relativamente grandes. Una vez que ha madurado una respuesta inmune adaptativa, la exposición posterior al patógeno da como resultado su rápida eliminación (habitualmente antes de que se manifiesten los síntomas de infección) debido a que se han generado células de memoria altamente específicas que se activan rápidamente después de la exposición posterior a su antígeno afín.

Interdependencia de las respuestas innata y adaptativa

35 Ahora se cree que los acontecimientos más tempranos que siguen a la invasión por patógeno se efectúan mediante componentes celulares del sistema inmune innato. La respuesta se inicia cuando los macrófagos y las células dendríticas (DC) tisulares residentes se encuentran con el patógeno y se activan mediante señales generadas por interacción entre receptores de reconocimiento de patrón (PRR) y los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) compartidos por grandes grupos de microorganismos. Los macrófagos y las DC activados se estimulan para liberar diversas citocinas (que incluyen las quimiocinas IL-8, MIP-1 α y MIP-1 β), que constituyen la "señal de peligro" y desencadenan un flujo de entrada de linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, células dendríticas inmaduras a los tejidos.

40 Cargadas con antígeno, después, las DC activadas migran a los ganglios linfáticos. Una vez ahí, activan las células inmunes de la respuesta adaptativa (principalmente células B y T vírgenes) actuando como células presentadoras de antígenos (APC). Después, las células activadas migran a los sitios de infección (guiadas por la "señal de peligro") y una vez ahí amplifican adicionalmente la respuesta mediante el reclutamiento de células del sistema inmune innato (que incluyen eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos NK y granulocitos). Este tránsito celular está organizado por una gran serie de citocinas (particularmente las del subgrupo de quimiocinas) e implica a células inmunes de muchos tipos y fuentes tisulares diferentes (para una revisión, véase Luster (2002), Current Opinion in Immunology 14: 129-135).

Polarización de la respuesta inmune adaptativa

50 La respuesta inmune adaptativa se efectúa principalmente a través de dos divisiones independientes: inmunidad mediada por células (tipo 1) e inmunidad mediada por anticuerpos o humoral (tipo 2).

La inmunidad de tipo 1 implica la activación de linfocitos T que actúan sobre células infectadas que llevan antígenos extraños o estimulan a otras células para que actúen sobre células infectadas. Esta rama del sistema inmune, por lo tanto, contiene y destruye de forma eficaz células que son cancerosas o están infectadas por patógenos (particularmente virus). La inmunidad de tipo 2 implica la generación de anticuerpos contra antígenos extraños

mediante linfocitos B. Esta rama mediada por anticuerpos del sistema inmune ataca y neutraliza de forma eficaz los antígenos extraños extracelulares.

Ambas divisiones del sistema inmune son importantes en la lucha contra la enfermedad y existe un entendimiento cada vez mayor de que el tipo de respuesta inmune es tan importante como su intensidad o su duración. Además, ya que las respuestas de tipo 1 y de tipo 2 no son de forma necesaria mutuamente excluyentes (en muchas circunstancias, una respuesta inmune eficaz requiere que ambas tengan lugar en paralelo), el *equilibrio* de la respuesta de tipo 1/tipo 2 (también denominada la *proporción de respuesta/equilibrio de Th1:Th2* por referencia a los distintos subconjuntos de citocinas y de células efectoras implicados en la regulación de cada respuesta –véase más adelante) pueden desempeñar también un papel en la determinación de la eficacia (y las repercusiones) de la defensa inmune.

En muchas circunstancias, la respuesta inmune se desvía intensamente hacia una respuesta de tipo 1 o de tipo 2 pronto después de la exposición a antígeno. El mecanismo de esta desviación o polarización a tipo 1/tipo 2 todavía no está completamente comprendido, pero se sabe que implica un complejo sistema de mensajeros químicos mediados por células (citocinas y particularmente quimiocinas) en los que se determina la polarización (o equilibrio) de tipo 1/tipo 2, al menos en parte, por la naturaleza de la interacción inicial de PRR-PAMP cuando las DC y los macrófagos del sistema inmune innato se estimulan por primera vez y posteriormente por el medio de citocinas en el que tiene lugar la preparación con antígenos de células T cooperadoras vírgenes.

Parece que dos citocinas en particular desempeñan papeles tempranos en la determinación de la ruta de la respuesta inmune. La interleucina 12 (IL-12), secretada por macrófagos, dirige la respuesta de tipo 1 estimulando la diferenciación de células Th1, las células cooperadoras que supervisan la respuesta de tipo 1. Otra citocina de macrófagos, la interleucina 10 (IL-10), inhibe esta respuesta, dirigiendo en su lugar una respuesta de tipo 2.

Las respuestas de tipo 1 y tipo 2 pueden distinguirse, entre otras cosas, basándose en ciertos cambios fenotípicos relacionados con la preparación y polarización posterior de células T cooperadoras vírgenes. Estos cambios fenotípicos están caracterizados, al menos en parte, por la naturaleza de las citocinas secretadas por las células T cooperadoras polarizadas.

Las células Th1 producen las denominadas *citocinas Th1*, que incluyen uno o más de TNF, IL-1, IL-2, IFN-gamma, IL-12 y/o IL-18. Las citocinas Th1 están implicadas en la activación de macrófagos y las células Th1 organizan las respuestas de tipo 1. Por el contrario, las células Th2 producen las denominadas *citocinas Th2*, que incluyen uno o más de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Las citocinas Th2 promueven la producción de diversos anticuerpos y pueden suprimir la respuesta de tipo 1.

La implicación de las células y citocinas Th1 y Th2 en la polarización de la respuesta inmune de tipo 1:tipo 2 ha dado lugar a que se usen las expresiones *respuesta de Th1* y *respuesta de Th2* para definir las respuestas inmunes de tipo 1 y de tipo 2, respectivamente. Por tanto, estas expresiones se usan de forma intercambiable en el presente documento.

Existe un entendimiento cada vez mayor de que el tipo de respuesta inmune es tan importante en la terapia y profilaxis como su intensidad o su duración. Por ejemplo, un exceso de respuesta de Th1 puede dar como resultado enfermedad autoinmune, respuestas inflamatorias inapropiadas y rechazo de trasplante. Un exceso de respuesta de Th2 puede conducir a alergias y asma. Además, una alteración en la proporción de Th1:Th2 es sintomática de muchas enfermedades y trastornos inmunológicos y ahora es una prioridad el desarrollo de procedimientos para alterar la proporción de Th1:Th2.

Alcaloides

El término *alcaloide* se usa en el presente documento en sentido estricto para definir cualquier compuesto nitrogenado orgánico básico que aparezca de forma natural en un organismo. El término *alcaloide* se usa en el presente documento también en el sentido estricto para definir una agrupación más amplia de compuestos que incluye no solamente los alcaloides de origen natural, sino también sus análogos y derivados sintéticos y semi-sintéticos.

Los alcaloides más conocidos son productos fitoquímicos presentes como metabolitos secundarios en tejidos vegetales (donde pueden desempeñar un papel en la defensa), pero algunos aparecen como metabolitos secundarios en los tejidos de animales, microorganismos y hongos. Existen pruebas cada vez mayores de que las técnicas convencionales para explorar cultivos microbianos son inapropiadas para detectar muchas clases de alcaloides (particularmente alcaloides altamente polares, véase más adelante) y de que se demostrará que los microbios (que incluyen bacterias y hongos, particularmente los representantes filamentosos) son una fuente importante de alcaloides cuando las técnicas de exploración se hagan más sofisticadas.

Estructuralmente, los alcaloides muestran una gran diversidad. Muchos alcaloides son moléculas pequeñas con pesos moleculares por debajo de 250 dalton. Los esqueletos pueden derivarse de aminoácidos, aunque algunos se derivan de otros grupos (tales como esteroides). Otros se pueden considerar análogos de azúcar. Se hace evidente (véase Watson y col. (2001) *Phytochemistry* 56: 265-295) que las fracciones solubles en agua de plantas

medicinales y cultivos microbianos contienen muchos alcaloides polares novedosos interesantes, que incluyen muchos análogos de hidratos de carbono. Tales análogos incluyen un número que crece rápidamente de alcaloides polihidroxilados.

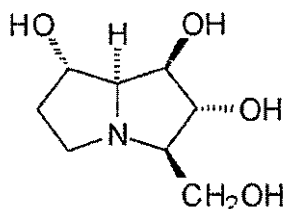
5 La mayoría de los alcaloides se clasifican estructuralmente basándose en la configuración del N-heterociclo. Se exponen ejemplos de algunos alcaloides importantes y sus estructuras en Kutchan (1995) *The Plant Cell* 7: 1059-1070.

Watson y col. (2001) *Phytochemistry* 56: 265-295 han clasificado una variedad exhaustiva de alcaloides polihidroxilados entre otras cosas como alcaloides de piperidina, pirrolina, pirrolidina, pirrolizidina, indolizidina y nortropanos (véase las Figuras 1-7 de Watson y col. (2001).

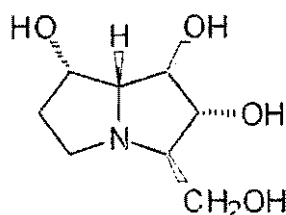
10 Watson y col. (2001), en el mismo lugar también muestra que una clasificación funcional de al menos algunos alcaloides es posible basándose en su perfil inhibitorio de glucosidasa: muchos alcaloides polihidroxilados son inhibidores de glucosidasa potentes y altamente selectivos. Estos alcaloides pueden imitar el número, la posición y la configuración de los grupos hidroxilo presentes en restos piranosilo o furanosilo y unirse de este modo al sitio activo de una glucosidasa afín, inhibiendo la misma de este modo. Esta área se revisa en Legler (1990) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 48: 319-384 y en Asano y col. (1995) *J. Med. Chem.* 38: 2349-2356.

20 Hasta ahora se ha reconocido que muchos alcaloides son farmacológicamente activos y los seres humanos han estado usando alcaloides (normalmente en forma de extractos vegetales) como venenos, estupefacientes, estimulantes y medicinas durante miles de años. Las aplicaciones terapéuticas de los alcaloides polihidroxilados se han revisado de forma exhaustiva en Watson y col. (2001), en el mismo lugar: las aplicaciones incluyen terapia contra el cáncer, inmunestimulación, el tratamiento de diabetes, el tratamiento de infecciones (especialmente infecciones víricas), la terapia de tesaurismosis lisosómicas de glucoesfingolípidos y el tratamiento de trastornos autoinmunes (tales como artritis y esclerosis).

25 Se sabe que los análogos de nitrógeno mono- y bi-cíclicos tanto naturales como sintéticos de los hidratos de carbono tienen un potencial como agentes quimioterapéuticos. La alexina (1) y la australina (2) fueron los primeros alcaloides de pirrolizidina en aislarse con un sustituyente de carbono en C-3, en lugar de los sustituyentes de C-1 más comunes característicos de la familia de necina de pirrolizidinas.

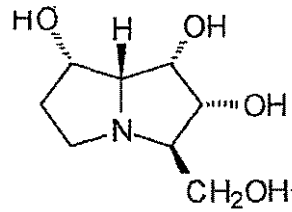


Alexina (1)



Australina (2)

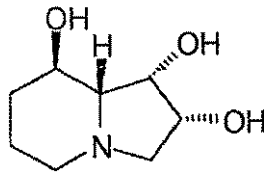
30 Las alexinas aparecen en todas las especies del género *Alexa* y también en las especies relacionadas *castanospermum australe*. Los estereoisómeros de alexina, que incluyen 1,7a-diepilexina (3), también se han aislado (Nash y col. (1990) *Phytochemistry* (29) 111) y sintetizado (Choi y col. (1991) *Tetrahedron Letters* (32) 5517 y Denmark y Cottell (2001) *J. Org. Chem.* (66) 4276-4284).



1,7a-diepilexina (3)

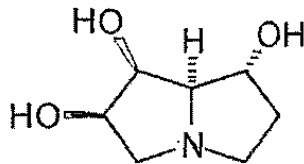
Debido a las propiedades antivíricas *in vitro* débiles descritas de una 7,7a-diepilexina (definida posteriormente como 1,7a-diepilexina), ha habido cierto interés en el aislamiento de los productos naturales y la síntesis de análogos.

- 5 Como un alcaloide de indolizidina (y de este modo estructuralmente distinto de las alexinas de pirrolizidina), la swainsonina (4) es un inhibidor potente y específico de α -manosidasa y se describe que tiene potencial como agente antimetastásico, antiproliferativo de tumor e inmunorregulador (véase, por ejemplo, los documentos US5650413, WO00/37465, WO93/09117).

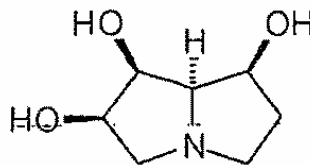


Swainsonina (4)

- 10 Se ha estudiado el efecto de la variación en el tamaño del anillo de seis miembros de la swainsonina sobre su actividad inhibidora de glucosidasa: se han sintetizado derivados de pirrolizidina (denominadas "swainsoninas de anillo contraído"). Sin embargo, se mostró que estos derivados sintéticos (1S, 2R, 7R, 7aR)-1,2,7-trihidroxipirrolizidina (5) y el epímero 7S (6)) tienen una actividad inhibidora mucho más débil con respecto a la propia swainsonina (véase el documento US5075457).



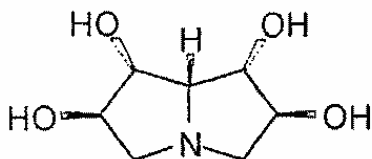
1S, 2R, 7R, 7aR)-1,2,7-trihidroxipirrolizidina (5)



epímero 7S (6)

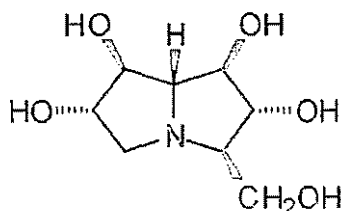
15

Otro compuesto, $1\alpha,2\alpha,6\alpha,7\alpha,7\alpha\beta$ -1,2,6,7-tetrahidroxipirrolizidina (7) es un análogo de 1,8-diepiswainsonina y se describe como un inhibidor "útil" de enzimas glucosidasa en el documento EP0417059.



1 α ,2 α ,6 α ,7 α ,7 $\alpha\beta$ -1,2,6,7-tetrahydroxipirrolizidina (7)

La casuarina, (1R,2R,3R,6S,7S,7aR)-3-(hidroximetil)-1,2,6,7-tetrahydroxipirrolizidina (8) es un alcaloide de pirrolizidina bicíclico altamente oxigenado que se puede considerar un análogo más altamente oxigenado de la 1,7a-diepilexina (mostrada en 3) o como un análogo sustituido con hidroximetilo en C(3) de la 1 α ,2 α ,6 α ,7 α ,7 $\alpha\beta$ -1,2,6,7-tetrahydroxipirrolizidina (mostrada en 7).

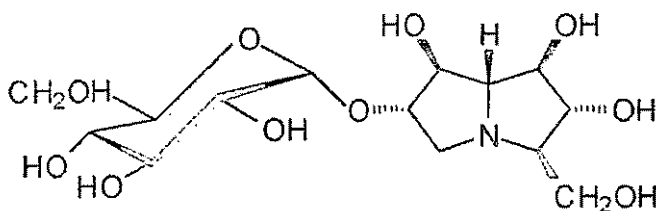


Casuarina (8)

La casuarina se puede aislar de varias fuentes botánicas, que incluyen la corteza de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae), las hojas y la corteza de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) y *Syzygium guineense* (Myrtaceae) (véase, por ejemplo, Nash y col. (1994) Tetrahedron Letters (35) 7849-7852). Los epímeros de casuarina y probablemente la propia casuarina se pueden sintetizar mediante ciclación inducida por teleniuro de hidrógeno sódico de azidodimesilatos (Bell y col. (1997) Tetrahedron Letters (38) 5869-5872).

La madera, la corteza y las hojas de *Casuarina equisetifolia* se han reivindicado como útiles contra diarrea, disentería y cólicos (Chopra y col. (1956) Glossary of Indian Medicinal Plants, Council of Scientific and Industrial Research (India), New Delhi, pág. 55) y una muestra de corteza se ha prescrito recientemente en Samoa Occidental para el tratamiento de cáncer de mama. Se ha descrito que una planta africana que contiene casuarina (identificada como *Syzygium guineense*) es beneficiosa en el tratamiento de pacientes con SIDA (véase Wormald y col. (1996) Carbohydrate Letters (2) 169-174).

El casuarina-6- α -glucósido (casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 9) se ha aislado también de la corteza y las hojas de *Eugenia jambolana* (Wormald y col. (1996) Carbohydrate Letters (2) 169-174).



Casuarina-6- α -D-glucopiranososa (9)

La *Eugenia jambolana* es un árbol bien conocido en India por el valor terapéutico de sus semillas, hojas y frutos contra diabetes e infecciones bacterianas. Se ha demostrado que sus frutos reducen los niveles de azúcar en sangre en seres humanos y se reivindica que los extractos acuosos de la corteza afectan a la glucogenolisis y el almacenamiento de glucógeno en animales (Wormald y col. (1996) Carbohydrate Letters (2) 169-174).

25 Células dendríticas y su usos inmunoterapéuticos

(a) Introducción

Las células dendríticas (DC) son una población celular heterogénea con morfología distintiva y una distribución tisular extensa (véase Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9: 271-296). Desempeñan un papel importante en la

presentación de antígenos, la captura y procesamiento de antígenos en péptidos y después la presentación de los mismos (junto con componentes del MHC) hasta dar células T. Después, la activación de células T puede estar mediada por la expresión de moléculas de superficie celular importantes, tales como altos niveles de moléculas de MHC de clase I y II, moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras.

- 5 Por lo tanto, las células dendríticas actúan como células presentadoras de antígenos (APC) altamente especializadas: sirviendo como "adyuvantes de la naturaleza", potencian la inmunidad dependiente de células T adaptativa y activan los linfocitos citolíticos naturales (NK y NKT) del sistema inmune innato. Por lo tanto, las células dendríticas desempeñan un papel regulador fundamental e importante en la magnitud, calidad y memoria de la respuesta inmune. Como resultado, ahora existe un interés cada vez mayor en el uso de células dendríticas en
10 diversas intervenciones inmunomoduladoras, que se describen con más detalle más adelante.

Las células dendríticas se pueden clasificar en diferentes subconjuntos, entre otras cosas, basándose en su estado de maduración (maduras o inmaduras) y su origen de desarrollo celular (ontogenia). Parece que cada uno de estos subconjuntos desempeña papeles distintos *in vivo*, como se describe más adelante.

(b) Maduración de células dendríticas

- 15 Las DC inmaduras (o en reposo) se localizan en tejido no linfoide, tal como la piel y las mucosas, son altamente fagocíticas e internalizan fácilmente antígenos solubles y particulados. Solamente cuando tales DC inmaduras cargadas con antígenos experimentan estímulos inflamatorios (denominados *estímulos de maduración*), se someten a un proceso de maduración que transforma las mismas de células fagocíticas y migratorias a estimuladores no fagocíticos, altamente eficaces de células T vírgenes.
- 20 Las DC inmaduras se caracterizan por un gran contenido de MHC II intracelular en forma de MIIC, la expresión de CD1a, endocitosis activa para ciertos particulados y proteínas, presencia de FcγR y fagocitos activa, sensibilización de células T deficiente *in vitro*, pocas moléculas adhesivas y coestimuladoras o ausentes (CD40/54/58/80/86), poco CD25 o ausente, CD83, p55, DEC-205, antígeno 2A1, capacidad de respuesta a GM-CSF, pero no a M-CSF y G-CSF y una sensibilidad a IL-10 que inhibe la maduración.
- 25 Después de la maduración, las DC maduras, cargadas con antígeno y capaces de preparar células T, migran desde los tejidos no linfoides a los ganglios linfáticos o el bazo, donde procesan la carga de antígenos y presentan la misma a las células T CD4⁺ vírgenes residentes y células T citotóxicas CD8⁺. Esta última interacción genera CTL, el brazo celular de la respuesta inmune adaptativa y estas células eliminan células infectadas víricamente y células tumorales. Las células T CD4⁺ vírgenes se diferencian en células T cooperadoras de memoria, que respaldan la
30 diferenciación y expansión de CTL CD8⁺ y células B. Por tanto, las células T cooperadoras ejercen una actividad antitumoral indirectamente mediante la activación de importantes células efectoras, tales como macrófagos y CLT.

Teniendo activadas las células T de este modo, las DC maduras experimentan apoptosis en el intervalo de 9-10 días.

- 35 Las células DC maduras se caracterizan morfológicamente por motilidad y la presencia de numerosas protuberancias (velos o dendritas). Son competentes para captura y presentación de antígenos (mostrando alta expresión de MHC de clase I y II) y expresan una amplia variedad de moléculas implicadas en la unión y coestimulación de células B, (por ejemplo, CD40,CD54/ICAM-1,CD58/LFA-3, CD80/B7-1 y CD86/B7-2) así como diversas citocinas (que incluyen IL-12). Son fenonormalmente estables: no existe reversión/conversión a macrófagos o linfocitos.
- 40 Por tanto, las DC *maduras* desempeñan un papel importante en la activación de células T y la inmunidad mediada por células. Por el contrario, las DC *inmaduras* están implicadas en la regulación y el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (induciendo anergia de células T con especificidad de antígeno).

(c) Subconjuntos ontogénicos de células dendríticas

- 45 Las células dendríticas no están representadas por un único tipo celular, sino que comprenden más bien una colección heterogénea de diferentes clases de células, cada una con una ontogenia distinta. Se han descrito al menos tres rutas de desarrollo diferentes, emergiendo cada una de progenitores únicos y estando dirigida por combinaciones particulares de citocinas hasta subconjuntos de DC con funciones distintas y especializadas.

- Actualmente se piensa que los progenitores/precusores de DC más tempranos comunes a todas las DC se originan en la médula ósea. Estos progenitores primitivos son CD34⁺ y se liberan de la médula ósea para circular a través
50 tanto de la sangre como de los órganos linfoides.

Una vez liberados de la médula ósea, los progenitores de DC CD34⁺ primitivos se someten a diversas señales estimuladoras. Estas señales pueden dirigir los progenitores a lo largo de una de al menos tres rutas diferentes, difiriendo cada una con respecto a los estadios intermedios, requisitos de citocinas, expresión de marcador de superficie y función biológica.

- Las *DC linfoides* son un subconjunto de DC que están ligadas estrechamente al linaje de linfocitos. Este linaje está caracterizado por la ausencia de antígenos de superficie CD11b, CD13, CD14 y CD33. Las DC linfoides comparten ascendencia con células T y linfocitos citolíticos naturales (NK), estando localizados los progenitores de todos en el timo y en las áreas de células T de tejidos linfoides secundarios. La diferenciación de DC linfoides está dirigida por interleucinas 2, 3 y 15 (IL-3, IL-2 e IL-15), pero no por el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Funcionalmente, las linfoides promueven la selección negativa en el timo (posiblemente induciendo apoptosis mediadas por fas) y son co-estimuladoras para células CD4⁺ y CD8⁺. Más recientemente también se ha demostrado que las DC de tipo linfoides derivadas de progenitores humanos activan preferentemente la respuesta de Th2. Debido a su capacidad de inducir apoptosis y su papel en la eliminación de células T potencialmente auto-reactivas, se ha sugerido que las DC linfoides median principalmente en funciones efectoras inmunes reguladoras en lugar de estimuladoras.
- Las *DC mieloides* se distinguen por un estadio de desarrollo en el que existe expresión de ciertos rasgos asociados a fagocitos. Parece haber al menos dos subconjuntos estructural y funcionalmente distintos. El primero se define antigénicamente como CD14⁻, CD34⁺, CD68⁻ y CD1a⁺ y se denomina en ocasiones DC de tipo de célula de Langerhans. Este subconjunto parece preparar las células T para activar de forma preferente respuestas de Th1 y la IL-12 parece implicada en este proceso. El subconjunto puede activar también células B vírgenes para secretar IgM y, por lo tanto, puede estar asociado predominantemente con una respuesta de Th1 inflamatoria. Un segundo subconjunto de DC mieloides, denominada en ocasiones DC intersticiales, se define antigénicamente como CD14⁺, CD68⁺ y CD1a⁻ y está relacionado con monocitos (como resultado, se denominan también *DC derivadas de monocitos* o *Mo-DC*).

(d) Vacunas de células dendríticas

En un paradigma de tratamiento basado en células dendríticas (revisado en Schuler y col. (2003) *Current Opinion in Immunol* 15: 138-147), se toman células DC de un paciente (por ejemplo, mediante aféresis) y después se sensibilizan reiteradamente (preparan o enriquecen) con un antígeno o antígenos particulares (por ejemplo, un antígeno o antígenos tumorales). Después se re-administran como una vacuna celular autóloga para potenciar una respuesta inmune apropiada.

En este paradigma de tratamiento, las células T que responden incluyen células cooperadoras, especialmente células CD4⁺ Th1 (que producen IFN- γ) y linfocitos citolíticos (especialmente linfocitos T citolíticos CD8⁺). Las DC pueden mediar también respuestas mediante otras clases de linfocitos (células B, linfocitos NK y NKT). Pueden provocar también memoria de células T, un objetivo crítico de la vacunación.

Actualmente se conoce poco acerca de la identidad del subconjunto o los subconjuntos de DC requeridos para la eficacia óptima de vacunas de DC, más allá del reconocimiento de que se requiere la maduración y que han de evitarse DC inmaduras (Dhodapkar y Steinman (2002) *Blood* 100: 174-177).

Hsu y col. (1996) *Nat Med* 2: 52-58 usaron DC raras aisladas *ex vivo* de la sangre. Estas DC eran altamente heterogéneas con respecto a sus subconjuntos ontogénicos pero maduraron espontáneamente durante el procedimiento de aislamiento. Sin embargo, los rendimientos fueron muy bajos.

El problema del rendimiento se ha abordado mediante desarrollo de técnicas para expandir las DC *ex vivo*, por ejemplo, con el ligando Flt3 (Fong y col. (2001) *PNAS* 98: 8809-8814), pero esto es de eficacia limitada.

Sin embargo, la mayoría de los estudios han usado Mo-DC. Estas células se obtienen exponiendo monocitos a GM-CSF e IL-4 (o IL-13) para producir Mo-DC inmaduras, que después se maduran mediante incubación en un *medio de maduración*. Tales medios comprenden uno o más factores de estimulación de la maduración y comprenden normalmente ligandos de receptor de tipo Toll (TLR) (por ejemplo, productos microbianos tales como lipopolisacárido y/o monofosforil lípido), citocinas inflamatorias (tales como TNF- α), CD40L, medio acondicionado de monocitos (MCM) o mimético de MCM (que contiene IL-1 β , TNF- α , IL-6 y PGE₂).

Aunque se sabe poco actualmente acerca de la influencia del medio de maduración sobre el rendimiento de la vacuna de DC, el MCM o mimético de MCM representa actualmente un estándar: las Mo-DC maduras usando estos medios son homogéneas, tienen una alta viabilidad, migran bien por estímulos quimiotácticos e inducen CTL tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se han desarrollado técnicas para generar grandes cantidades de Mo-DC (de 300 a 500 millones de DC maduras por aféresis) de monocitos adherentes en recipientes de cultivo comunicantes multiestratificados semi-cerrados que ofrecen un área superficial lo suficientemente grande para producir un producto de leucocitoaféresis. Estas denominadas *fábricas de células* se pueden usar para producir alícuotas criopreservadas de DC precargadas con antígenos que son altamente viables después de descongelación y se han descrito procedimientos optimizados de maduración y congelación (Berger y col (2002) *J. Immunol. Methods* 268: 131-140; Tuyraerts y col. (2002) *J. Immunol. Methods* 264: 135-151).

Se han preparado también células dendríticas para vacunación a partir de DC derivadas de CD34⁺ que comprenden una mezcla de intersticiales y DC del tipo de célula de Langerhans. Algunos trabajadores creen que el último

subconjunto de DC es más potente que las Mo-DC cuando se usa como vacunas de DC.

Con respecto a la selección de antígenos se han usado diversas estrategias. Se pueden emplear antígenos tanto definidos como indefinidos. Los antígenos pueden ser xenoantígenos o autoantígenos. Se pueden seleccionar uno o más neoantígenos definidos: en el caso del tratamiento de cáncer, el neoantígeno o los neoantígenos pueden comprender un antígeno asociado a tumor. Sin embargo, son más populares los péptidos de 9-11 aminoácidos que contienen antígenos definidos (secuencias naturales o análogos diseñados para unión aumentada de MHC): tales antígenos se pueden fabricar hasta un estándar de buenas prácticas de fabricación (GMP) y se normalizan de forma sencilla.

Otras estrategias han empleado antígenos como inmunocomplejos, que se suministran a DC que llevan receptor de Fc y que dan como resultado la formación de secuencias peptídicas tanto de MHC de clase I como de MHC de clase II. Esto ofrece el potencial de inducir tanto CTL como células Th (Berlyn y col. (2001) Clin Immunol 101: 276-283).

También se han desarrollado procedimientos para explorar todo el repertorio antigénico de cualquier tumor dado (u otra célula diana, tal como una célula infectada víricamente). Por ejemplo, los híbridos de DC-célula tumoral se han usado con éxito para tratar carcinoma de células renales (Kugler y col. (2000) 6: 332-336), pero los híbridos son difícil de normalizar y son de vida corta. Se han usado células tumorales necróticas o apoptóticas al igual que diversos lisados celulares.

Parece que la selección de antígenos específicos de paciente puede ser importante en el tratamiento de al menos algunos cánceres y pueden resultar ser importantes los antígenos derivados de células tumorales frescas en lugar de líneas celulares tumorales o antígenos definidos (Dhodapkar y col. (2002) PNAS 99: 13009-13013).

En lo relacionado al suministro del antígeno o antígenos seleccionados a las DC están disponibles diversas técnicas. Ya que el número y la calidad de los complejos de MHC-péptido influyen directamente en la inmunogenicidad de las DC, la técnica de carga con antígenos puede resultar ser crítica para el rendimiento de la vacuna de DC (van der Burg y col. (1996) J Immunol 156: 3308-3314). Parece que la presentación prolongada de complejos de MHC-péptido por las DC aumenta la inmunogenicidad y de este modo las técnicas de carga que promueven la presentación prolongada pueden ser importantes. Esto se ha conseguido cargando las DC internamente a través del uso de péptidos ligados a restos de penetración en células (Wang y Wang (2002) Nat Biotechnol 20: 149-154).

Los antígenos también se pueden cargar transfectando las DC con ácido nucleico codificante (por ejemplo, mediante electroporación) de tal manera que los antígenos se expresen por la DC, se procesen y presenten en la superficie celular. Esta estrategia evita la necesidad de proteínas y anticuerpos de GMP caros. El ARN se prefiere para este fin, ya que produce solamente expresión transitoria (aunque suficiente para el procesamiento de antígenos) y evita los potenciales problemas asociados a la integración del ADN y expresión a largo plazo/mutagénesis relacionadas. Tales técnicas de transfección permiten también la exploración de todo el repertorio antigénico de una célula diana mediante el uso de ARN tumoral total o amplificado mediante PCR.

Existen algunas pruebas de que las *proteínas cooperadoras* (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH) y toxoide tetánico (TT)) pueden proporcionar ayuda inespecífica para la inducción de CTL (Lanzavecchia (1998) Nature 393: 413-414) y puede resultar ser ventajoso sensibilizar reiteradamente las DC con tales proteínas cooperadoras antes de la vacunación.

Con respecto a la posología, la dosis, la frecuencia y la vía de administración de la vacuna de DC todavía no se han optimizado en experimentos clínicos. Claramente, el número absoluto de células administradas dependerá de la vía de administración y la eficacia de la migración después de la infusión. A este respecto existen indicaciones de que la administración intradérmica o subcutánea puede ser preferente para el desarrollo de respuestas de Th1, aunque se ha empleado el suministro intraganglionar directo para salvar la necesidad de migración desde la piel a los ganglios (Nestle y col. (1998) Nat Med 4: 328-332).

Bastante distinta del paradigma de vacuna de DC sensibilizadas reiteradamente con antígenos que se ha descrito anteriormente es una estrategia en la que las células dendríticas que secretan diversas quimiocinas se inyectan directamente en tumores, donde se ha demostrado que preparan de forma extraganglionar las células T (Kirk y col. (2001) Cancer Res 61: 8794-8802). Por tanto, en otro paradigma de tratamiento, las DC se dirigen a un tumor y se activan para provocar respuestas inmunes localmente sin la necesidad de la carga de antígenos *ex vivo*.

La vacunación de DC localmente constituye otra estrategia distinta (pero relacionado) más (Hawiger y col. (2001) J Exp Med 194: 769-779). En este paradigma terapéutico, el antígeno se dirige a las DC *in vivo* donde se expande e induce para madurar localmente. Esta estrategia depende del direccionamiento eficaz de antígeno a DC endógenas (por ejemplo, usando exosomas –véase Thery y col. (2002) Nat Rev Immunol 2: 569-579) y el desarrollo de estimuladores de maduración que pueden activar de forma eficaz la maduración (preferentemente de un subconjunto o subconjuntos de DC definidos) *in vivo*.

(e) Uso de células dendríticas en inmunoterapia de CTL adoptiva

5 Los linfocitos T citotóxicos (CTL) se pueden administrar a un paciente para otorgar o complementar una respuesta inmune a una enfermedad o infección particular (normalmente cáncer). Por ejemplo, los linfocitos T específicos de tumor se pueden extraer de un paciente (por ejemplo, mediante leucocitoaféresis), expandir selectivamente (por ejemplo, mediante clonación guiada por tetrámero –véase Dunbar y col. (1999) J Immunol 162: 6959-6962) y después readministrarse como una vacuna celular autóloga.

La eficacia clínica, aplicabilidad y manejabilidad de este tipo de inmunoterapia pasiva puede aumentarse en gran medida usando células dendríticas para preparar las células T *in vitro* antes de la administración.

(f) Estrategias basadas en células dendríticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes

10 Las células dendríticas están implicadas también en la regulación y el mantenimiento de la tolerancia inmunológica: en ausencia de maduración, las células inducen silenciamiento o tolerancia específica de antígenos.

Por tanto, en otro paradigma de tratamiento basado en células dendríticas se administran DC inmaduras como parte de una intervención inmunomoduladora diseñada para combatir trastornos autoinmunes. En tales aplicaciones, el potencial supresor de las DC se ha aumentado mediante transfección *in vitro* con genes que codifican citocinas.

15 (g) El papel de IL-2 en la función de células dendríticas

20 Granucci y col. (2002) *trends in Immunol.* 23: 169-171 han descrito la regulación positiva transitoria de transcritos de ARNm para IL-2 en células dendríticas después de estímulo microbiano. En el documento WO03012078, Granucci describe el importante papel desempeñado por IL-2 derivada de DC en la mediación no solamente de la activación de células T sino también de la de linfocitos NK y continúa sugiriendo que la IL-2 derivada de DC es un factor clave que regula y vincula la actividad innata y adaptativa.

25 Además se ha demostrado recientemente que la administración sistémica de IL-2 aumenta la eficacia terapéutica de una vacuna de DC (Shimizu y col. (1999) *PNAS* 96: 2268-2273), mientras que se demostró que la presencia de IL-2 es esencial para la inmunidad mediada por péptidos específica mediada por células dendríticas en al menos algunos regímenes de vacunación de DC (Eggert y col. (2002) *Eur J Immunol* 32: 122-127). En su reciente revisión, Schuler y col. (en el mismo lugar) concluyen que "... puede merecer la pena explorar la combinación de vacunación de DC con administración de IL-2, ya que las respuestas de células T inducidas por vacunación de DC parecen aumentadas y terapéuticamente más eficaces".

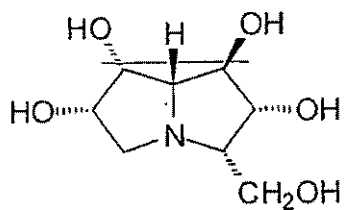
30 Será evidente a partir de la anterior discusión que las células dendríticas han resultado ser ahora herramientas valiosas en inmunoterapia (particularmente en el tratamiento de cáncer), pero que la vacunación de DC está todavía en un estadio relativamente temprano. Los procedimientos para preparar DC están mejorando continuamente y un número cada vez mayor de experimentos clínicos de Fase I, II y III están dirigiendo una investigación y desarrollo intensos en esta área. Sin embargo, existe una necesidad todavía de mejorar la eficacia al nivel de biología de DC.

35 Los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que la casuarina y ciertos análogos de casuarina tienen actividad inmunomoduladora inesperada y que esta actividad puede no ser dependiente de la inhibición de glucosidasa.

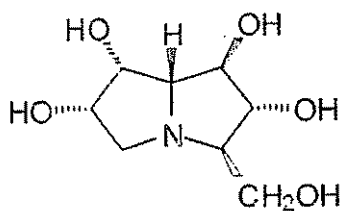
Sumario de la invención

De acuerdo con la invención se proporciona un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada aislado como se define en las reivindicaciones.

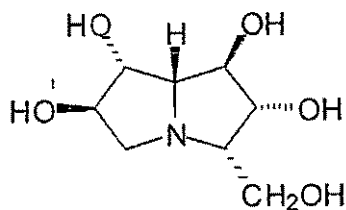
40 Como se menciona más adelante, la invención contempla diastereómeros de los compuestos de la invención. Son particularmente preferentes los diastereómeros seleccionados de 3,7-*diepi*-casuarina (10), 7-*epi*-casuarina (11), 3,6,7-*triepi*-casuarina (12), 6,7-*diepi*-casuarina (13) y 3-*epi*-casuarina (14), así como sales y derivados farmacéuticamente aceptables de las mismas.



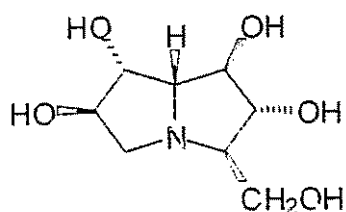
3,7-diepi-casuarina (10)



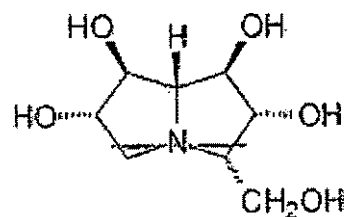
7-epicasuarina (11)



3,6,7-triepi-casuarina (12)

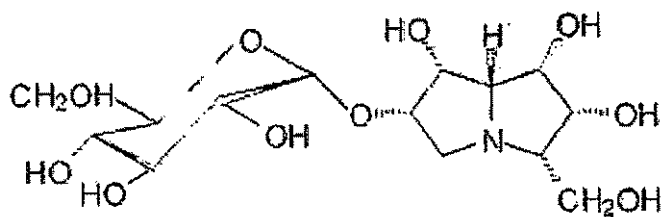


6,7-diepi-casuarina (13)

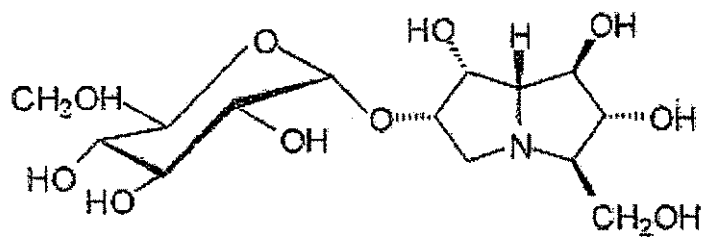


3-epi-casuarina (14)

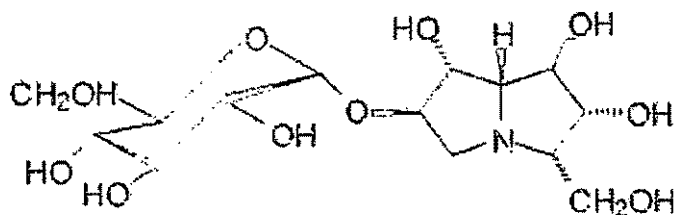
Otros diastereómeros preferentes se seleccionan de 3,7-*diepi*-casuarina-6- α -D-glucósido (15), 7-*epi*-casuarina-5- α -D-glucósido (16), 3,6,7-*triepi*-casuarina-6- α -D-glucósido (17), 6,7-*diepi*-casuarina-6- α -D-glucósido (18) y 3-*epi*-casuarina-6- α -D-glucósido (19), así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



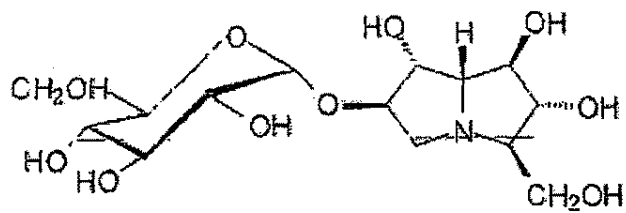
3,7-di-epi-casuarina-6-α-D-glucósido (15)



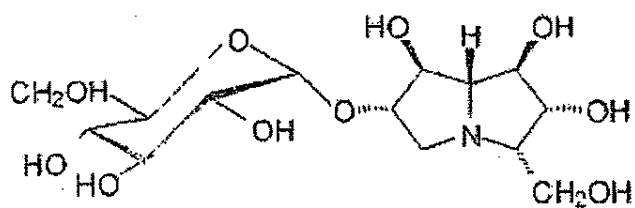
7-epi-casuarina-6-α-D-glucósido (16)



3,6,7-tri-epi-casuarina-6-α-D-glucósido (17)



6,7-di-epi-casuarina-6-α-D-glucósido (18)



3-epi-casuarina-6-α-D-glucósido (19)

Otros diastereómeros preferentes incluyen epímeros de 7a seleccionados de 3,7,7a-*triepi*-casuarina, 7,7a-*diepi*-casuarina, 3,8,7,7a-*tetraepi*-casuarina, 6,7,7a-*triepi*-casuarina y 3,7a-*diepi*-casuarina, así como sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Otros aspectos de la invención son como se definen en las reivindicaciones.

5 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Cuando se usa en el presente documento y a menos que se indique específicamente de otro modo, se pretende que los siguientes términos tengan los siguientes significados además de cualquier significado más amplio (o más limitado) que los términos pueden disfrutar en la técnica:

10 El término *accesorio* (como se aplica al uso de los fármacos de la invención en terapia) define usos en los que el compuesto de pirrolizidina se administra junto con uno o más fármacos, intervenciones, regímenes o tratamientos adicionales (tales como cirugía y/o irradiación). Tales terapias accesorias pueden comprender la administración/aplicación concurrente, separada o secuencial del compuesto de pirrolizidina de la invención y el otro tratamiento o tratamientos. Por tanto, en algunas realizaciones, el uso accesorio del compuesto de pirrolizidina de la invención se refleja en la formulación de las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, el uso accesorio se puede reflejar en una dosificación unitaria específica o en formulaciones en las que el compuesto de pirrolizidina de la invención está presente mezclado con el otro o los otros fármacos con los que ha de usarse de forma accesorio (o asociado físicamente de otro modo con el otro fármaco o fármacos dentro de una única dosis unitaria). En otras realizaciones, el uso accesorio del compuesto de pirrolizidina de la invención se puede reflejar en la composición de los kits farmacéuticos de la invención, en los que el compuesto de pirrolizidina de la invención está co-embalado (por ejemplo, como parte de una serie de dosis unitarias) con el otro fármaco o fármacos con los que ha de usarse de forma accesorio. En otras realizaciones más, el uso accesorio del compuesto de pirrolizidina de la invención puede reflejarse en el contenido de la información y/o las instrucciones co-embaladas con el compuesto de pirrolizidina con respecto a formulación y/o posología.

25 El término *neoantígeno* se usa en el presente documento para definir cualquier determinante antigénico recién expresado. Los neoantígenos pueden surgir después de cambio conformacional en una proteína, como determinantes recién expresados (especialmente sobre las superficies de células transformadas o infectadas), como resultado de la formación de complejos de una o más moléculas o como resultado de escisión de una molécula con una presentación resultante de nuevos determinantes antigénicos. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término neoantígeno abarca antígenos expresados después de la infección (por ejemplo, infección vírica, infección protozoaria o infección bacteriana), en enfermedades mediadas por priones (por ejemplo, EEB y ECJ) y en transformación celular (cáncer), en cuyo último caso el neoantígeno puede denominarse un antígeno asociado a tumor.

35 La expresión *antígeno asociado a tumor* se usa en el presente documento para definir un antígeno presente en células transformadas (malignas o tumorales) y que está ausente (o presente en menores cantidades o en un compartimento celular diferente) en células normales de tipo del que se origina el tumor. Los virus oncogénicos pueden inducir también la expresión de antígenos tumorales, que con frecuencia son proteínas de huésped inducidas por el virus.

40 La expresión *medicina herbaria* se usa en el presente documento para definir una composición farmacéutica en la que al menos un principio activo no está sintetizado químicamente y es un constituyente fitoquímico de una planta. En la mayoría de los casos, este principio activo no sintético no está aislado (como se define en el presente documento), pero está presente junto con otros productos fitoquímicos con los que está asociado en la planta de origen. En algunos casos, sin embargo, el *principio* o los *principios bioactivos* derivados de planta pueden estar en una fracción concentrada o aislados (implicando en ocasiones altos grados de purificación). En muchos casos, sin embargo, la medicina herbaria comprende un extracto más o menos bruto, infusión o fracción de una planta o incluso una planta completa no procesada (o parte de la misma), aunque en tales casos la planta (o parte vegetal) habitualmente al menos está secada y/o molida.

50 La expresión *principio bioactivo* se usa en el presente documento para definir un producto fitoquímico que es necesario o suficiente para la eficacia farmacéutica del medicamento herbario en el que está comprendido. En el caso de la presente invención, el principio bioactivo comprende el compuesto inmunomodulador de la invención (por ejemplo, casuarina, glucósido de casuarina o mezclas de los mismos).

55 La expresión *especificación convencional* se usa en el presente documento para definir una característica o un perfil fitoquímico que está correlacionado con una calidad aceptable de la medicina herbaria. En este contexto, el término *calidad* se usa para definir la aptitud global del medicamento herbario para su uso pretendido e incluye la presencia de uno o más de los principios bioactivos (a una concentración apropiada) que se han descrito anteriormente o de otro modo la presencia de uno o más marcadores bioactivos o un perfil fitoquímico que se correlaciona con la presencia de uno o más de los principios bioactivos (a una concentración apropiada).

La expresión *perfil fitoquímico* se usa en el presente documento para definir un conjunto de características relacionadas con diferentes constituyentes fitoquímicos.

El término *aislado* se usa en el presente documento para indicar que el compuesto existe en un medio físico distinto del que aparece en la naturaleza. Por ejemplo, el material aislado puede estar sustancialmente aislado (por ejemplo, purificado) con respecto al medio celular complejo en el que aparece de forma natural. Cuando el material aislado está purificado, el nivel absoluto de pureza no es crítico y los expertos en la técnica pueden determinar de forma sencilla los niveles apropiados de pureza de acuerdo con el uso para el que ha de emplearse el material. Son preferentes, sin embargo, niveles de pureza del 90 % p/p, del 99 % p/p o superiores, en algunas circunstancias, el compuesto aislado forma parte de una composición (por ejemplo, un extracto más o menos bruto que contiene muchas otras sustancias) o sistema de tampón, que puede, por ejemplo, contener otros componentes. En otras circunstancias, el compuesto aislado se puede purificar hasta homogeneidad esencial, por ejemplo, como se determina espectrofotométricamente mediante RMN o mediante cromatografía (por ejemplo CG-EM).

La expresión *derivado farmacéuticamente aceptable* define compuestos que se obtienen (o que se pueden obtener) mediante derivatización química de los compuestos de pirrolizidina precursores. Los derivados farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, son adecuados para la administración a o el uso en contacto con los tejidos de seres humanos sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica indebida (es decir, correspondiente a una proporción razonable de beneficio/riesgo). Los derivados preferentes son los obtenidos (o que se pueden obtener) mediante alquilación, esterificación o acilación de los compuestos de pirrolizidina precursores. Los derivados pueden ser inmunomoduladores por sí mismos o pueden ser inactivos hasta que se procesen *in vivo*. En último caso, los derivados de la invención actúan como pro-fármacos. Son pro-fármacos particularmente preferentes los derivados de éster que están esterificados en uno o más de los hidroxilos libres y que se activan mediante hidrólisis *in vivo*. Los derivados farmacéuticamente aceptables conservan algo o toda la actividad inmunomoduladora del compuesto precursor. En algunos casos, la actividad inmunomoduladora se aumenta mediante derivatización. La derivatización puede aumentar también otras actividades biológicas del compuesto, por ejemplo, la biodisponibilidad y/o actividad inhibidora de glucosidasa y/o perfil inhibidor de glucosidasa. Por ejemplo, la derivatización puede aumentar la potencia inhibidora y/o especificidad de glucosidasa.

La expresión *sal farmacéuticamente aceptable* define cualquier sal de adición de ácido orgánica o inorgánica no tóxica de los compuestos de base libre que son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida y que se corresponden con una proporción razonable de beneficio/riesgo. Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Son ejemplos las sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico), ácidos carboxílicos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, dihidroximaleico, benzoico, fenilacético, 4-aminobenzoico, 4-hidroxibenzoico, antranílico, cinámico, salicílico, 2-fenoxibenzoico, 2-acetoxibenzoico y mandélico) y ácidos sulfónicos orgánicos (por ejemplo, ácido metanosulfónico y ácido *p*-toluenosulfónico). Los fármacos se pueden convertir también en sales mediante reacción con un haluro de metal alcalino, por ejemplo, cloruro sódico, yoduro sódico o yoduro de litio. Preferentemente, los compuestos de pirrolizidina se convierten en sus sales mediante reacción con una cantidad estequiométrica de cloruro sódico en presencia de un disolvente tal como acetona.

Estas sales y los compuestos de base libre pueden existir en una forma hidratada o sustancialmente anhidra. Las formas cristalinas de los compuestos se consideran también y se contemplan en general las sales de adición de ácido de los compuestos de pirrolizidina son materiales cristalinos que son solubles en agua y diversos disolventes orgánicos hidrófilos y que en comparación con sus formas de base libre demuestran mayores puntos de fusión y una solubilidad aumentada.

En el presente documento están desvelados isómeros ópticos, formas racémicas y diastereómeros de los compuestos de pirrolizidina de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que, debido a los átomos de carbono sustituidos asimétricamente presentes en los compuestos de la invención, los compuestos de pirrolizidina pueden existir y se pueden sintetizar y/o aislar en formas ópticamente activas y racémicas.

Actividades biológicas de los compuestos de la invención

Sin desear quedar ligado por ninguna teoría, se piensa que la actividad inmunomoduladora de los compuestos de la invención puede surgir de la estimulación y/o supresión de la secreción de citocinas *in vivo*. En particular, se piensa que la actividad inmunomoduladora de los compuestos de la invención surge de la estimulación de la secreción de una o más citocinas (por ejemplo, una o más citocinas Th1), que incluyen interleucinas 2 y/o 12 (IL-2 y/o IL-12) y/o la supresión de la secreción de una o más citocinas Th2 (por ejemplo, IL-5).

En particular, se piensa que la actividad inmunoestimuladora de los compuestos de la invención puede surgir de la estimulación de IL-12 e IL-2 mediante células dendríticas. Esto conduce a la estimulación de linfocitos NK para producir IFN- γ e induce el desarrollo de células Th1 CD4⁺. Las células Th1 inducidas producen después IFN- γ e IL-2. Después, la IL-2 aumenta adicionalmente la proliferación de células Th1 y la diferenciación de células T CD8⁺ específicas de patógeno (por ejemplo, tumor y virus). La IL-2 también estimula la actividad citolítica de los linfocitos

NK del sistema inmune innato.

5 La IL-12 es el mediador primario de la inmunidad de tipo 1 (la respuesta de Th1). Induce a los linfocitos citolíticos naturales (NK) a producir IFN- γ como parte de la respuesta inmune innata y promueve la expansión de células Th1 CD4⁺ y células CD8⁺ citotóxicas que producen IFN- γ . Por lo tanto, aumenta la invasión por células T de tumores así como la susceptibilidad de las células tumorales a la invasión por células T.

Por tanto, los compuestos de la invención son preferentemente estimuladores de la secreción de citocinas. Son particularmente preferentes compuestos que inducen, potencian, activan o estimulan la liberación de una o más citocinas (por ejemplo, citocinas Th1, por ejemplo, IL-12 y/o Il-2, opcionalmente junto con una o más otras citocinas) *in vivo*.

10 Esta actividad inmunomoduladora primaria de los compuestos de la invención es particularmente importante en ciertas aplicaciones médicas (discutidas con detalle más adelante). Por ejemplo, la producción aumentada de IL-12 puede superar la supresión de las inmunidades innata y celular de individuos infectados por VIH-1 y pacientes con SIDA.

15 La estimulación de citocinas mostrada por los compuestos de la invención puede depender, completamente o en parte, de la presencia de agentes co-estimuladores. Tales agentes co-estimuladores pueden incluir, por ejemplo, agentes que estimulan el sistema inmune innato, que incluyen ligandos de receptor de tipo Toll (TLR). Estos ligandos incluyen productos microbianos tales como lipopolisacáridos (LPS) y/o monofosforil lípido) así como otras moléculas asociadas a infección microbiana. En muchas aplicaciones, tales agentes co-estimuladores estarán presentes en el paciente a tratar en el momento de la administración de los compuestos de la invención.

20 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se piensa que al menos algunas de las actividades farmacológicas de los compuestos de la invención pueden basarse en una actividad inhibidora de glucosidasa secundaria.

Tal inhibición de la glucosidasa puede conducir a alguno o todos de lo siguiente *in vivo*:

- modificación de la glucosilación de la célula tumoral (por ejemplo, glucosilación de antígeno tumoral);
- modificación de la glucosilación de la proteína vírica (por ejemplo, glucosilación de antígeno de virión);
- 25 • modificación de la glucosilación de la proteína de superficie celular en células huésped infectadas;
- modificación de las paredes de la célula bacteriana.

30 Por lo tanto, esta actividad biológica complementaria puede aumentar la actividad inmunomoduladora primaria en algunas realizaciones preferentes de la invención. Puede ser particularmente deseable en ciertas aplicaciones médicas, que incluyen el tratamiento de trastornos proliferativos (tales como cáncer) o en aplicaciones en las que la infección está relacionada con inmunosupresión. Por ejemplo, la modificación selectiva de la glucosilación de antígeno de virión puede convertir un virus infeccioso en menos (o no) infeccioso y/o más susceptible a respuestas inmunes endógenas. En particular, los compuestos de la invención pueden alterar los patrones de glucosilación de glucoproteína gp120 de envuelta vírica del VIH, inhibiendo de este modo la entrada del VIH en la célula huésped interfiriendo con la unión a receptores de superficie celular.

35 Por tanto, los compuestos de la invención son preferentemente (pero no necesariamente) inhibidores de glucosidasa. Son particularmente preferentes compuestos que muestran especificidad de inhibición de glucosidasa, por ejemplo, glucosidasa I en lugar de manosidasas. Por lo tanto, tales compuestos preferentes pueden ser bastante diferentes en su perfil inhibidor de glucosidasa de la swainsonina y sus análogos, ya que las últimas son inhibidores potentes y específicos de la manosidasa.

40 **Aplicaciones médicas de los compuestos de la invención**

La invención encuentra una amplia aplicación en medicina, como se define en las reivindicaciones adjuntas a esto.

Estas aplicaciones médicas pueden aplicarse a cualquier animal homeotermo incluyendo seres humanos. Las aplicaciones incluyen aplicaciones veterinarias, en las que los compuestos de pirrolizidina de la invención se administran a animales no humanos, que incluyen primates, perros, gatos, caballos, vacas y ovejas.

45 Los compuestos de la invención son inmunomoduladores. Por tanto, encuentran una aplicación general en el tratamiento o la profilaxis de afecciones en las que está indicada la estimulación, aumento o inducción del sistema inmune y/o en las que está indicada la supresión o eliminación de parte o toda la respuesta inmune.

Los usos médicos particulares de los compuestos de pirrolizidina de la invención se describen con detalle más adelante.

50 **1. Aumento de la proporción de respuesta de Th1:Th2**

Consideraciones generales

Como se ha explicado antes, la respuesta inmune comprende dos tipos distintos: la respuesta de Th1 (inmunidad de tipo 1, celular o mediada por células) y la respuesta de Th2 (inmunidad de tipo 2, humoral o mediada por anticuerpos).

5 Estas respuestas de Th1 y Th2 no son mutuamente excluyentes y en muchas circunstancias ocurren en paralelo. En tales circunstancias, el equilibrio de la respuesta de Th1/Th2 determina la naturaleza (y las repercusiones) de la defensa inmunológica (como se explica en el presente documento).

10 El equilibrio de Th1/Th2 (que se puede expresar como la *proporción de respuesta de Th1:Th2*) se determina, al menos en parte, mediante la naturaleza del entorno (y en particular el medio de citocinas) en el que ocurre preparación con antígenos de células T cooperadoras vírgenes cuando se estimula por primera vez el sistema inmune.

Las respuestas de Th1 y Th2 se distinguen entre otras cosas basándose en ciertos cambios fenotípicos relacionados con la preparación y polarización posterior de células T cooperadoras vírgenes. Estos cambios fenotípicos están caracterizados, al menos en parte, por la naturaleza de las citocinas secretadas por las células T cooperadoras polarizadas.

15 Las células Th1 producen las denominadas *citocinas Th1*, que incluyen uno o más de IL-1, TNF, IL-2, IFN-gamma, IL-12 y/o IL-18. Las citocinas Th1 están implicadas en la activación de macrófagos y las células Th1 organizan las defensas mediadas por células (que incluyen la producción de linfocitos T citotóxicos) que forman una división clave de la defensa contra el ataque bacteriano y vírico así como células malignas.

20 Las células Th2 producen las denominadas *citocinas Th2*, que incluyen uno o más de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Las citocinas Th2 promueven la producción de diversos anticuerpos y pueden suprimir la respuesta de Th1.

25 Por consiguiente, en el ratón, una célula que produce IFN-gamma y no IL-4 se clasifica como Th1, mientras que una célula CD4⁺ que expresa IL-4 y no IFN-gamma se clasifica como Th2. Aunque esta distinción es menos clara en seres humanos (las células T que producen solamente citocinas Th1 o Th2 no parecen existir en seres humanos), el fenotipo de la respuesta de células T (Th1 o Th2) todavía puede distinguirse en seres humanos basándose en la *proporción* de las citocinas Th1 a Th2 expresadas (habitualmente, la proporción de IFN-gamma a IL-4 y/o IL-5).

30 Existe un entendimiento cada vez mayor de que el tipo de respuesta inmune es tan importante en la terapia y la profilaxis como su intensidad o su duración. Por ejemplo, un exceso de respuesta de Th1 puede dar como resultado enfermedad autoinmune, respuestas inflamatorias inapropiadas y rechazo de trasplante. Un exceso de respuesta de Th2 puede conducir a alergias y asma. Además, una alteración en la proporción de Th1:Th2 es sintomática de muchas enfermedades y trastornos inmunológicos y el desarrollo de procedimientos para alterar la proporción de Th1:Th2 ahora es una prioridad.

Ahora se ha descubierto que los compuestos de pirrolizidina inmunomoduladores de la invención pueden aumentar la proporción de respuesta de Th1:Th2 *in vivo* (por ejemplo, promoviendo de forma preferente una respuesta de Th1 y/o suprimiendo de forma preferente una respuesta de Th2).

35 Por tanto, los compuestos de la invención encuentran aplicación en procedimientos de terapia y/o profilaxis que comprenden aumentar la proporción de respuesta de Th1:Th2 (por ejemplo, promoviendo de forma preferente una respuesta de Th1 y/o suprimiendo de forma preferente una respuesta de Th2).

40 Las aplicaciones médicas contempladas en el presente documento incluyen por lo tanto cualquier enfermedad, afección o trastorno en los que esté indicado o se desee un aumento en la proporción de la respuesta de Th1:Th2. Por ejemplo, las aplicaciones médicas contempladas incluyen enfermedades, afecciones o trastornos en los que la estimulación de una respuesta de Th1 y/o la supresión de una respuesta de Th2 está indicada o se desea.

45 El mecanismo o los mecanismos por los que los compuestos de la invención aumentan la proporción de respuesta de Th1:Th2 no están comprendidos todavía completamente. Es probable que la actividad esté basada, al menos en parte, en la inducción de citocina de Th1 selectiva (ya que las citocinas Th1 y Th2 muestran inhibición mutua), por ejemplo, en células dendríticas.

Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden inducir, potenciar, activar o estimular (directa o indirectamente) la liberación y/o actividad (*in vitro* y/o *in vivo*) de una o más citocinas Th1 (por ejemplo, una o más citocinas seleccionadas de IFN-gamma, IL-12, IL-2 e IL-18). Son particularmente preferentes compuestos que inducen, potencian, activan o estimulan la liberación y/o actividad (*in vitro* y/o *in vivo*) de IFN-gamma y/o IL-12 y/o IL-2.

50 Son particularmente preferentes los compuestos que estimulan la liberación de IL-2 e IL-12 en células dendríticas.

Los compuestos de la invención también pueden suprimir o inactivar (directa o indirectamente) la liberación y/o la actividad (*in vitro* y/o *in vivo*) de una o más citocinas Th2 (por ejemplo una o más citocinas seleccionadas de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Son particularmente preferentes compuestos que suprimen o inactivan la liberación y/o actividad (*in vitro* y/o *in vivo*) de IL-5.

Por tanto, se prefieren particularmente los compuestos que muestran una actividad estimuladora de citocina The junto con una actividad inhibidora de citocina The complementaria.

Se describen ejemplos específicos de aplicaciones que se incluyen en la clase general de tratamientos basados en aumentar la proporción de respuesta de Th1:Th2 en las siguientes secciones.

5 Enfermedades relacionadas con Th1

Las enfermedades relacionadas con Th1 son enfermedades, trastornos, síndromes, afecciones o infecciones en los que las células Th1 están implicadas en la prevención, curación o alivio de los efectos de la enfermedad, trastorno, síndrome, afección o infección.

10 Las enfermedades relacionadas con Th1 pueden incluir también enfermedades, trastornos, síndromes, afecciones o infecciones en los que el componente de Th1 de la respuesta inmune está disminuido patológicamente o enfermedades, trastornos, síndromes, afecciones o infecciones en los que está indicada la estimulación de una respuesta de Th1.

15 Tales afecciones pueden surgir, por ejemplo, de ciertos trastornos proliferativos (normalmente cánceres) en los que las células en proliferación (por ejemplo, tumorales) ejercen un efecto supresor sobre uno o más componentes de la respuesta de Th1. Por ejemplo, las células tumorales pueden inhibir células dendríticas, causar la expresión de receptores inhibidores en células T, regular negativamente la expresión de MHC de clase I e inducir la secreción de factores antiinflamatorios y citocinas inmunosupresoras que desactivan o suprimen la citotoxicidad de células inmunes.

20 Por tanto, los compuestos de la invención encuentran aplicación en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades relacionadas con Th1.

Los ejemplos de enfermedades relacionadas con Th1 incluyen enfermedades infecciosas (particularmente infecciones víricas) y trastornos proliferativos (por ejemplo, cáncer).

25 Por tanto, las enfermedades relacionadas con Th1 incluyen cualquier afección maligna o pre-maligna, afección proliferativa o hiperproliferativa o cualquier enfermedad que surge o que se deriva o está asociada con una alteración o anomalía funcional u otra en la capacidad o comportamiento proliferativo de cualquier célula o tejido del cuerpo.

30 Por tanto, la invención encuentra aplicación en el tratamiento o la profilaxis de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de próstata. Encuentra también aplicación en el tratamiento o la profilaxis de cánceres de los sistemas sanguíneo y linfático (que incluyen Enfermedad de Hodgkin, leucemias, linfomas, mieloma múltiple y enfermedad de Waldenström), cánceres cutáneos (que incluyen melanoma maligno), cánceres del tracto digestivo (que incluyen cánceres de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer del páncreas, cáncer de hígado, cáncer de colon y rectal, cáncer anal), cánceres de los sistemas genital y urinario (que incluyen cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), cánceres en mujeres (que incluyen cáncer de mama, cáncer ovárico, cánceres ginecológicos y coriocarcinoma) así como en cerebro, carcinoide de hueso, tumores nasofaríngeos, retroperitoneales, tiroideos y de tejidos blandos. Encuentra también aplicación en el tratamiento o la profilaxis de cánceres de sitio primario desconocido.

35 Las enfermedades infecciosas relacionadas con Th1 incluyen infecciones bacterianas, priónicas (por ejemplo, EEB y ECJ), víricas, fúngicas, protozoarias y metazoarias. Por ejemplo, las enfermedades infecciosas relacionadas con Th1 incluyen infección por virus sincitial respiratorio (VSR), virus de la hepatitis B (VHB), Epstein-Barr, virus de la hepatitis C (VHC), herpes simple tipo 1 y 2, herpes genital, queratitis herpética, encefalitis herpética, herpes zoster, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe A, virus hantaan (fiebre hemorrágica), virus de papiloma humano (VPH), tuberculosis, lepra y sarampión.

40 Las enfermedades infecciosas relacionadas con Th1 particularmente preferidas incluyen aquellas en las que el patógeno ocupa un compartimento intracelular, que incluyen VIH/SIDA, leishmaniasis, tripanosomiasis, gripe, tuberculosis y malaria.

45 Los compuestos de la invención pueden encontrar aplicación también en el tratamiento de pacientes en los que la respuesta inmune de Th1 es defectuosa. Tales pacientes pueden incluir neonatos, jóvenes en los que la respuesta de Th1 es inmadura y no está completamente desarrollada así como pacientes de más edad en los que la respuesta de Th1 se ha convertido en senescente o se ha comprometido a lo largo del tiempo. En tales poblaciones de pacientes, los compuestos de la invención se pueden usar profilácticamente (como un inmunostimulador de tipo 1 generalizado para reducir los riesgos de infecciones (por ejemplo, víricas)).

Enfermedades y alergias relacionadas con Th2

Las enfermedades relacionadas con Th2 son enfermedades, trastornos, síndromes, afecciones o infecciones en los que las células Th2 están implicadas en (por ejemplo, respaldan, causan o median) los efectos de la enfermedad,

trastorno, síndrome, afección o infección.

Por tanto, los compuestos de la invención encuentran aplicación en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades relacionadas con Th2.

5 Una clase importante de enfermedades relacionadas con Th2 que se puede tratar con los compuestos de la invención es la enfermedad alérgica.

Se sabe bien que los individuos genéticamente predispuestos pueden sensibilizarse (convertirse en alérgicos) a antígenos que se originan en diversas fuentes ambientales. La reacción alérgica ocurre cuando un individuo previamente sensibilizado se re-expone al mismo alérgeno o a uno estructuralmente similar u homólogo. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término *alergia* se usa para definir un estado de hipersensibilidad inducido por exposición a un antígeno (alérgeno) particular dando como resultado reacciones inmunológicas dañinas y/o incómodas con exposiciones posteriores al alérgeno.

15 Las reacciones inmunológicas dañinas, incómodas y/o indeseables presentes en la alergia incluyen una amplia variedad de síntomas. Pueden estar afectados muchos órganos y tejidos diferentes, que incluyen el tracto gastrointestinal, la piel, los pulmones, la nariz y el sistema nervioso central. Los síntomas pueden incluir dolor abdominal, distensión abdominal, alteración de la función intestinal, vómitos, erupciones, irritación cutánea, sibilancias y falta de aliento, descarga nasal y bloqueo nasal, cefalea y cambios de humor. En casos graves, los sistemas cardiovascular y respiratorio están comprometidos y el choque anafiláctico conduce en los casos extremos a muerte.

20 Se sabe que las reacciones inmunológicas dañinas, indeseables y/o incómodas características de la alergia tienen un componente de respuesta de Th2.

Como se ha explicado anteriormente, los compuestos de la invención pueden suprimir o inactivar (directa o indirectamente) la liberación y/o actividad (*in vitro* y/o *in vivo*) de una o más citocinas Th2 (por ejemplo, una o más citocinas seleccionadas de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Por tanto, los compuestos de la invención se pueden usar para efectuar una modulación correctiva o paliativa de las reacciones inmunológicas dañinas y/o incómodas características de reacciones alérgicas inhibiendo, suprimiendo o eliminando la respuesta de Th2 al alérgeno.

Los compuestos de la invención, por lo tanto, encuentran aplicación en el tratamiento o la profilaxis de la alergia.

30 Cualquier alergia se puede tratar de acuerdo con la invención, incluyendo alergia tópica, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, hipereosinofilia, síndrome de intestino irritable, migraña inducida por alérgenos, alergia bacteriana, alergia bronquial (asma), alergia por contacto (dermatitis), alergia retardada, alergia al polen (fiebre del heno), alergia a fármacos, alergia a picaduras, alergia a mordeduras, alergia gastrointestinal o alimentaria (incluyendo la asociada a enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) y alergia física. Las alergias físicas incluyen alergia al frío (urticaria por frío o angioedema), alergia al calor (urticaria colinérgica) y fotosensibilidad.

Es particularmente importante el tratamiento o la profilaxis del asma.

35 2. Hemorrestauración

Los compuestos de pirrolizidina de la invención aumentan la proliferación de células esplénicas y de médula ósea y pueden actuar como agentes mieloproliferativos. Por lo tanto, encuentra una aplicación como hemorrestauradores.

40 La hemorrestauración puede estar indicada después de terapias inmunosupresoras (tales como ciclosporina A, azatioprina o radioterapias inmunosupresoras), quimioterapia (incluyendo tratamiento con agentes quimioterapéuticos tanto específicos de ciclo como no específicos), administración de esteroides u otras formas de intervención quirúrgica o médica (que incluyen radioterapia). Por tanto, el uso de los compuestos de pirrolizidina de la invención como hemorrestauradores puede ser accesorio a otros tratamientos que tienden a disminuir las poblaciones de células esplénicas y de médula ósea. Las terapias accesorias particularmente preferentes de acuerdo con la invención incluyen la administración de una dosis inmunorrestauradora del compuesto de pirrolizidina de la invención de forma accesorio a: (a) quimioterapia; y/o (b) radioterapia; y/o (c) trasplante de médula ósea; y/o (d) inmunoterapia de hemoablación.

45 3. Alivio de la inmunosupresión

Los compuestos de pirrolizidina de la invención se pueden usar para aliviar, controlar o modificar estados en los que el sistema inmune está parcial o completamente suprimido o disminuido. Tales estados pueden surgir de afecciones congénitas (hereditarias), adquirirse (por ejemplo, mediante infección o neoplasia) o inducirse (por ejemplo, deliberadamente como parte del tratamiento de trasplantes o cánceres).

Por tanto, los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden encontrar aplicación como inmunomoduladores accesorios (por ejemplo, inmunoestimuladores) en el tratamiento y/o el manejo de diversas enfermedades (que incluyen ciertos cánceres) o intervenciones médicas (que incluyen radioterapia, terapia inmunosupresora (tal como

la administración de ciclosporina A, azatioprina o radioterapias inmunosupresoras), quimioterapia y administración de fármacos citotóxicos (por ejemplo, la administración de ricina, ciclofosfamida, acetato de cortisona, vinblastina, vincristina, adriamicina, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, mitomicina C, cloranfenicol y otras terapias basadas en esteroides). Por lo tanto, se pueden usar como quimioprotectores en el manejo de diversos cánceres e infecciones (que incluyen infecciones bacterianas y víricas, por ejemplo, infección por VIH) o para inducir actividad inmunoterapéutica apropiada y complementaria durante la inmunoterapia convencional.

En particular, los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden encontrar aplicación como inmunoestimuladores en el tratamiento o el manejo de infecciones microbianas que están asociadas a estados inmunosuprimidos, que incluyen muchas infecciones víricas (que incluyen infección por VIH en SIDA) y en otras situaciones en las que un paciente se ha inmunocomprometido (por ejemplo, después de infección por hepatitis C u otros virus o agentes infecciosos que incluyen bacterias, hongos y parásitos, en pacientes que se someten a trasplantes de médula ósea y en pacientes con inmunosupresión inducida por producto químico o por tumor).

Otras enfermedades o trastornos que pueden dar lugar a un estado inmunosuprimido que se puede tratar de acuerdo con la invención incluyen: ataxia-telangiectasia; síndrome de DiGeorge; síndrome de Chediak-Higashi; síndrome de Job; defectos de adhesión de leucocitos; panhipogammaglobulinemia (por ejemplo, asociada a enfermedad de Bruton o agammaglobulinemia congénita); deficiencia selectiva de IgA; enfermedad de inmunodeficiencia combinada; síndrome de Wiscott-Aldrich y deficiencias de complemento. Puede estar asociada a trasplante o injerto de órgano y/o tejido (por ejemplo, médula ósea), en los que las aplicaciones de los compuestos de pirrolizidina de la invención se pueden usar de forma accesoria como parte de un régimen de tratamiento global que incluye cirugía y manejo postoperatorio del estado inmune.

4. Estimulación de citocinas

Los compuestos de pirrolizidina de la invención se pueden usar para inducir, potenciar o activar diversas citocinas *in vivo*, que incluyen diversas interleucinas (que incluyen IL-2 y/o IL-12).

Por consiguiente, los compuestos de pirrolizidina de la invención encuentran una aplicación general en el tratamiento o la profilaxis de afecciones en las que está indicada la inducción, potenciación o activación *in vivo* de una o más citocinas (por ejemplo, IL-12 y/o IL-2). Tales aplicaciones se pueden emplear para estimular elementos particulares del sistema de la inmunidad celular, que incluyen células dendríticas, macrófagos (por ejemplo, macrófagos específicos de tejido), CTL, linfocitos NK, NKT, B y LAK.

En tales aplicaciones, los compuestos de la invención se pueden emplear como un accesorio a terapias génicas diseñadas para aumentar la producción de citocinas endógenas (por ejemplo, IL-2).

5. Tratamiento de trastornos proliferativos

La invención encuentra aplicación en el tratamiento de trastornos proliferativos, que incluyen diversos cánceres y metástasis de cáncer. Por ejemplo, los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden encontrar una aplicación particular en el tratamiento de leucemias, linfomas, melanomas, adenomas, sarcomas, carcinomas de tejidos sólidos, melanoma (que incluyen melanoma del ojo), cáncer pancreático, cáncer del cuello del útero-uterino, cánceres del riñón, estómago, pulmón, ovario, recto, mama, próstata, intestino, gástrico, de hígado, de tiroides, cuello, cuello del útero, glándula salival, pierna, lengua, labio, conducto biliar, pelvis, mediastino, uretra, pulmón, vejiga, esófago y colon y Sarcoma de Kaposi (por ejemplo, cuando está asociado a SIDA).

En tales aplicaciones, los compuestos de la invención pueden mostrar una actividad inhibidora de glucosidasa secundaria.

La invención, por lo tanto, puede encontrar aplicación en procedimientos de terapia o profilaxis que comprenden la modificación de la glucosilación de célula tumoral (por ejemplo, glucosilación de antígeno tumoral), la modificación de glucosilación de proteína vírica (por ejemplo, glucosilación de antígeno de virión), la modificación de glucosilación de proteína de superficie celular en células huésped infectadas y/o la modificación de paredes de célula bacteriana, promoviendo de este modo una respuesta inmune aumentada o inhibiendo directamente el crecimiento/infectividad.

6. Uso como adyuvante

Los compuestos de pirrolizidina de la invención encuentran utilidad como adyuvantes de vacuna, realizaciones en las que pueden promover, inducir o aumentar una respuesta inmune a antígenos, particularmente antígenos que tienen baja inmunogenicidad intrínseca. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden aumentar la inmunogenicidad de la vacuna estimulando la liberación de citocinas, promoviendo de este modo la ayuda de células T para respuestas de células B y CTL. Pueden también cambiar la glucosilación de antígenos de cáncer o víricos y aumentar la eficacia de la vacuna.

Cuando se usan como adyuvantes, los compuestos de la invención se pueden administrar de forma concurrente, por separado o de forma secuencial con la administración de la vacuna. La invención encuentra aplicación en cualquier vacuna, pero particularmente como una vacuna de subunidades, una vacuna de conjugado, una vacuna de ADN,

una vacuna recombinante, una vacuna de mucosa. La vacuna puede ser terapéutica o profiláctica. Puede usarse de forma inmunoproláctica o inmunoterapéutica en sujetos tanto humanos como no humanos. Los sujetos no humanos preferentes incluyen mamíferos y aves. Son particularmente preferentes las aplicaciones veterinarias. Tales aplicaciones incluyen el tratamiento o la profilaxis de la infección en animales domesticados (por ejemplo, perro y gatos) y ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, cerdos, caballos, pollos y pavos).

Por tanto, en algunas realizaciones, el compuesto de pirrolizidina de la invención puede estar presente mezclado con otro u otros componentes de la vacuna o estar co-ensvasado de otro modo (por ejemplo, como parte de una serie de dosis unitarias) con los demás componentes de la vacuna con los que ha de usarse como un adyuvante. En otras realizaciones más, el uso de los compuestos de pirrolizidina de la invención como adyuvante se refleja simplemente en el contenido de la información y/o las instrucciones co-ensvasadas con los componentes de la vacuna y relacionadas con el procedimiento de la vacunación, la formulación de la vacuna y/o la posología.

7. Aplicaciones basadas en células dendríticas

Como se ha descrito anteriormente, ahora se ha encontrado que los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden inducir la producción sostenida y pronunciada de citocinas (por ejemplo, producción sostenida y pronunciada de IL-12 y/o IL-2) en células dendríticas. Por tanto, los compuestos de la invención encuentran aplicación en procedimientos de terapia o profilaxis que comprenden la inducción de la producción de citocinas en células dendríticas o en los que la inducción de la producción de citocinas en células dendríticas está indicada o se requiere.

Vacunas de células dendríticas

En un paradigma de tratamiento basado en células dendríticas, las células se sensibilizan reiteradamente (preparan o enriquecen) con un antígeno o antígenos particulares (por ejemplo, un antígeno o antígenos tumorales) y después se administran para promover una respuesta inmune de Th1. Las células T que responden incluyen células cooperadoras, especialmente células CD4⁺ Th1 (que producen IFN- γ) y linfocitos citolíticos (especialmente linfocitos T citolíticos CD8⁺). Las células dendríticas pueden mediar también en respuestas mediante otras clases de linfocitos (linfocitos B, NK y NKT). Pueden provocar también memoria de células T, un objetivo crítico de la vacunación.

Con respecto a la selección de antígenos para su uso en la vacuna de células dendríticas de la invención se pueden emplear antígenos tanto definidos como indefinidos. Los antígenos pueden ser xenoantígenos o autoantígenos. Se pueden seleccionar uno o más neoantígenos definidos: en el caso del tratamiento del cáncer, el neoantígeno o los neoantígenos pueden comprender un antígeno asociado a tumor.

Sin embargo, más preferentes para el uso de acuerdo con la invención son péptidos (por ejemplo, péptidos sintéticos de 9-11 aminoácidos) que contienen antígenos definidos. Tales péptidos pueden comprender secuencias naturales. Como alternativa, pueden ser análogos sintéticos diseñados para la unión aumentada de MHC.

En otras realizaciones, los antígenos usados de acuerdo con la invención se proporcionan en forma de inmunocomplejos. Estos se suministran preferentemente a DC que llevan receptor de Fc de tal manera que se forman secuencias peptídicas tanto de MHC de clase I como de MHC de clase II. De este modo se pueden usar vacunas de células dendríticas de acuerdo con la invención para inducir tanto CTL como células Th.

En otra estrategia para selección de antígenos para su uso de acuerdo con la invención se explora todo el repertorio antigénico de cualquier tumor dado (u otra célula diana, tal como una célula infectada víricamente). Por tanto, en otra realización de la invención se proporcionan híbridos de DC-célula tumoral en los que las células dendríticas se tratan con compuesto (para inducir de este modo la expresión de IL-2) antes o después de la hibridación.

En otras realizaciones más se usan células tumorales necróticas o apoptóticas o lisados celulares (por ejemplo, lisados de células infectadas o células tumorales).

Se pueden emplear también antígenos derivados de células tumorales frescas (en lugar de líneas de células tumorales o antígenos definidos).

También se contempla que los compuestos de la invención se incorporen en antígenos celulares introduciendo los mismos en la membrana celular o en un compartimento intracelular (como se describe, por ejemplo, en el documento WO96017614).

Se pueden usar diversas técnicas para suministrar el antígeno o los antígenos seleccionados a las DC (denominadas de forma diversa en la técnica *carga*, *sensibilización reiterada*, *preparación* o *enriquecimiento con antígenos*). Se prefieren técnicas de carga que cargan internamente las DC: esto se puede conseguir mediante el uso de péptidos ligados a los restos de penetración en células.

Los antígenos también se pueden cargar transfectando las DC con ácido nucleico codificante (por ejemplo, mediante electroporación) de tal manera que los antígenos se expresen por las DC, se procesen y se presenten en la superficie celular. Esta estrategia evita la necesidad de proteínas y anticuerpos de GMP caros. Se prefiere el ARN para este fin, ya que produce solamente expresión transitoria (aunque suficiente para procesamiento de antígenos) y

evita los potenciales problemas asociados con la integración del ADN y expresión a largo plazo/mutagénesis relacionados. Tales técnicas de transfección también permiten la exploración de todo el repertorio antigénico de una célula diana mediante el uso de ARN tumoral total o amplificado mediante PCR.

5 Las estrategias actuales para usar células dendríticas de este modo se centran en identificar antígenos tumorales específicos y definir péptidos antigénicos que se unen a los alelos de MHC particulares expresados por cada paciente. Sin embargo, una estrategia más general implicaría la estimulación de las células dendríticas de un modo apropiado para potenciar las respuestas de Th1 sin tener en cuenta los antígenos presentes y con o sin preparación con antígenos. Después, la producción de citocinas por células dendríticas activadas promovería la respuesta apropiada de Th1.

10 Las vacunas basadas en células dendríticas de la invención encuentran una aplicación particular en el tratamiento o la profilaxis de diversos trastornos proliferativos (que incluyen diversos cánceres, como se describe más adelante). En tales aplicaciones, las células dendríticas se sensibilizan reiteradamente (preparan o enriquecen) preferentemente con uno o más antígenos tumorales *ex vivo* y los compuestos de la invención se usan para potenciar el componente de células dendríticas de la vacuna poniendo en contacto las células dendríticas con el compuesto *ex vivo* (antes o después de sensibilizar reiteradamente las células) o *in vivo* (por ejemplo, mediante co-administración, concurrentemente, por separado o de forma secuencial de las células dendríticas y el compuesto).

15 Las vacunas basadas en células dendríticas de la invención se pueden usar en el tratamiento o la profilaxis de cualquier afección maligna o pre-maligna, afección proliferativa o hiperproliferativa o cualquier enfermedad que surja o que se derive de o esté asociada con una alteración o anomalía funcional u otra en la capacidad o el comportamiento proliferativo de cualquier célula o tejido del cuerpo.

20 Por tanto, la invención encuentra aplicación en el tratamiento o la profilaxis de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de próstata. También encuentra aplicación en el tratamiento o la profilaxis de cánceres de los sistemas sanguíneo y linfático (que incluyen Enfermedad de Hodgkin, leucemias, linfomas, mieloma múltiple y enfermedad de Waldenström), cánceres cutáneos (que incluyen melanoma maligno), cánceres del tracto digestivo (que incluyen cánceres de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer del páncreas, cáncer de hígado, cáncer de colon y rectal, cáncer anal), cánceres de los sistemas genital y urinario (que incluyen cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), cánceres en mujeres (que incluyen cáncer de mama, cáncer ovárico, cánceres ginecológicos y coriocarcinoma) así como en cerebro, carcinoide de hueso, tumores nasofaríngeos, retroperitoneales, tiroideos y de tejidos blandos. También encuentra aplicación en el tratamiento o la profilaxis de cánceres de sitio primario desconocido.

25 Las vacunas basadas en células dendríticas de la invención también encuentran aplicación en el tratamiento o la profilaxis de diversas infecciones que incluyen infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, protozoarias y metazoarias. Por ejemplo, las vacunas se pueden usar en el tratamiento o la profilaxis de la infección por virus sincitial respiratorio (VSR), Epstein-Barr, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), herpes simple tipo 1 y 2, herpes genital, queratitis herpética, encefalitis herpética, herpes zoster, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe A, virus hantaan (fiebre hemorrágica), virus de papiloma humano (VPH), tuberculosis, lepra y sarampión.

30 Se prefiere particularmente el tratamiento o la profilaxis de infecciones en las que el patógeno ocupa un compartimento intracelular o causa la expresión de neoantígenos por células huésped, que incluyen VIH/SIDA, leishmania, tripanosomiasis, gripe, tuberculosis y malaria.

35 La presente invención también contempla una estrategia más general para la terapia basada en células DC que implica la estimulación de las células dendríticas con el compuesto de la invención sin tener en cuenta los antígenos presentes y con o sin preparación con antígenos.

40 Por tanto, la invención encuentra aplicación en terapias en las que las células dendríticas expuestas al compuesto de la invención se dirigen a tejido enfermo o infectado (por ejemplo, se inyectan directamente en un tumor), donde las células pueden preparar células T endógenas de forma extraganglionar. En tales realizaciones, la invención contempla el direccionamiento de DC a un tumor y su activación localmente para provocar respuestas inmunes sin la necesidad de carga con antígenos *ex vivo*.

45 En otra realización más, la invención contempla la vacunación con DC localmente donde el antígeno se dirige a DC *in vivo* que después se expanden e inducen para madurar localmente (mediante la co-administración de uno o más estimuladores de la maduración de DC). En tales realizaciones, el antígeno se dirige a DC endógenas mediante cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, mediante el uso de exosomas (como se describe en Thery y col. (2002) Nat Rev Immunol 2: 569-579).

50 Se puede usar cualquier clase de célula dendrítica de acuerdo con la invención. Por tanto, las células dendríticas pueden ser mieloides o linfoides o mezclas de las mismas. Las células dendríticas mieloides, si se usan, pueden ser del tipo de célula de Langerhans o DC intersticiales. Como alternativa se pueden usar mezclas de estos subconjuntos mieloides. Es especialmente preferente el uso de DC derivadas de monocitos (Mo-DC).

Se pueden usar proteínas cooperadoras para potenciar la actividad de las vacunas de células dendríticas de la invención.

Estrategias basadas en células dendríticas para trastornos autoinmunes

5 Las células dendríticas también están implicadas en la regulación y el mantenimiento de la tolerancia inmunológica: en ausencia maduración, las células inducen silenciamiento o tolerancia específica de antígenos. Por tanto, en otro paradigma de tratamiento basado en células dendríticas, las células se administran como parte de una intervención inmunomoduladora diseñada para combatir trastornos autoinmunes.

10 En tales aplicaciones, el potencial supresor de las células dendríticas se ha aumentado mediante transfección *in vitro* con genes que codifican citocinas. Sin embargo, tales estrategias de terapia génica son inherentemente peligrosas y una estrategia más eficaz y atractiva sería sensibilizar reiteradamente células dendríticas *in vitro* con compuestos biológicamente activos que estimulan un patrón de secreción de citocinas apropiado en las células dendríticas.

15 Como se ha descrito anteriormente, ahora se ha descubierto que los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden inducir producción sostenida y pronunciada de citocinas en células dendríticas. Por tanto, los compuestos de la invención encuentran aplicación en el aumento del potencial supresor de células dendríticas.

20 Por tanto, la invención encuentra aplicación en el tratamiento o la profilaxis de trastornos autoinmunes, que incluyen miastenia grave, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerodermia, polimiositis y dermatomiositis, espondilitis anquilosante y fiebre reumática, diabetes dependiente de insulina, enfermedades tiroideas (que incluyen enfermedad de Graves y tiroiditis de Hashimoto), enfermedad de Addison, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa e infertilidad masculina y femenina autoinmune.

8. Cicatrización

25 Los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden revertir una respuesta de esplenocitos de tipo Th2 *ex vivo* en un modelo de enfermedad infecciosa que no cicatriza normalmente. El IFN-gamma de esplenocito específico de antígenos puede estar aumentado significativamente y la producción de IL-5 reducida significativamente en tales modelos, lo que es indicativo de una respuesta de cicatrización.

Por tanto, la invención encuentra aplicación en el tratamiento de heridas. En particular, la invención encuentra aplicación en el tratamiento o la profilaxis de heridas y lesiones, por ejemplo, las asociadas con cicatrización posquirúrgica, quemaduras, infección (por ejemplo, lesiones necróticas), neoplasia o traumatismo (por ejemplo, asociado a trastornos cardiovasculares tales como ictus o inducido como parte de una intervención quirúrgica).

30 Los tratamientos de heridas pueden implicar la supresión selectiva o eliminación de una respuesta de Th2 (por ejemplo, para eliminar o suprimir una respuesta inflamatoria inapropiada o dañina).

Posología

35 Los compuestos de pirrolizidina de la presente invención se pueden administrar a través de vías orales o parenterales, que incluyen administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, por vía aérea (aerosol), rectal, vaginal y tópica (que incluyen bucal y sublingual).

La cantidad del compuesto de pirrolizidina administrado puede variar ampliamente de acuerdo con la unidad de dosificación particular empleada, el periodo de tratamiento, la edad y el sexo del paciente tratado, la naturaleza y el alcance del trastorno tratado y el compuesto de pirrolizidina particular seleccionado.

40 Además, los compuestos de pirrolizidina de la invención se pueden usar junto con otros agentes que se sabe que son útiles en el tratamiento de enfermedades, trastornos o infecciones donde está indicada la inmunoestimulación (como se describe más adelante) y en tales realizaciones, la dosis se puede ajustar correspondientemente.

45 En general, la cantidad eficaz del compuesto de pirrolizidina administrado variará generalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a 500 mg/kg diariamente. Una dosificación unitaria puede contener de 0,05 a 500 mg del compuesto de pirrolizidina y puede tomarse una o más veces por día. El compuesto de pirrolizidina se puede administrar con un medio de soporte farmacéutico usando formas unitarias de dosificación convencionales por vía oral, por vía parenteral o por vía tópica, como se describe más adelante.

50 La vía de administración preferida es la administración oral. En general, una dosis adecuada estará en el intervalo de 0,01 a 500 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferentemente en el intervalo de 0,1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día y más preferentemente en el intervalo de 1 a 5 mg por kilogramo de peso corporal por día.

La dosis deseada se presenta preferentemente como una dosis única para administración diaria. Sin embargo, también se pueden emplear dos, tres, cuatro, cinco o seis o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del día.

Estas subdosis pueden administrarse en formas de dosificación unitaria, por ejemplo, que contienen de 0,001 a 100 mg, preferentemente de 0,01 a 10 mg y más preferentemente de 0,5 a 1,0 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Formulación

- 5 Las composiciones de la invención comprenden el compuesto de pirrolizidina de la invención, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El compuesto de pirrolizidina de la invención puede adoptar cualquier forma. Puede ser sintético, estar purificado o aislado de fuentes naturales (por ejemplo, de *Casuarina equisetifolia* o *Eugenia jambolana*), usando técnicas descritas en la materia (y a las que se hace referencia más adelante).

- 10 Cuando se aísla de una fuente natural, el compuesto de pirrolizidina de la invención puede estar purificado. Sin embargo, las composiciones de la invención pueden adoptar la forma de medicinas herbarias como se ha definido anteriormente en el presente documento. Tales medicinas herbarias preferentemente se analizan para determinar si cumplen una especificación convencional antes del uso.

- 15 Las medicinas herbarias para su uso de acuerdo con la invención pueden ser material vegetal seco. Como alternativa, la medicina herbaria puede ser material vegetal procesado, implicando el procesamiento pre-procesamiento físico o químico, por ejemplo, pulverización, molienda, congelación, evaporación, filtración, compresión, secado por pulverización, extrusión, extracción con disolvente supercrítico y producción de tintura. En los casos en los que la medicina herbaria se administra o se vende en forma de una planta entera (o una parte de la misma), el material vegetal se puede secar antes del uso. Se puede usar cualquier forma de secado conveniente, incluyendo secado por congelación, secado por pulverización o secado al aire.

- 20 En realizaciones en las que el compuesto de pirrolizidina de la invención se formula junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, se puede usar cualquier excipiente adecuado, incluyendo, por ejemplo, diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato sódico y cálcico y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar cualquier forma adecuada e incluir, por ejemplo, comprimidos, elixires, cápsulas, soluciones, suspensiones, polvos, gránulos y aerosoles.

- 30 La composición farmacéutica puede adoptar la forma de un kit de partes, kit que puede comprender la composición de la invención junto con instrucciones para su uso y/o una pluralidad de diferentes componentes en forma de dosificación unitaria.

- 35 Los comprimidos para uso oral pueden incluir el compuesto de pirrolizidina de la invención, en solitario o junto con otro material vegetal asociado con la fuente o las fuentes botánicas (en el caso de realizaciones de medicina herbaria). Los comprimidos pueden contener el compuesto de pirrolizidina de la invención mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato sódico y cálcico y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos se pueden revestir con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

- 45 Las cápsulas para uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura en las que el compuesto de pirrolizidina de la invención está mezclado con un diluyente sólido y cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo está mezclado con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

- 50 Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen, además del ingrediente activo, medios de soporte tales como se conocen en la técnica por ser apropiados.

Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, los compuestos de la invención generalmente se proporcionarán en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas a un pH e isotonicidad apropiados.

Los vehículos acuosos adecuados incluyen solución de Ringer y cloruro sódico isotónico. Las suspensiones acuosas de acuerdo con la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato

sódico, polivinilpirrolidona y goma tragacanto y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen *p*-hidroxibenzoato de etilo y *n*-propilo.

Los compuestos de la invención también se pueden presentar como formulaciones de liposomas.

5 Para la administración oral, el compuesto de pirrolizidina de la invención se puede formular en preparaciones sólidas o líquidas, tales como cápsulas, píldoras, comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, fusiones, polvos, gránulos, soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones (soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones que pueden ser acuosas o no acuosas). Las formas de dosificación unitaria sólidas pueden ser una cápsula que puede ser del tipo de gelatina de envuelta dura o blanda corriente que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes tales como lactosa, sacarosa, fosfato cálcico y almidón de maíz.

10 En otra realización, los compuestos de pirrolizidina de la invención se comprimen hasta dar comprimidos con bases de comprimido convencionales, tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como goma arábica, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes que tienen por objeto ayudar a la ruptura y disolución del comprimido después de la administración, tales como almidón de patata, ácido algínico, almidón de maíz y goma guar, lubricantes que tienen por objeto mejorar el flujo de granulaciones de comprimido y evitar la adhesión de material de comprimido a las superficies de los moldes y troqueles de comprimido, por ejemplo, talco, ácido esteárico o estearato de magnesio, calcio o cinc, tintes, agentes colorantes y agentes saporíferos que tienen por objeto aumentar las calidades estéticas de los comprimidos y hacer que los mismos sean más aceptables para el paciente.

15 Los excipientes adecuados para su uso en formas de dosificación líquidas orales incluyen diluyentes tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de pirrolizidina de la invención también se pueden administrar por vía parenteral, es decir, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía intraperitoneal.

25 En tales realizaciones, el compuesto de pirrolizidina se proporciona como dosis inyectables en un diluyente fisiológicamente aceptable junto con un medio de soporte farmacéutico (que puede ser un líquido estéril o una mezcla de líquidos). Los líquidos adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol (tal como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico), glicoles (tales como propilenglicol o polietilenglicol), cetales de glicerol (tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol), éteres (tales como poli(etilenglicol) 400), un aceite, un ácido graso, un éster o glicérido de ácido graso o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable (tal como un jabón o un detergente), agente de suspensión (tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa) o un agente emulsionante u otros adyuvantes farmacéuticos. Los aceites adecuados que se pueden usar en las formulaciones parenterales de la presente invención son la de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, vaselina y aceite mineral.

30 Los ácidos grasos adecuados incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. Los ésteres de ácidos grasos adecuados son, por ejemplo, oleato de etilo y miristato de isopropilo.

35 Los jabones adecuados incluyen sales de metal alcalino graso, amonio y trietanolamina y los detergentes adecuados incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, haluros de alquil piridinio y acetatos de alquilaminas; detergentes aniónicos, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido y sulfosuccinatos; detergentes no iónicos, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxitileno-polipropileno; y detergentes anfóteros, por ejemplo, beta-aminopropionatos de alquilo y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina así como mezclas.

45 Las composiciones parenterales de la presente invención contendrán normalmente de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 25 % en peso del compuesto de pirrolizidina de la invención en solución. También se pueden usar conservantes y tampones. Para minimizar o eliminar la irritación en el punto de inyección, tales composiciones pueden contener un tensioactivo no iónico que tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones varía de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 15 % en peso. El tensioactivo puede ser un único componente que tiene el anterior HLB o puede ser una mezcla de dos o más componentes que tienen el HLB deseado. Es ilustrativa de los tensioactivos usados en formulaciones parenterales la clase de ésteres de ácido graso de polietileno sorbitano, por ejemplo, monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formada mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

50 Los compuestos de pirrolizidina de la invención también se pueden administrar por vía tópica y cuando se hace de este modo, el medio de soporte puede comprender de forma adecuada una base de solución, pomada o gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes, tales como agua y alcohol y emulsionantes y estabilizantes. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del compuesto de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 %

p/v (peso por unidad de volumen).

5 Cuando se usan de forma accesoria, los compuestos de pirrolizidina de la invención pueden formularse para su uso con uno o más fármacos adicionales. En particular, los compuestos de pirrolizidina de la invención se pueden usar en combinación con agentes antitumorales, agentes antimicrobianos, antiinflamatorios, agentes antiproliferativos y/u otros agentes inmunomoduladores (por ejemplo, inmunoestimuladores). Por ejemplo, los compuestos de pirrolizidina de la invención se pueden usar con agentes antivíricos y/o antiproliferativos tales como citocinas, que incluyen interleucinas 2 y 12, interferones e inductores de los mismos, factor de necrosis tumoral (TNF) y/o factor de crecimiento transformante (TGF) así como con agentes mielosupresores y/o agentes quimioterapéuticos (tales como doxorubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida y metotrexato), isoniazida (por ejemplo, en la prevención o el tratamiento de neuropatía periférica) y con analgésicos (por ejemplo AINE) para la prevención y el tratamiento de úlceras gastroduodenales.

15 Por tanto, el uso accesorio puede reflejarse en una dosificación unitaria específica diseñada para ser compatible (o para sinergizar) con el otro o los otros fármacos o en formulaciones en las que el compuesto de pirrolizidina se mezcla con uno o más agentes antitumorales, agentes antimicrobianos y/o antiinflamatorios (o se asocia de otro modo físicamente con el otro fármaco o los otros fármacos en una única dosis unitaria). Los usos accesorios también se pueden reflejar en la composición de los kits farmacéuticos de la invención, en los que el compuesto de pirrolizidina de la invención está co-ensado (por ejemplo, como parte de una serie de dosis unitarias) con los agentes antitumorales, agentes antimicrobianos y/o antiinflamatorios. El uso accesorio también se puede reflejar en información y/o instrucciones relacionadas con la co-administración del compuesto de pirrolizidina con agentes antitumorales, agentes antimicrobianos y/o antiinflamatorios.

Ejemplificación

25 La invención se describirá a continuación con referencia a Ejemplos específicos. Estos son meramente a modo de ejemplo y solamente para fines ilustrativos: no tienen por objeto ser limitantes en absoluto del ámbito del monopolio reivindicado o de la invención descrita. Estos ejemplos constituyen el mejor modo contemplado actualmente para llevar a la práctica la invención.

Ejemplo 1: inducción de secreción de IL-12 en células dendríticas

Ratones

Se usaron ratones macho y hembra BALB/c criados y mantenidos en la Universidad de Strathclyde en condiciones convencionales a las 8 semanas de edad.

Aislamiento de médula ósea y cultivo de células dendríticas

30 Se obtuvo médula ósea de los fémures de ratones. Los fémures se lavaron en etanol al 70 % y se pusieron en una placa de petri limpia. Se inyectó médula de células dendríticas (DC) (factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) al 2,5 %, suero fetal bovino activado por calor al 10 %, L-glutamina al 1 %, Penicilina/Estreptomina al 1 % en medio RPMI-1640) en la médula ósea del fémur mediante una acción de bombeo y se recogieron las células y el medio. Se añadió 1 ml de las células en medio a un matraz de 75 cm² con 15 ml de medio de DC. Después, los matraces se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir el crecimiento y desarrollo de DC. Después de 5 días se añadieron 10 ml adicionales de medio de DC.

Recogida de células dendríticas

40 Después de 10 días de incubación de la médula ósea con GM-CSF, se recogieron las células dendríticas. Este procedimiento se realizó en una campana de cultivo tisular. Los contenidos de los matraces se vertieron en tubos de centrifuga para garantizar la recogida de DC flotantes. Aproximadamente 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada se añadió a cada matraz vacío, los matraces se agitaron cuidadosamente y se recogieron los contenidos. Esto garantizó la recuperación de DC adhesivas. Los contenidos recogidos de los matraces se centrifugaron durante 5 minutos a 200 g y el sedimento se resuspendió en 2 ml de medio de DC sin GM-CSF. Después se realizó un recuento celular.

Recuento celular y condiciones de ensayo

Las células se recontaron usando un hemocitómetro. Aproximadamente 20 µl de las células resuspendidas se pipetearon en la cámara del hemocitómetro, las células se ajustaron hasta la concentración celular correcta (aproximadamente 5×10^4 y no menos de 1×10^4 por pocillo) y después se sembraron para el ensayo.

50 Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C con CO₂ al 5 % y se dejó que se asentaran (la recogida las estimula). Al día siguiente se añadieron los compuestos (50 µg/ml y 20 µg/ml) y los controles, después se incubó de nuevo a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 24 h (o 48 h). La recogida y adición de los compuestos se realizaron todas en una campana. Después, las placas se congelaron para destruir las células y una vez descongeladas se analizó el sobrenadante como se describe más adelante.

Medición de IL-12

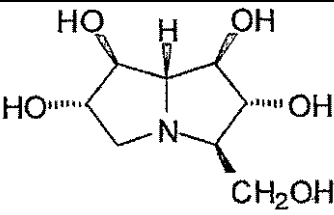
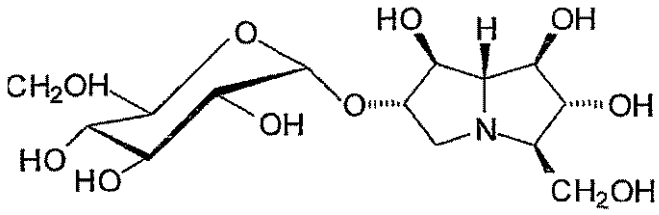
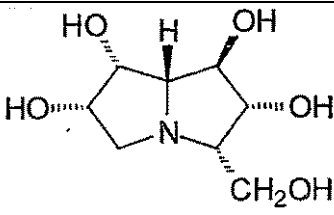
Usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se midió la concentración de IL-12 en los sobrenadantes. Todos los reactivos usados en este ensayo eran de PharMingen. Se revistió una placa de ELISA de fondo plano de 96 pocillos con MAb de rata anti-IL-12 de ratón purificado (p40/p70) (Cat N° 554478) a 2 µg/ml diluido en PBS pH 9,0 a 50 µl/pocillo. Después, la placa se cubrió con film adherente y se incubó a 4 °C. Después de 5
10
15
20
25

Se añadió MAb anti-IL-12 de ratón marcado con biotina (p40/p70) (Cat N° 18482D) a 1 µg/ml (diluido en tampón de bloqueo) a cada pocillo a un volumen de 100 µl/pocillo. La placa se cubrió con film adherente y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, la placa se lavó 5 veces, se secó y se añadió el conjugado. Se añadió Estreptavidina-AKP (Cat N° 13043E) a 100 µl/pocillo a una dilución de 1/2000 en tampón de bloqueo seguido de incubación bajo film adherente a 37 °C durante 45 minutos.

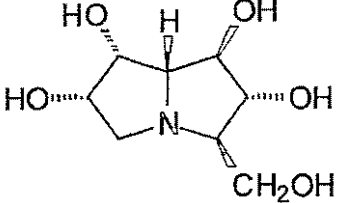
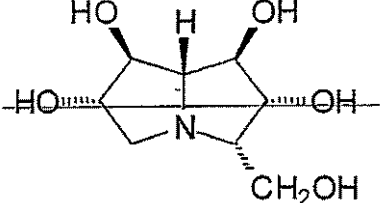
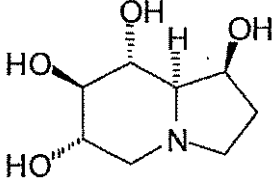
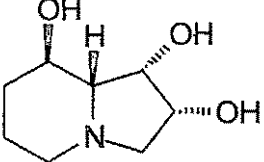
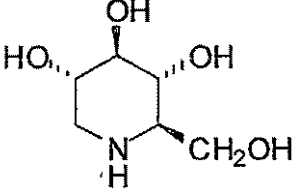
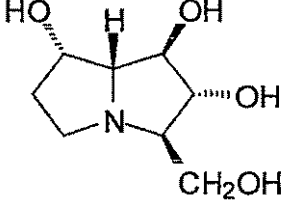
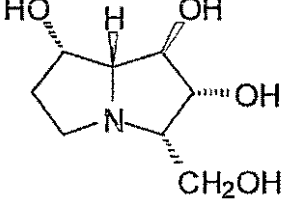
La placa se lavó finalmente 6 veces, se secó y se añadió sustrato: pNPP (Sigma) en tampón glicina a 1 mg/ml se añadió a 100 µl/pocillo. Después, la placa se cubrió con papel de estaño, se incubó a 37 °C y se comprobó cada 30 minutos para un cambio de color.

La placa, después, se leyó a 405 nm usando un espectrómetro SPECTRAmax 190. Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2, en las que LPS es lipopolisacárido, IFN-g es interferón gamma, 462a es casuarina (8), 462b es casuarina-6- α -D-glucopiranososa (9), 23 es 7-epicasuarina (11) y 24 es 3,7-diepi-casuarina (10).

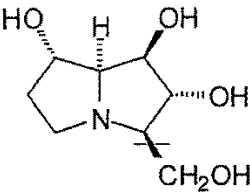
Cuando se ensayó a 50 µg/ml en el mismo ensayo, la swainsonina (4) no consiguió inducir la secreción de IL-12. En la Tabla 1.1 a continuación se muestran estudios similares con otros compuestos con fines comparativos.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	LIBERACIÓN DE IL-12
casuarina (8)		Sí
casuarina-6- α -D-glucopiranososa (9)		Sí
3,7-diepi-casuarina (10)		Sí

(continuación)

COMPUESTO	ESTRUCTURA	LIBERACIÓN DE IL-12
7- <i>epi</i> -casuarina (11)		Sí
3- <i>epi</i> -casuarina (14)		Sí
Castanospermina (20)		No
Swainsonina (4)		No
1-Desoxinojirimicina (DNJ) (21)		No
7- <i>epi</i> alexina (22)		No
3,7a-di <i>epi</i> alexina (23)		No

(continuación)

COMPUESTO	ESTRUCTURA	LIBERACIÓN DE IL-12
Alexina (1)		No

Ejemplo 2: estimulación de la producción de IL-2 por células dendríticas

Se realizaron los protocolos descritos en el anterior Ejemplo 1 pero los Mab y patrones apropiados para la determinación de IL-2 se sustituyeron. Los resultados se muestran en la Tabla 2.1 a continuación.

Tratamiento	IL-2 (unidades/ml)
LPS	0,00
LPS +IFN- γ	0,00
3,7-diepi-casuarina (10)	0,00
3,7-diepi-casuarina (10) + LPS	0,69

5 Ejemplo 3: modulación de citocinas en células esplénicasRatones

Se usaron ratones macho y hembra BALB/c criados y mantenidos en la Universidad de Strathclyde en condiciones convencionales a edad variable.

Aislamiento de células esplénicas y cultivo de células esplénicas

- 10 El bazo de ratón se retiró asépticamente y se puso en una placa de Petri estéril que contenía 5 ml de medio completo (RPMI, L-glutamina al 1 %, Penicilina/Estreptomina al 1 % y suero fetal bovino al 10 %). Se prepararon suspensiones celulares usando el final de una jeringa y moliendo el bazo a través de una malla metálica. Después, las suspensiones celulares se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Para retirar los eritrocitos, el sedimento celular se resuspendió en solución de Boyle (Tris 0,17 M y Cloruro de Amonio 0,16 M) y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos. Después, el sedimento se lavó en medio dos veces más, después se resuspendió en 3 ml de medio. Después se realizó un recuento celular.

Protocolo experimental

- 20 Todos los experimentos de células esplénicas se realizaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Se añadieron alícuotas de 100 μ l de 5×10^5 células/pocillo a todos los pocillos y cada pocillo tenía un volumen final de 200 μ l. Los pocillos no estimulados contenían 100 μ l de células y 100 μ l de medio. Los pocillos estimulados contenían 100 μ l de células más 50 μ l de LPS a 1 μ g/ml o 50 μ l de anti-CD3 a 0,5 μ g/ml y 50 μ l de medio. Los pocillos restantes contenían 100 μ l de células, 50 μ l de compuesto de MNLP y 50 μ l de anti-GD3 o medio en solitario.

Medición de IL-12, IL-2, IL-5 e IFN- γ

- 25 Los Mab y patrones apropiados se usaron de acuerdo con el protocolo descrito para IL-12 (descrito anteriormente en el Ejemplo 1). Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 3.1-3.3.

Tabla 3.1: promoción de producción de IFN- γ (células T) de esplenocito activado

Tratamiento	IFN- γ (ng/ml)
Ninguno (control)	0,64
α CD3	3,21
3,7-diepi-casuarina (10)	0,22
3,7-diepi-casuarina (10) + α CD3	13,50

Tabla 3.2: efecto de castanospermina sobre la producción de IFN- γ de esplenocito

Tratamiento	IFN- γ (ng/ml)
Ninguno (control)	<1,0
α CD3	22,5
Castanospermina (20)	<1,0
Castanospermina (20) + α CD3	9,0

Como se puede ver a partir de los resultados mostrados en las Tablas 3.1 y 3.2, los compuestos de acuerdo con la invención estimulan la secreción/producción de IFN- γ en esplenocitos, mientras que la castanospermina inhibe la producción de esta citocina en tales ensayos. Ensayos similares realizados con 1-Desoxinojirimicina (DNJ) (21) mostraron que este imino azúcar también inhibió la secreción/producción de IFN- γ en esplenocitos (datos no mostrados).

Ejemplo 4: inhibición de la actividad de glucosidasa

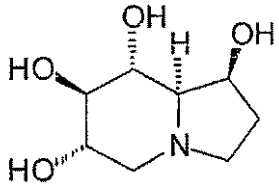
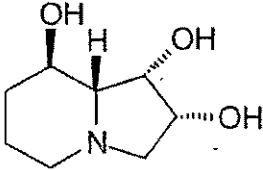
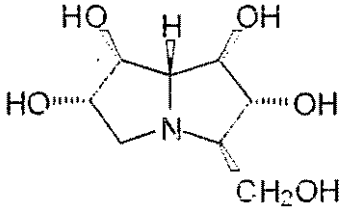
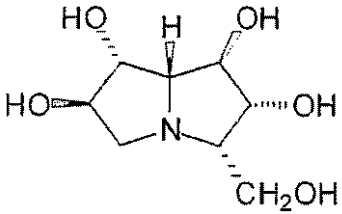
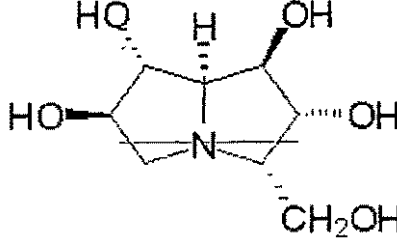
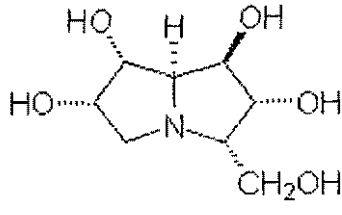
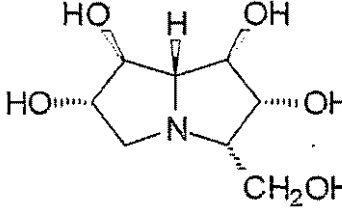
Todas las enzimas se adquirieron en Sigma al igual que los sustratos apropiados de *p*-nitrofenilo. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación. Las enzimas se ensayaron en tampones ácido cítrico 0,1 M/hidrogenofosfato disódico 0,2 M (Mollvaine) a pH óptimo para la enzima. Todos los ensayos se realizaron a 20 °C. Para ensayos de exploración, el ensayo de incubación consistió en 10 μ l de solución enzimática, 10 μ l de solución de inhibidor (preparado en agua) y 50 μ l del sustrato apropiado de *p*-nitrofenilo 5 mM (concentración final 3,57 mM) preparado en tampón Mollvaine a pH óptimo para la enzima.

Las reacciones se detuvieron con glicina 0,4 M (pH 10,4) durante la fase exponencial de la reacción, que se determinó al comienzo del ensayo usando blancos con agua, que se incubaron durante una variedad de periodos de tiempo para medir la velocidad de reacción usando solución de sustrato 5 mM. Las absorbancias de punto final se leyeron a 405 nm con un lector de placas de microtitulación Biorad (Benchmark). Los inhibidores se sustituyeron por agua en los blancos.

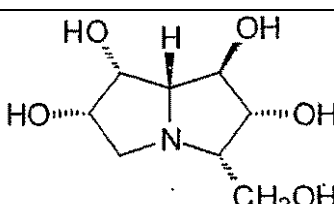
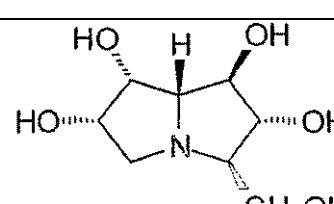
Las enzimas ensayadas se muestran en la Tabla 4.1 a continuación.

Enzima	Fuente	pH	Conc.	Sustrato
α -D-glucosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura de panadero), arroz (<i>Oryza sativa</i>), <i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,0	0,1 unidades/ml	PN- α -D-glucopiranosido
β -D-glucosidasa	Almendras (<i>Prunus</i> sp.)	5,0	0,2 unidades/ml	PNP- β -D-glucopiranosido
α -D-galactosidasa	Semillas de café verde (<i>Coffea</i> sp.)	6,5	1 unidades/ml	PNP- α -D-galactopiranosido
β -D-galactosidasa	Hígado bovino	7,3	0,1 unidades/ml	PNP- β -D-galactopiranosido
α -D-manosidasa	Judía sable (<i>Canavalia ensiformis</i>)	4,5	0,1 unidades/ml	PNP- α -D-manopiranosido
α -L-fucosidasa	Riñón bovino			
<i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminidasa	Riñón bovino	4,25	0,1 unidades/ml	PNP- <i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminida
Naringinasa	<i>Penicillium decumbens</i>	4,0	1 unidades/ml	PNP- α -L-ramnopiranosido

Los compuestos ensayados se muestran en la Tabla 4.2 a continuación.

Nombre del compuesto	Estructura	Referencia
Castanospermina		20
Swainsonina		4
Casuarina		8
3,6,7-triepi-casuarina		12
3,6,7,7a-tetraepi-casuarina		21
3,7,7a-triepi-casuarina		22
3-epi-casuarina		14

(continuación)

Nombre del compuesto	Estructura	Referencia
3,7,-diepi-casuarina		10
3-epi-casuarina		11

Los resultados (% de inhibición) para varios compuestos diferentes (todos a 1 mg/ml) se muestran en la Tabla 4.3 a continuación:

Compuesto/ Enzima	20	4	8	12	21	22	14	10	11
gluc (levadura)	-8	nd	64	2	-1	29	0	-2	11
gluc (arroz)	77	nd	76	0	46	0	13	7	73
gluc (<i>Bacillus</i>)	6	nd	86	9	-2	87	12	-7	5
glucosidasa	88	nd	0	6	44	52	56	5	30
galactosidasa	-3	nd	4	2	-3	-2	4	-11	1
galactosidasa	16	nd	0	6	3	52	6	24	35
manosidasa	9	74	5	8	1	-1	-4	8	10
fucosidasa	3	nd	-1	-11	nd	nd	-2	5	25
Naringinasa	39	nd	-2	0	5	10	21	6	-4
N-acetil-β-gluc	16	nd	14	19	27	11	-1	-6	11

5 Los resultados muestran que el perfil de inhibición para los compuestos de la invención es bastante diferente del de la castanospermina. Ninguno inhibe la manosidasa significativamente (véase también datos adicionales más adelante). Algunos de los compuestos ensayados (por ejemplo, 3,7-diepi-casuarina) no inhiben significativamente ninguna de las enzimas ensayadas.

10 Estudios adicionales mostraron que la K_i para casuarina (8) con α -D-glucosidasa de levadura fue 217 μ M (no siendo inhibidora la castanospermina a una concentración de 800 μ M). La K_i para la castanospermina (20) con β -D-glucosidasa de almendra fue 9 μ M (no siendo inhibidora la casuarina a 800 μ M). Además, la casuarina también inhibió la α -D-glucosidasa de mucosa intestinal de conejo con un valor de CI_{50} de 210 μ M en comparación con un valor de CI_{50} de 8 μ M para castanospermina. Tanto la casuarina como la castanospermina inhibieron la sacarasa de intestino delgado de conejo a una concentración de 700 μ M. La castanospermina también inhibió a la lactasa y trehalasa de intestino delgado de conejo en más del 50 % a esta concentración.

15 Ejemplo 5: inhibición diferencial de manosidasa y glucosidasa

Los perfiles inhibidores de glucosidasa de swainsonina (4), casuarina (8) y casuarina-glucósido (9) con respecto a una manosidasa y una glucosidasa se compararon. Los resultados (todos a <0,1 mg/ml) se muestran en la Tabla 5.1 a continuación.

Compuesto	Inhibición de manosidasa	Inhibición de glucosidasa I
Swainsonina (4)	+	-
Casuarina (8)	-	+
Casuarina-glucósido (9)	-	+

Ejemplo 6: tratamiento de infección por HSV-1 murino

Los ratones eran BALB/c hembra de 3-4 semanas de edad. A los ratones se inoculó 10⁴ unidades formadoras de placas de HisV-1 (SC16) usando el procedimiento de la piel del cuello. Esta dosis es subletal pero produce síntomas clínicos, que incluyen inflamación (medida mediante aumento en el grosor del pabellón auditivo).

5 A los ratones se les administró (100 ml i.p.) una o dos dosis de casuarina (8) el día uno y diariamente después de esto durante 5 días. El grupo 1 recibió 15 mg/kg en PBS, el grupo 2 recibió 150 mg/kg en PBS. Un grupo 3 de control negativo se infectó pero no recibió casuarina. A un grupo 4 de control positivo se administró famciclovir (a través del agua de la bebida con enriquecimiento a 1 mg/ml durante el mismo periodo de tiempo).

10 Los ratones se controlaron diariamente y se obtuvieron muestras de ratones sacrificados en días seleccionados. Los resultados se presentan en las Tablas 6.1 - 6.3, a continuación.

Tabla 6.1: peso (% de cambio)

	Grupo			
Día	1	2	3	4
-1				
0	3,1	3,2	1,3	9
1	5,6	5,8	4,6	13
2	5,6	5,2	6,5	14,5
3	8,6	7,1	9,3	18,8
4	7,4	5,8	9,8	18,1
5	8,6	8,4	10,5	21
6	9,2	9,7	12,4	23,9
7	7,4	7,7	11,1	21
8	9,3	8,4	13,7	23,9

Tabla 6.2: peso medio de grupo (g)

	Grupo			
Día	1	2	3	4
-2	16,2	15,5	15,3	13,8
-1				
0	16,7	16	15,5	15,1
1	17,1	16,4	16	15,6
2	17,1	16,3	16,3	15,8
3	17,6	16,6	16,7	16,4
4	17,4	16,4	16,8	16,3
5	17,6	16,8	16,9	16,7
6	17,7	17	17,2	17,1
7	17,4	16,7	17	16,7
8	17,7	16,8	17,4	17,1
9			17,3	17,1
10			17,4	17,2
11			17,3	17,1
12			17,3	17,2

Tabla 6.3: grosor de pabellón auditivo (mm⁻²)

	Grupo			
Día	1	2	3	4
-2	0	0	0	0
-1				
0	0,7	0,7	2,2	0
1	0	3,6	4,4	0
2	13,9	23,4	14,7	0
3	9	5,7	17,7	7
4	9	9,2	26,5	7
5	7,6	2,1	12,5	0
6	12,5	14,9	13,2	4
7	6,2	0	11	0
8	0	12,1	6,6	2,9
9			11,8	2,9
10			14	10,7
11			11	2,9
12			7,4	12,9
13			16,2	12,9

Los resultados muestran el patrón esperado del aumento de grosor de pabellón auditivo, alcanzando el máximo el día 4. El famvir casi anuló completamente la respuesta de grosor de oído. La casuarina a ambas dosis ensayadas también produjo una reducción en el grosor de oído.

5 Ejemplo 7: Control de metástasis de pulmón en ratones

Se expusieron ratones (C57/bl6 bajo anestesia con ketamina i/p) i/v (vena de la cola) a 5×10^4 células tumorales B16-F10 en un volumen final de 100 μ l por ratón el día 0. Los compuestos de ensayo (850 mg/kg en 200 μ l de solución salina no pirógena estéril) se administraron s/c (flanco derecho) los días 2 y 4. El día 14, los ratones se sacrificaron y los pulmones se diseccionaron y se tiñeron en solución de tinta china (150 ml de agua bidestilada, 30 ml de tinta china, 4 gotas de NH₄OH) durante 10 minutos, después se fijaron durante al menos 24 h en solución de Fajete (90 ml de formaldehído al 37 %, 900 ml de EtOH al 70 % y 45 ml de ácido acético glacial). Las metástasis en los pulmones teñidos y fijados después se pudieron visualizar, recontar y fotografiar.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7.1.

Compuesto	Morfología metastásica
PBS (control)	Metástasis a lo largo de toda la superficie del pulmón
casuarina (8)	Metástasis restringida a la punta apical del pulmón
3-epi-casuarina (14)	Metástasis restringida a la punta apical del pulmón

Ejemplo 8: Efecto sobre la glucosilación de células de cáncer de mama

15 Cultivo celular

Se tomaron células MCF-7 (Colección Europea de Cultivos Celulares Ref. 86012803) de la reserva mantenida en nitrógeno líquido, se descongelaron a temperatura ambiente y se transfirieron a 10 ml de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco con F12 de Hams, Hepes 15 mM y L-glutamina (DMEM: Cambrex Cat. N° BE12-719F) complementado con suero fetal bovino al 10 % v/v (FCS: BioWest Labs Cat. N° S02755, Lote N° S1800). El FCS se pre-filtró a través de un filtro estéril de 0,2 μ m.

20

Después, las células se centrifugaron a 1.500 rpm en una centrífuga de sobremesa Centaur y se retiró el sobrenadante. Las células se reconstituyeron en medio fresco y se sembraron en dos matraces de cultivo tisular Nunclon T75 cm³ y se dejaron reposar durante una noche a 37 °C en incubador de CO₂ al 5 %. Los matraces se envolvieron en film adherente para evitar la contaminación cruzada y al siguiente día se cambió el medio para incluir los antibióticos penicilina y estreptomycin así como una medida de precaución contra infección (a concentraciones de 1 mg/cm³ y 5 mg/cm³, respectivamente).

Las células se dejaron crecer casi hasta confluencia y después se dividieron a 1 en 4 de resuspensión. Las células usadas para los experimentos fueron del número de pase 31. Se prepararon dos matraces de células en medio que contenía FCS al 20 % v/v con dimetilsulfóxido al 10 % y se depositaron en nitrógeno líquido para uso posterior si fuese necesario.

Se usó un total de 16 matraces T25cm³. Cada matraz se sembró con 8,5 x 10⁵ células/cm³ y se añadieron 4 cm³ de medio. Se dejó que las células se adhirieron durante una noche al matraz de cultivo. A la mañana siguiente, los matraces se observaron bajo el microscopio óptico y las células parecieron confluentes al 50-60 %. Las células de dos de los matraces se recogieron (véase más adelante) para el punto de tiempo t = 0.

Los restantes 14 matraces estaban disponibles para el ensayo con casuarina (8). A siete de estos (grupo no tratado) se cambió su medio por 7 cm³ de medio fresco que contenía FCS al 10 %, penicilina y estreptomycin (como anteriormente), mientras que los siete restantes se incubaron con medio fresco complementado con casuarina 0,75 mM (grupo tratado).

Las células se recogieron a t=1,5 horas, t=28 horas, t=62 horas y t=86 horas.

20 Recogida de células y recuento celular

Las células se recogieron usando un procedimiento no enzimático. En cada uno de los puntos de tiempo, las células se visualizaron bajo el microscopio óptico invertido y se evaluó la morfología. Antes de la recogida, las células se lavaron con PBS estéril, tres veces, 7cm³ por lavado. Las células después se rasparon de los matraces usando un raspador de células estéril y se transfirieron a tubos de Grenier. Las células se pasaron rápidamente a través de una aguja de calibre 21 G2 para desagregar las células. Las células después se sedimentaron mediante centrifugación a 1500 g/5 min y se resuspendieron en un volumen conocido de PBS. El número de células se recontó después en un hemocitómetro y se evaluó la viabilidad celular mezclando 0,1 cm³ de cada suspensión celular con una gota de solución de azul tripano. Cada uno de los sedimentos celulares se congeló a -80 °C hasta la liberación y análisis de glucano.

30 Homogeneización

Los sedimentos celulares se pusieron en un baño de agua helada y se dejaron descongelar. Los sedimentos después se homogeneizaron en un total de 4 cm³ (preparados hasta un volumen con agua desionizada). Se usó con este fin un homogeneizador Ultraturax T25, con la velocidad de la cuchilla ajustada a 22.500 rpm. Las muestras se mantuvieron en hielo y se aplicaron 3 ráfagas, cada una de 10 s, con un periodo de aproximadamente 1 min entre cada etapa de homogeneización para permitir que se asentara la espuma. La cuchilla se lavó cuidadosamente entre cada una de las muestras para evitar contaminación cruzada de muestras. Los homogenados se almacenaron en alícuotas de 1 cm³ a -80 °C antes del ensayo de proteína y liberación de glucano.

Ensayo de proteína

Evaluado usando el ensayo de proteína BioRad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó BSA como patrón. Cada una de las muestras de homogenado se ensayó por duplicado usando alícuotas de 100 µl de cada punto de tiempo.

Liberación de glucano

Para los puntos de tiempo de 62 horas y 86 horas se tomó el equivalente de 25 µg de proteína y se secó durante 3 horas en un evaporador de tipo centrífuga (sin calentamiento). Para los puntos de tiempo anteriores, cuya concentración de proteína no se pudo evaluar con el ensayo de proteína, se tomaron 200 µl y se secaron preparados para la liberación de glucano. La liberación se confirmó usando 25 µg de fetuina de suero fetal bovino.

Los glucanos se incubaron a 37 °C durante una noche con *N*-glucosidasa F (Roche Biosciences Cat. N° 1365185, Lote N° 9280212/31) a una concentración final de 5 U de enzima en 25 µl de muestra todos en tampón fosfato sódico 20 mM pH 7,2. Después de la etapa de incubación, las muestras se cargaron en cartuchos prelavados y cebados Ludger Clean E (Cat. N° LC-E10-A6). Los glucanos se eluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se secaron mediante evaporación de tipo centrífuga durante una noche.

Marcaje de glucano

5 Los glucanos se marcaron mediante aminación reductora durante 2 horas a 65 °C de acuerdo con el procedimiento descrito por Bigge y col. (1995) Anal. Biochem. 230(2): 229-238. La mezcla de incubación después se "limpió" para retirar cualquier fluoróforo no conjugado aplicando puntualmente las muestras sobre papel Whatman 3MM y procesando en un depósito de cromatografía descendente con una fase móvil de butanol:etanol:agua 4:1:1 durante una noche. Después, los glucanos se eluyeron con 0,5 cm³ de metanol y 2 x 1 cm³ de agua de calidad de HPLC, después se filtraron a través de un filtro de punta de jeringa de 0,2 µm.

Análisis usando HPLC de fase normal

10 Los glucanos se separaron en una columna de HPLC (interacción hidrófila) de fase normal (LudgerSep N1 amida) de 4,6 x 25 cm de tamaño.

15 La base de la separación se describe en Guile y col. (1996) Anal. Biochem. 240(2): 210-226. La columna se instaló en un sistema Dionex BioLC con automuestreador y cabezas de bomba cambiantes y mezcladora en línea. La columna se mantuvo a 30 °C y los glucanos se detectaron usando un fluorímetro de Perkin Elmer LS30 con excitación $\lambda = 330$ nm y emisión $\lambda = 420$ nm, la ganancia se ajustó en 2. El sistema de tampón usado fue el sistema de alto contenido en sales con acetonitrilo como tampón A y formiato de amonio 0,25 M pH 4,4 como tampón B. El caudal se mantuvo en 0,3 cm³/min a lo largo de esto.

El protocolo usado se resume a continuación en la Tabla 8.1.

Tiempo (min)	% A	% B	Comentario
0	80	20	Elución de glucanos ligados a N
132	47	53	
135	0	100	Elución de grandes glucanos cargados
142	0	100	
145	80	20	Reequilibrado
180	80	20	Final del procesamiento

Una alícuota de 80 µl de cada una de las mezclas de glucano se cargó en la columna y la posición de elución se comparó con referencia a un hidrolizado de dextrano.

20 Resumen de resultados y conclusiones

25 En el punto de recogida inicial y en el punto de tiempo de 28 horas no hubo diferencias obvias entre los glucanos liberados de las células tratadas y no tratadas (datos no mostrados). Sin embargo, en los puntos de tiempo de 62 y 86 horas, las células no tratadas mostraron una marcada preponderancia de glucanos ligados a N de mayor tamaño que sus equivalentes tratadas (datos no mostrados). Además, la señal global (cantidad de glucano marcado fluorescentemente) fue mayor en el grupo no tratado.

Los resultados muestran que la casuarina puede inhibir la síntesis de glucano y/o la glucosilación ligada a N en células de cáncer de mama.

Ejemplo 9: Efecto sobre el transporte de glucosa

30 El efecto de la casuarina (8) y castanospermina (20) sobre la velocidad inicial de captación de *D*-glucosa dependiente de Na⁺ en las vesículas de membrana de borde en cepillo intestinales ovinas se examinó en un ensayo de competición con *D*-glucosa marcada. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 9.1:

Compuesto	Referencia	Captación de glucosa (pmol s ⁻¹ mg ⁻¹)
Ninguno (control)		240
Casuarina	8	265
Castanospermina	20	225

Se puede ver que el transporte de glucosa estaba ligeramente inhibido por castanospermina pero ligeramente estimulado por casuarina.

35 **Ejemplo 10: aumento de la proporción de la respuesta de Th1:Th2 en un modelo de leishmaniasis que no cicatriza**

La leishmaniasis es un modelo clásico de una enfermedad Th1: surgen lesiones cutáneas que no cicatrizan de una polarización indeseable de la respuesta inmune que se desvía intensamente a Th2.

- 5 Para estudiar la capacidad de los compuestos de la invención de aumentar la proporción de la respuesta de Th1:Th2 en este modelo de enfermedad (y de este modo promover una respuesta de Th1 de cicatrización), se estimularon células esplénicas de ratones BALB/c infectados por *Leishmania major* que tenían una infección cutánea que no cicatriza con antígeno de parásito (Tabla 10.1) o policlonalmente con anti-CD3 (Tabla 10.2) en presencia de 3,7-*diepi*-casuarina (10).

Tabla 10.1: reversión de la incapacidad de las células T de producir IFN- γ en un modelo de ratón que no cicatriza

Tratamiento	IFN- γ (ng/ml)
Ninguno (control)	~0,5
Ag de <i>L. major</i>	~0,5
3,7- <i>diepi</i> -casuarina (10)	~0,5
3,7- <i>diepi</i> -casuarina (10) + Ag de <i>L. major</i>	5,5

Tabla 10.2: regulación negativa de la respuesta de citocina Th2 en un modelo de ratón que no cicatriza

Tratamiento	IL-5 (pg/ml)
Ninguno (control)	50
α CD3	240
3,7- <i>diepi</i> -casuarina (10) + α CD3	150

- 10 Se puede ver que la presencia de 3,7-*diepi*-casuarina (10) aumenta IFN- γ (asociado con una respuesta de Th1 de cicatrización) mientras que suprime la respuesta de Th2 (mediante la regulación negativa de la citocina de Th2 IL-5). El perfil de respuesta inmune desviada a Th2 asociado con una enfermedad que no cicatriza se revirtió claramente *ex vivo* mediante 3,7-*diepi*-casuarina (10).

Ejemplo 11: síntesis de 3,7-*diepi*-casuarina (10)

15 Parte experimental general

- Todas las reacciones se realizaron bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente usando disolventes anhidro a menos que se indique de otro modo. Los disolventes anhidro se adquirieron en Fluka Chemicals y se usaron como se suministraron. Los reactivos se suministraron por Aldrich, Fluka y Fisher y se usaron tal como se suministraron. Se realizó cromatografía en capa fina (Tlc) en láminas de aluminio pre-revestidas con gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ y se visualizaron bajo luz ultravioleta y se tiñeron usando ácido fosfomolibdico al 6 % en etanol. Se realizó cromatografía en gel de sílice usando gel de sílice Sorbsil C60 40/60 bajo una atmósfera positiva. Se preparó Amberlite IR-120, una resina de intercambio iónico fuertemente ácido sumergiendo la resina en ácido clorhídrico 2 M durante al menos dos horas seguido de elución con agua destilada hasta que el eluyente alcanzó pH 5. Se preparó Dowex 50WX8-100 sumergiendo la resina con ácido clorhídrico 2M durante al menos dos horas seguido de elución con agua destilada hasta neutro. Se registraron los espectros infrarrojos en un espectrofotómetro de transformada de Fourier de Perkin-Elmer 1750 IR usando películas delgadas en placas de cloruro sódico. Solamente se registraron los picos característicos. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 con una longitud de recorrido de 1 dm. Las concentraciones se indican en g/100 ml. Se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear en un espectrómetro Broker DQX 400 en el disolvente deuterado indicado. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en ppm y son relativos al disolvente residual como patrón. Se registraron los espectros de protones (δ_H) a 400 MHz y los espectros de carbono (δ_C) a 100 MHz.

2,3:5,6:7,8-Tri-O-isopropilideno-D-eritro-L-talo-octono-1,4-lactona (Qc)

5,6:7,8-Di-O-isopropilideno-D-eritro-L-galacto-octono-1,4-lactona (Qb)

- 35 Se añadió cianuro sódico (7,02 g, 142 mmol) a una solución agitada de *D-glicero-D-gulo-heptosa* (Qa, 21 g, 100 mmol) en agua (300 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h, se calentó a reflujo durante 48 h y se pasó a través de una columna que contenía Amberlite IR-120 (resina de intercambio iónico fuertemente ácida, 300 ml). El eluyente se concentró a presión reducida y el residuo se secó al vacío durante 24 horas. La espuma resultante se trató con acetona (500 ml) y ácido sulfúrico (5,4 ml) en presencia de sulfato de cobre anhidro (10 g, 62 mmol) a temperatura ambiente durante 48 h. El análisis de t.l.c indicó la presencia de dos productos principales (acetato de etilo:ciclohexano, 1:1; R_f 0,72, 0,18). La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se

trató con bicarbonato sódico (50 g) durante 24 h a temperatura ambiente. Los residuos sólidos se retiraron mediante filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El jarabe amarillo bruto resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice proporcionando 2,3:5,6:7,8-tri-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qc** en forma de un jarabe incoloro (R_f 0,72; 7,672 g; 21 %) y 5,6:7,8-di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-galacto-octono-1,4-lactona **Qb** en forma de aceite transparente (R_f 0,18; 8,105 g; 25 %) 2,3:5,6:7,8-tri-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qc** : δ_H (CDCl₃) 1,29, 1,33, 1,35, 1,38, 1,42, 1,48 (6 x s, 18H, 3 x C(CH₃)₂), 3,93-3,99 (m, 2H, *H*-8_a, *H*-7), 4,03-4,07 (m, 2H, *H*-5, *H*-6), 4,15 (dd, 1H, $J_{8a,8b}$ 8,7 $J_{8b,7}$ 6,1, *H*-8_b), 4,75-4,78 (m, 3H, *H*-2, *H*-3, *H*-4); δ_C (CDCl₃) 25,23, 25,51, 26,00, 26,71, 26,73, 27,16 (3 x C(CH₃)₂), 67,93, 74,93, 76,33, 76,69, 78,65, 79,40, 80,06, 109,95, 110,72, 113,19, 174,27; ν_{max} (película) 1793. 5,6:7,8-di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-galacto-octono-1,4-lactona **Qb** : δ_H (*d*₆-acetona) 1,28, 1,32, 1,34, 1,35 (4s, 12H, 2 x C(CH₃)₂), 3,92 (1 H, m, *H*-8_a), 3,98 (m, 1H, *H*-7), 4,14 (m, 2H, *H*-5, *H*-8_b), 4,23-4,25 (m, 2H, *H*-4, *H*-6), 4,35-4,40 (m, 2H, *H*-2, *H*-3); δ_C (*d*₆-acetona) 25,31, 25,87, 26,72, 27,31, 68,06, 75,15, 75,23, 77,51, 78,05, 78,41, 79,01, 110,06, 110,31, 174,25; ν_{max} (película) 1793, 3541.

2,3:5,6-Di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qd**

Una solución de 2,3:5,6:7,8-tri-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona (**Qc**, 3,8 g, 10,6 mmol) se trató con ácido acético:agua (2:3, 100 ml) a 50 °C durante 2 h. El análisis de t.l.c (acetato de etilo:ciclohexano, 1:1) indicó la desaparición del material de partida (R_f 0,72) y la presencia de un compuesto más polar (R_f 0,15). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:ciclohexano, de 1:1 a 3:1) proporcionando 2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qd** en forma de aceite transparente (3,23 g, 94 %) : δ_H (CD₃OD) 1,28, 1,38, 1,43 (3 x s, 12H, 2 x C(CH₃)₂), 3,59 (dd, 1H, $J_{8a,7}$ 5,40 $J_{8a,8b}$ 11,41, *H*-8_a), 3,66-3,69 (m, 1H, *H*-7), 3,74 (dd, 1H, $J_{8b,7}$ 2,90 Hz, *H*-8_b), 4,01 (t ap, 1H, $J_{6,7}$ 7,62 Hz, *H*-6); 4,24 (dd, 1H, $J_{5,6}$ 8,17 Hz $J_{5,4}$ 0,89 Hz, *H*-5), 4,79-4,81 (m, 2H, *H*-3, *H*-4), 4,89-4,91 (m, 1H, *H*-2); δ_C (CD₃OD) 24,62, 25,42, 26,05, 26,49, 63,86, 73,81, 75,40, 75,91, 79,18, 79,90, 80,78, 110,53, 113,09, 175,76; ν_{max} (película) 1791, 3478; $[\alpha]_D$ -35,7 (c 1, CHCl₃).

8-*O*-terc-Butildimetilsilil-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qe**

A una solución de 2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona (**Qd**, 3,18 g, 10 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (40 ml) se añadió cloruro de *terc*-butildimetilsililo (1,808 g, 12 mmol) e imidazol (1,361 g, 20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h después de lo cual el análisis de t.l.c. (acetato de etilo:ciclohexano, 1:1) no mostró material de partida (R_f 0,15) y la formación de un producto importante (R_f 0,63). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se fraccionó entre acetato de etilo y salmuera. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), filtraron y se retiró el disolvente. El aceite claro resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:ciclohexano, de 0:1 a 1:2) para dar 8-*O*-terc-butildimetilsilil-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qe** en forma de aceite transparente (3,612 g, 85 %) : δ_H (CDCl₃) 0,04 (s a, 6H, 2 x CH₃), 0,86 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,23, 1,30, 1,32, 1,41 (4 x s, 12H, 2 x C(CH₃)₂), 3,63-3,67 (m, 2H, *H*-8_a, *H*-7), 3,76 (d a, 1H, *H*-8_b), 3,96 (t ap, $J_{6,7}$ 8,21 $J_{6,5}$ 7,98, *H*-6), 4,08 (d a, 1H, *H*-5), 4,72 (s a, 2H, *H*-2, *H*-3), 4,78 (s a, 1H, *H*-4); δ_C (CDCl₃) -5,52, -5,45, 18,25, 25,51, 25,80, 25,93, 26,68, 27,18, 63,95, 72,97, 74,88, 74,93, 78,71, 79,63, 79,87, 110,34, 113,00, 174,42; ν_{max} (película) 1794, 3570; $[\alpha]_D$ -20,1 (c 1, CHCl₃).

7-Azido-8-*O*-terc-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*L*-treo-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qf**

Una solución de 8-*O*-terc-butildimetilsilil-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*D*-eritro-*L*-talo-octono-1,4-lactona (**Qe**, 3,5 g, 8,2 mmol) en una mezcla de piridina:diclorometano (1:4, 25 ml) se enfrió a -30 °C. Se añadió por porciones anhídrido de trifluorometanosulfónico (3,5 g, 2,09 ml, 12,4 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 h. El análisis de t.l.c (acetato de etilo:ciclohexano, 1:3) indicó la desaparición de material de partida (R_f 0,38) y la presencia de un producto menos polar (R_f 0,48). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se fraccionó entre acetato de etilo y ácido clorhídrico 0,5 M. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y concentró a presión reducida. El residuo naranja claro bruto resultante se trató con azida sódica (807 mg, 12,4 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (25 ml) durante 16 h. El análisis de t.l.c. (acetato de etilo:ciclohexano, 1:4) indicó la desaparición del triflato intermedio (R_f 0,42) y la presencia de un compuesto más polar (R_f 0,40). El disolvente de reacción se retiró al vacío y el residuo se fraccionó entre acetato de etilo y salmuera. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), filtraron y concentraron al vacío. El residuo bruto resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:ciclohexano, de 0:1 a 1:4) proporcionando 7-azido-8-*O*-terc-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*L*-treo-*L*-talo-octono-1,4-lactona **Qf** en forma de un aceite incoloro (3,026 g, 81 %) : δ_H (CDCl₃) 0,11 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 0,91 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,30, 1,38, 1,41, 1,47 (4x s, 12H, 2x C(CH₃)₂), 3,41-3,45 (m, 1H, *H*-7), 3,87 (dd, 1H, $J_{8a,7}$ 5,37 Hz $J_{8a,8b}$ 10,81 Hz, *H*-8_a), 3,92 (dd, 1H, $J_{8b,7}$ 7,32 Hz, *H*-8_b), 4,19-4,24 (m, 2H, *H*-5, *H*-6), 4,61 (s a, 1H, *H*-4), 4,75-4,79 (m, 2H, *H*-2, *H*-3); δ_C (CDCl₃) -5,59, -5,56, 18,14, 25,54, 25,73, 26,09, 26,71, 26,98, 61,61, 63,19, 67,94, 74,84, 74,94, 75,47, 78,36, 78,66, 110,90, 113,37, 174,02; ν_{max} (película) 1796, 2111; $[\alpha]_D$ +36,7 (c 1, CHCl₃).

7-Azido-8-*O*-terc-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*L*-treo-*L*-talo-octitol **Qg**

Se disolvió 7-azido-8-*O*-terc-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*L*-treo-*L*-talo-octono-1,4-lactona (**Qf**,

3,00 g, 6,6 mmol) en tetrahidrofurano (40 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió borohidrato de litio (216 mg, 9,9 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C a temperatura ambiente durante 24 h. El análisis de t.l.c. (acetato de etilo:ciclohexano, 1:1) indicó la desaparición del material de partida (R_f 0,76) y la presencia de un compuesto más polar (R_f 0,45). La reacción se detuvo mediante la adición de cloruro amónico (acuoso saturado) y se fraccionó entre acetato de etilo y salmuera. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x) y las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), filtraron y se retiró el disolvente. El residuo bruto resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:ciclohexano, de 1:3 a 1:1) proporcionando 7-azido-8-*O*-*terc*-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol **Qg** en forma de un jarabe incoloro (2,476 g, 82 %): δ_H (CDCl₃) 0,10 (s, 6H, 2 x CH₃), 0,91 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,36, 1,41, 1,42, 1,48 (4 x s, 12H, 2 x C(CH₃)₂), 3,43-3,47 (m, 1H, *H*-7), 3,66 (d a, 1H, *H*-4), 3,79-3,92 (m, 4H, *H*-1, *H*-1_a, *H*-8, *H*-8_a), 4,10-4,14 (m, 2H, *H*-2, *H*-3), 4,30-4,38 (m, 2H, *H*-5, *H*-6); δ_C (CDCl₃) -5,61, -5,51, 18,14, 25,18, 25,71, 26,87, 27,07, 27,86, 60,65, 62,39, 63,66, 67,62, 75,90, 76,91, 77,18, 77,49, 108,63, 110,16; ν_{\max} (película) 2109, 3536; $[\alpha]_D^{25} +46,6$ (c 1, CHCl₃).

7-Azido-8-*O*-*terc*-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-1,4-di-*O*-metanosulfonil-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol **Qh**

Se disolvió 7-Azido-8-*O*-*terc*-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol (**Qg**, 2,4 g, 5,3 mmol) en piridina (20 ml) y se añadió a una solución de 4-dimetilamino piridina (64 mg, 0,53 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (4,814 g, 3,253 ml, 42 mmol) en piridina (20 ml) y se agitó durante 2 h. El análisis de t.l.c (acetato de etilo:ciclohexano, 1:2, doble elución) mostró la desaparición de material de partida (R_f 0,33) y la presencia de un producto más hidrófobo (R_f 0,43). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se fraccionó entre acetato de etilo y salmuera. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), filtraron y concentraron a presión reducida. El residuo bruto resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:ciclohexano, 1:2) dando 7-azido-8-*O*-*terc*-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-1,4-di-*O*-metanosulfonil-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol **Qh** en forma de un aceite incoloro (2,973 g, 92 %): δ_H (CDCl₃) 0,11, 0,12 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 0,91 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,41, 1,44, 1,46, 1,56 (4 x s, 12H, 2 x C(CH₃)₂), 3,08 (s, 3H, SO₂CH₃), 3,21 (s, 3H, SO₂CH₃), 3,49 (ddd, 1H, $J_{7,6}$ 2,82 Hz, $J_{7,8}$ 5,46 Hz, $J_{7,8a}$ 7,94 Hz, *H*-7), 3,87-3,97 (m, 2H, *H*-8, *H*-8_a), 4,19 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 2,30 Hz, *H*-6), 4,24-4,31 (m, 2H, *H*-1, *H*-5), 4,36 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 2,96 Hz, $J_{3,2}$ 6,62 Hz, *H*-3), 4,49-4,53 (m, 1H, *H*-2), 4,69 (dd, 1H, $J_{1,a2}$ 2,39 Hz, $J_{1,a,1}$ 10,83 Hz, *H*-1_a), 5,11 (t ap, 1H, *H*-4); δ_C (CDCl₃) -5,56, 18,18, 25,76, 26,24, 26,78, 26,89, 27,56, 37,75, 39,02, 60,90, 63,57, 70,44, 76,00, 76,07, 76,46, 77,18, 77,32, 109,01, 110,68; ν_{\max} (película) 2113; $[\alpha]_D^{25} -16,2$ (c 1, CHCl₃).

7-Azido-7-desoxi-1,4-di-*O*-metanosulfonil-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol **Qi**

Se trató 7-Azido-8-*O*-*terc*-butildimetilsilil-7-desoxi-2,3:5,6-di-*O*-isopropilideno-1,4-di-*O*-metanosulfonil-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol (**Qh**, 2,90 g, 4,7 mmol) con una mezcla de ácido trifluoroacético:agua (1:1, 40 ml) durante 3 h. El análisis de t.l.c. (acetato de etilo) mostró la desaparición de material de partida (R_f 0,9) y la presencia de un producto más polar (R_f 0,12). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se co-evaporó con tolueno y se secó al vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:ciclohexano, de 1:1 a 1:0) proporcionó 7-azido-7-desoxi-1,4-di-*O*-metanosulfonil-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol **Qi** en forma de un aceite incoloro (1,677 g, 85 %): δ_H (CD₃OD) 3,12 (s, 3H, SO₂CH₃), 3,21 (s, 3H, SO₂CH₃), 3,61-3,71 (m, 2H, *H*-7, *H*-8), 3,78-3,82 (m, 2H, *H*-6, *H*-8_a), 3,98-4,05 (m, 2H, *H*-2, *H*-3), 4,11-4,13 (m, 1H, *H*-5), 4,34 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 4,87 Hz, $J_{1,1a}$ 10,44 Hz, *H*-1), 4,45 (dd, 1H, $J_{1a,2}$ 1,87 Hz, *H*-1_a), 5,00 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 1,91 Hz, $J_{4,5}$ 6,15 Hz, *H*-4); δ_C (CD₃OD) 36,17, 38,11, 61,84, 66,62, 69,09, 70,33, 70,45, 71,08, 72,55, 86,41; ν_{\max} (película) 2113; $[\alpha]_D^{25} -9,1$ (c 1, H₂O).

(1R,2R,3S,6S,7R,7aR)-3-(Hidroximetil)-1,2,6,7-tetrahidropirrolizidina **Qj**

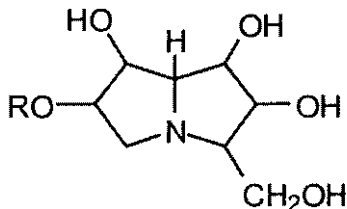
[3,7-*diepi*-Casuarina]

Se disolvió 7-Azido-7-desoxi-1,4-di-*O*-metanosulfonil-*L*-*treo*-*L*-*talo*-octitol (**Qi**, 1,6 g, 3,78 mmol) en agua (30 ml) y se trató con paladio sobre carbono al 10 % (400 mg) bajo una atmósfera de hidrógeno durante 16 h. El análisis de t.l.c (acetato de etilo:metanol, 9:1) indicó la desaparición de material de partida (R_f 0,75) y la presencia de un producto más polar (R_f 0,05). El paladio se retiró mediante filtración y el filtrado se trató con acetato sódico (930 mg, 11,34 mmol) a 60 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se enfrió y el disolvente se retiró al vacío. El aceite marrón bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (Dowex 50WX8-100, eluyendo con hidróxido de amonio 2M) para proporcionar (1R,2R,3S,6S,7R,7aR)-3-(hidroximetil)-1,2,6,7-tetrahidropirrolizidina [3,7-*diepi*-Casuarina] **Qj** en forma de un vidrio marrón (671 mg, 87 %): δ_H (D₂O) 2,81-2,92 (m, 2H, *H*-5, *H*-5_a), 3,16 (dd, 1H, $J_{3,2}$ 5,91 Hz, $J_{3,8}$ 10,74 Hz, *H*-3), 3,30 (t ap, 1H, J 3,78 Hz, *H*-7_a), 3,76 (dd, 1H, $J_{8,8a}$ 6,35 Hz, *H*-8), 3,87 (dd, 1H, *H*-8_a), 4,01 (d, 1H, $J_{2,1}$ 3,55 Hz, *H*-2), 4,04-4,12 (m, 2H, *H*-6, *H*-7), 4,29 (t ap, 1H, *H*-1); δ_C (D₂O) 49,32, 57,29, 63,78, 70,41, 72,59, 72,65, 74,47, 78,25; $[\alpha]_D^{25} -21,1$ (c 0,5, H₂O).

La anterior descripción detalla las realizaciones actualmente preferentes de la presente invención. Se espera que a los expertos en la materia se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones al llevar a la práctica la misma después de la consideración de estas descripciones. Estas modificaciones y variantes tienen por objeto incluirse en las reivindicaciones adjuntas a esto.

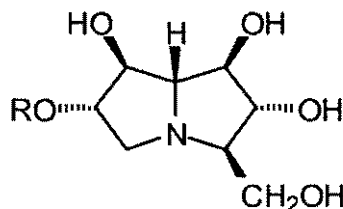
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada aislado para su uso como un inmunomodulador en terapia o profilaxis que tiene la fórmula:



5 en la que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupos lineales o ramificados, saturados o insaturados acilo, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y un resto de sacárido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



10 en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos lineales o ramificados, saturados o insaturados acilo, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y un resto de sacárido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un derivado de acilo del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso como un inmunomodulador en terapia o profilaxis.

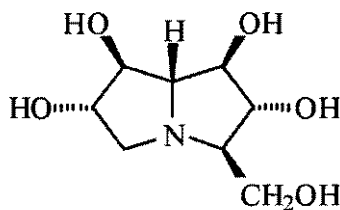
15 4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que el compuesto está:

- (a) peracilado; o
- (b) acilado en el hidroximetilo C-3; o
- (c) acilado en C-6; o
- (d) acilado en hidroximetilo C-3 y C-6.

20 5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R es un resto de glucósido o arabinósido.

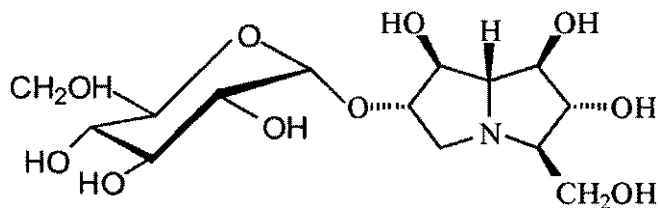
6. El compuesto de la reivindicación 1 que es:

- (a) 1R,2R,3R,6S,7S,7aR)-3-(hidroximetil)-1,2,6,7-tetrahidropirrolizidina (casuarina), en la que R es hidrógeno y que tiene la fórmula:



25

- (b) un glucósido de casuarina;
- (c) casuarina-6- α -D-glucósido de la fórmula:



- (d) 6-O-butanoilcasuarina;
 (e) 3,7-*diepi*-casuarina;
 (f) 7-*epi*-casuarina;
 5 (g) 3,6,7-*triepi*-casuarina;
 (h) 6,7-*diepi*-casuarina;
 (i) 3-*epi*-casuarina;
 (j) 3,7-*diepi*-casuarina-6- α -D-glucósido;
 (k) 7-*epi*-casuarina-6- α -D-glucósido;
 10 (l) 3,6,7-*triepi*-casuarina-6- α -D-glucósido;
 (m) 6,7-*diepi*-casuarina-6- α -D-glucósido;
 (n) 3-*epi*-casuarina-6- α -D-glucósido,
- o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) - (n).
7. Uso de un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la fabricación de un medicamento para su uso en inmunomodulación.
- 15 8. Una composición que comprende un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en combinación con:
- (a) un inmunoestimulador; y/o
 (b) un agente citotóxico; y/o
 20 (c) un agente antimicrobiano; y/o
 (d) un agente antivírico; y/o
 (e) una célula dendrítica,
- que comprende opcionalmente además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Una vacuna que comprende un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en combinación con un antígeno, estando presente el compuesto en una cantidad suficiente para producir un efecto adyuvante de la vacunación.
- 25 10. Un kit farmacéutico de partes que comprende un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende opcionalmente además instrucciones para su uso.
- 30 11. El compuesto de pirrolizidina polihidroxilada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la terapia o la profilaxis comprende:
- (a) Aumentar la proporción de la respuesta de Th1:Th2;
 (b) Hemorrestauración;
 (c) Alivio de la inmunosupresión;
 (d) Estimulación de citocinas;
 35 (e) Tratamiento de trastornos proliferativos;
 (f) Tratamiento del cáncer;
 (g) Vacunación, en la que el compuesto actúa como un adyuvante;
 (h) Vacunación con una vacuna de células dendríticas, en la que las células dendríticas se ponen en contacto con el compuesto;
 40 (i) Administración de células dendríticas en el tratamiento o la profilaxis de trastornos autoinmunes, en la que las células dendríticas se ponen en contacto con el compuesto; y/o
 (j) Cicatrización;
 (k) Estimulación de la respuesta inmune innata;
 (l) Refuerzo de la actividad de linfocitos NK endógenos;
 45 (m) el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con Th1;
 (n) el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con Th2;
 (o) el tratamiento o la profilaxis de infecciones bacterianas;
 (p) el tratamiento o la profilaxis de infecciones víricas;
 (q) el tratamiento o la profilaxis de infecciones priónicas, fúngicas, protozoarias o metazoarias;

- (r) el tratamiento de enfermedades asociadas con patógenos intracelulares; o
- (s) el tratamiento o la profilaxis de trastornos autoinmunes.

- 5 12. El compuesto de pirrolizidina polihidroxilada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la terapia o la profilaxis comprende el uso profiláctico como un inmunoestimulador de tipo 1 generalizado para reducir el riesgo de infección.
13. El compuesto de pirrolizidina polihidroxilada de la reivindicación 11(f) en el que el cáncer es melanoma.
- 10 14. El compuesto de pirrolizidina polihidroxilada de la reivindicación 11(p) en el que la infección vírica se selecciona de virus sincitial respiratorio (VSR), virus de la hepatitis B (VHB), Epstein-Barr, virus de la hepatitis C (VHC), herpes simple de tipo 1 y 2, herpes genital, queratitis herpética, encefalitis herpética, herpes zoster, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe A, virus hantaan (fiebre hemorrágica), virus del papiloma humano (VPH) y sarampión.
- 15 15. El compuesto de pirrolizidina polihidroxilada de la reivindicación 11(s) en el que el trastorno autoinmune se selecciona de miastenia grave, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerodermia, polimiositis y dermatomiositis, espondilitis anquilosante y fiebre reumática, diabetes dependiente de insulina, enfermedades tiroideas (que incluyen enfermedad de Graves y tiroiditis de Hashimoto), enfermedad de Addison, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa e infertilidad masculina y femenina autoinmune.

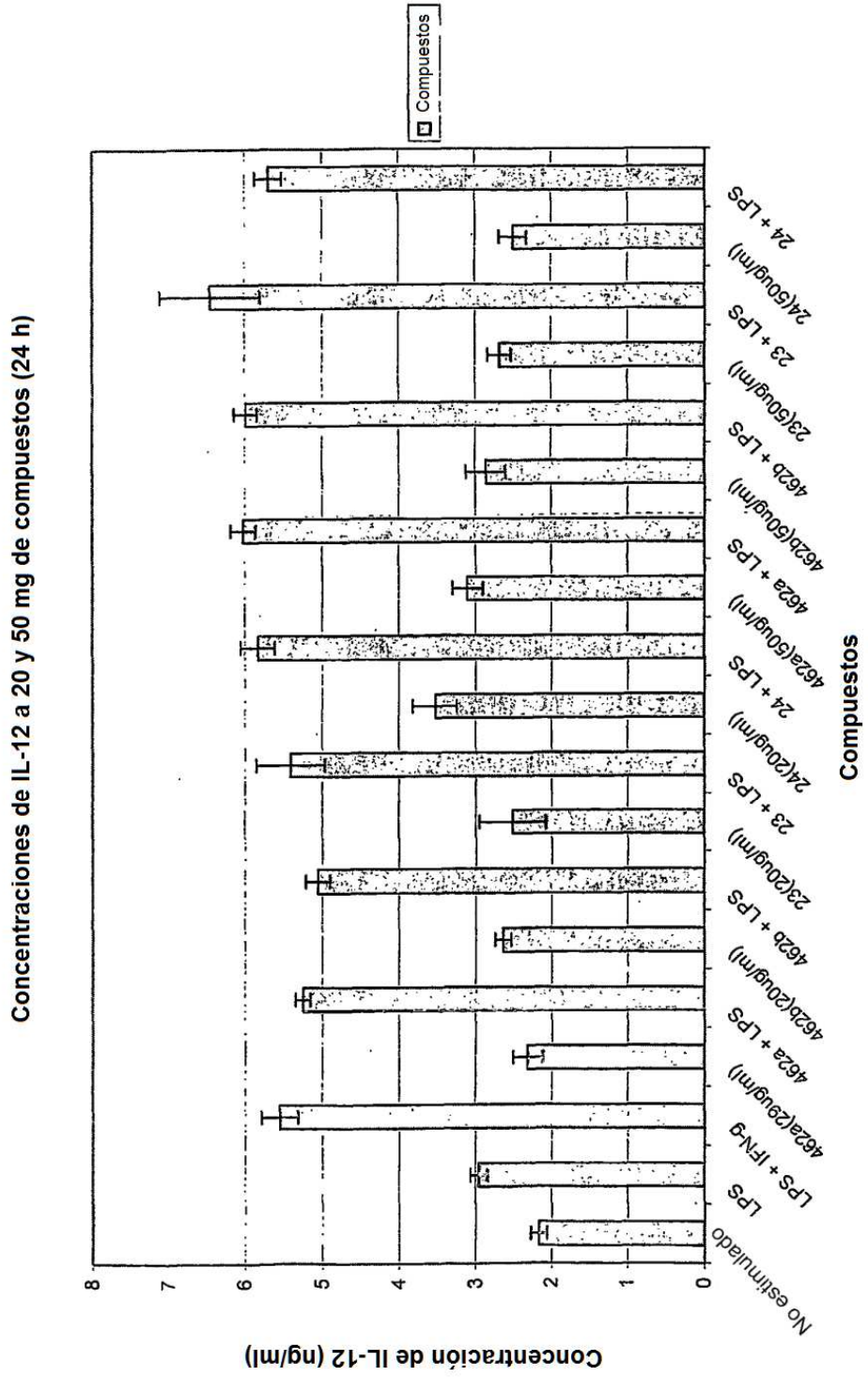


Fig. 1

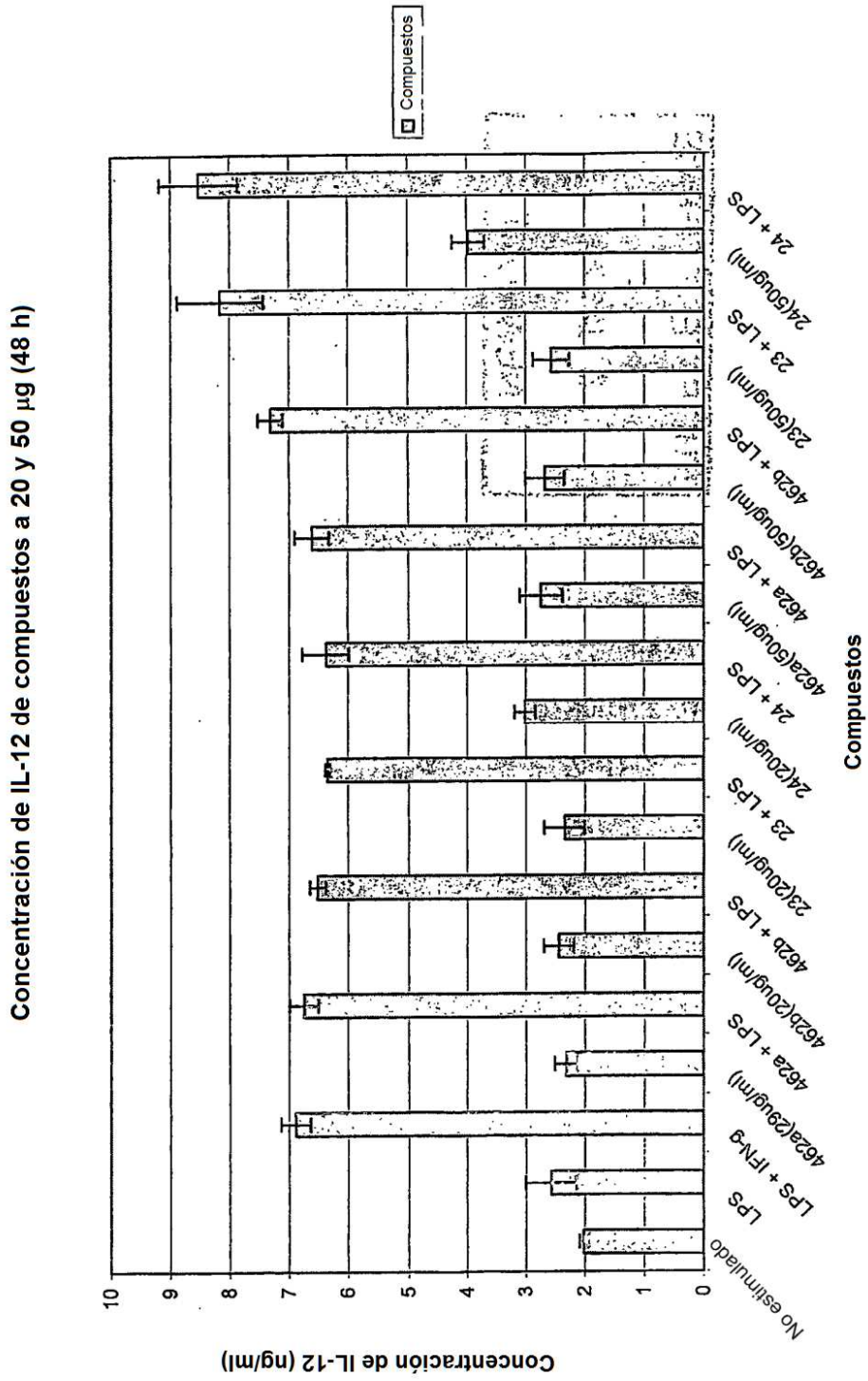


Fig. 2