

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 527**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08748030 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2164501**

54 Título: **Xilanos sulfatados para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades respiratorias**

30 Prioridad:

31.05.2007 AU 2007902930 P

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

21.09.2016

73 Titular/es:

**PARADIGM BIOPHARMACEUTICALS LIMITED
(100.0%)
Level 2, 517 Flinders Lane
Melbourne, VIC, AU**

72 Inventor/es:

**COOMBE, DEIRDRE ROMA y
KETT, WARREN CHARLES**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 583 527 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

Xilanos sulfatados para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades respiratorias

Campo

5 La presente invención se refiere en general a los agentes y protocolos medicinales útiles en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades o afecciones respiratorias seleccionadas entre asma, rinitis alérgica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Más particularmente, la presente invención se refiere a un sulfato de xilano en el tratamiento de estas enfermedades o afecciones respiratorias, en donde el xilano sulfatado es polisulfato de pentosano (PPS).

Antecedentes

10 Los detalles bibliográficos de las publicaciones mencionadas por el autor en esta memoria descriptiva se recogen al final de la descripción.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debe ser tomada como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

15 El asma se caracteriza por la inflamación de las vías respiratorias que resulta en la reducción temporal de las vías respiratorias que transportan aire de la nariz y la boca hacia los pulmones. Los síntomas del asma pueden ser causados por alérgenos o irritantes que se inhalan en los pulmones, lo que resulta en vías respiratorias inflamadas, obstruidas y constreñidas. Los síntomas incluyen dificultad para respirar, sibilancias, tos, opresión en el pecho. En los casos graves, el asma puede ser mortal.

20 Probablemente el asma no es una sola enfermedad, sino más bien un complejo de múltiples síndromes, separados que se superponen. La siguiente clasificación se basa en los informes de Wenzel. *Lancet*; 368:804-813, 2006, and Green et al. *Curr. Opin. Allergy Immunol.* 7:43-50, 2007.

25 • Asma alérgica: este es el fenotipo de asma más grande. Esto es especialmente cierto en el asma infantil, pero probablemente también en una alta proporción de adultos con asma. Los individuos que se presentan con este fenotipo suelen experimentar los primeros síntomas en la infancia, pero se puede presentar a cualquier edad. La historia familiar de asma y la exposición temprana a alérgenos son importantes en la iniciación de asma alérgica. Además de las terapias estándar, terapias dirigidas: inmunoterapia o anticuerpos monoclonales contra IgE, se han utilizado con éxito. Sin embargo, no todas las personas con asma alérgica responden una terapia anti-IgE.

30 • Asma ocupacional: hasta un 15% de asma de aparición en adultos cae en este grupo. Tiene los siguientes subfenotipos: (1) desarrollo de una respuesta mediada inmunológicamente al agente causal, por lo general un agente de alto peso molecular -tiene similitudes con asma alérgica a través del desarrollo de anticuerpos IgE; (2) desarrollo de una respuesta mediada inmunológicamente a desencadenantes de peso molecular bajo alto y no se observa una respuesta de IgE consistentemente; (3) desarrollo de una respuesta de rápido inicio no-inmunológica después de la exposición a una alta concentración de sustancias químicas irritantes. La inflamación de las vías respiratorias es similar en ambos fenotipos inmunológicos y se asemeja a la de asma alérgica, por ejemplo, presencia de eosinófilos, linfocitos, mastocitos y el engrosamiento de la membrana basal reticular. Por el contrario, el asma causada por los productos químicos irritantes es bastante diferente y se caracteriza por la fibrosis de la pared bronquial y la denudación epitelial y exudados fibrinohemorrágicos en la submucosa sin inflamación eosinofílica. Los tipos inmunológicos de esta enfermedad pueden continuar en ausencia de exposición al agente causal.

40 • Asma inducida por aspirina: aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos son los factores desencadenantes. Es común en la población con asma grave y se asocia con poca evidencia de atopía, leucotrienos elevados y un alto número de eosinófilos en ambos tejidos y sangre. Hay rinosinusitis grave y pólipos nasales e inicio en adultos. Este fenotipo es poco sensible a los corticosteroides.

45 • Asma relacionada con la menstruación: esta no está bien caracterizada. Probablemente sólo se produce en una pequeña proporción de mujeres, pero puede ser grave.

• Asma inducida por el ejercicio: los mecanismos que desencadenan esta asma parece que implican respuestas agudas de células inflamatorias (generalmente mastocitos), vasoactivos y epiteliales, pero la patogénesis no está clara. Si el asma inducida por el ejercicio representa el desarrollo de la broncoconstricción en respuesta al ejercicio en todos los asmáticos o si se produce sólo en algunos no está claro.

A pesar de que la inflamación es una característica del asma, no todos los fenotipos de asma tienen inflamación eosinofílica predominantemente, aunque esta es la más común y mejor estudiada.

- 5 • Asma eosinofílica: estudios han definido un fenotipo eosinofílico mediante pruebas de esputo o biopsia en pacientes con distintos grados de severidad del asma y se ha demostrado consistentemente que alrededor del 50% de los asmáticos tienen este fenotipo. Otros estudios han sugerido que la inflamación eosinofílica puede estar presente en una proporción mayor de pacientes que la detectada utilizando pruebas de esputo o biopsia. En un estudio 50% de los pacientes con asma grave pensado que son no-eosinofílicos en realidad tenían inflamación eosinofílica, pero en el pulmón distal.
- 10 • Asma neutrofílica: vista con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad severa. Muchos pacientes con inflamación neutrofílica pueden tener inflamación eosinofílica concomitante en biopsias de tejido mientras que la evaluación del esputo puede mostrar un claro predominio de neutrófilos. La asociación de los neutrófilos con asma grave podría ser causada por el tratamiento con altas dosis de esteroides, que han sido mostrados para disminuir la apoptosis de neutrófilos *in vitro*. El asma neutrofílica se asoció dentro aumentos en IL-8 y elastasa de neutrófilos. Aproximadamente el 20% de los pacientes tenían asma neutrofílica y otro 8% tenía tanto inflamación neutrofílica como eosinofílica (a partir de un estudio de 93 pacientes).
- 15 • Asma paucigranulocítica: pacientes con recuentos de células de esputo en el rango normal (~30% de los 93 pacientes tenían este subfenotipo).

20 La rinitis alérgica es una enfermedad de la vía respiratoria superior inducida por alérgenos, que se caracteriza por la mucosa de las vías respiratorias hiperreactivas y episodios de la cronicidad de los síntomas con períodos de exacerbación aguda. Las personas alérgicas se sensibilizan a y pueden desarrollar anticuerpos IgE contra alérgenos como el polen, ácaros del polvo, caspa de animales y esporas de moho. La respuesta alérgica inmediata a antígeno se denomina la respuesta de fase temprana. Los mediadores liberados durante esta fase son histamina, cininas, proteasas neutras y una variedad de citoquinas. La activación de los mastocitos conduce a la producción de leucotrienos y prostaglandinas y juntos estos mediadores dar lugar a la rinorrea acuosa, estornudos y picazón en cuestión de minutos de la exposición al alérgeno. Esto es seguido varias horas más tarde por la respuesta de fase tardía que implica la infiltración de células inflamatorias y la liberación de mediadores en la mucosa nasal. Los síntomas son similares a los de la respuesta de fase temprana, pero predomina congestión. (Walls et al, Med. J. Aust.; 182:28-33, 2005). La rinitis alérgica se ha subdividido en la enfermedad "intermitente" y "persistente". La enfermedad intermitente describe una condición en la que los síntomas están presentes menos de 4 días por semana, o menos de 4 semanas a la vez. La persistencia de la enfermedad significa que los síntomas están presentes por más de 4 días por semana y más de 4 semanas a la vez (Pawanker, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.; 4:1-4, 2004).

30 La rinitis alérgica y el asma alérgica son enfermedades que implican una respuesta inflamatoria. Tienen etiología subyacente similar y las citoquinas clave para cada enfermedad son el subconjunto Th2 de citoquinas IL-5, IL-4 e IL-13 de células T y GM-CSF. Estas enfermedades se caracterizan por un infiltrado de células inflamatorias marcada que comprende eosinófilos, mastocitos, linfocitos T y células de la línea monocítica. Las moléculas de adhesión, P-selectina, MAC-1 y PECAM-1 desempeñan un papel importante en la extravasación de leucocitos y son propensos a estar involucrados en el proceso inflamatorio. Además, la familia de eotaxina de las quimiocinas juega un papel clave en estas enfermedades ya que son los principales factores quimiotácticos estimulantes de eosinófilos y la infiltración de linfocitos T CD4+.

40 Hay una conciencia creciente de que el asma y la rinitis alérgica son componentes de una sola enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias. Una conclusión que se apoya en datos epidemiológicos que muestran que más del 80% de las personas con asma alérgica tienen rinitis alérgica, y que hasta el 50% de los pacientes con rinitis alérgica tienen asma (Gelfand, J. Allergy Clin. Immunol, 114:S135-138, 2004; Passalacqua et al, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 4:177-183, 2004). Por otra parte, los estudios longitudinales y de seguimiento han demostrado que la rinitis precede generalmente el asma y es un factor de riesgo para el asma. La rinitis alérgica aumenta el riesgo de desarrollar asma en por lo menos tres veces y el correcto tratamiento de la rinitis alérgica con esteroides intranasales tiene un efecto favorable sobre los síntomas bronquiales, reduciendo significativamente la tasa de ingreso hospitalario y visitas al servicio de urgencias para la exacerbación del asma (Passalacqua et al., Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 4:177-183, 2004). Estas enfermedades son una mezcla compleja de patologías, que implican al menos las diversas citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión de células indicadas anteriormente.

55 Los mastocitos e histaminas juegan un papel importante durante la respuesta de la rinitis alérgica inicial. Sin embargo, al avanzar la rinitis alérgica, el papel de las histaminas disminuye, por lo que los antihistamínicos son menos eficaces como terapia (Gelfand, J. Allergy Clin. Immunol 114: S135-138, 2004). Durante la respuesta de rinitis alérgicas iniciales, los mastocitos sensibilizados degranulan dentro de pocos minutos de la exposición al alérgeno que liberan mediadores preformados y recién sintetizados incluyendo histamina, proteasas, cisteinil leucotrienos, prostaglandinas y citoquinas. La progresión de rinitis alérgica es dependiente de los mediadores asociados a la infiltración de eosinófilos, basófilos,

neutrófilos, células mononucleares y linfocitos T (*Passalacqua et al, supra 2004.*). La asociación de los eosinófilos e IL-5 con la rinitis alérgica ha sido apreciada desde hace algún tiempo. Estudios repetidos han encontrado niveles elevados de citocinas de tipo Th2, incluyendo IL-5 e IL-4, y el aumento de cantidades de proteína catiónica de eosinófilos (ECP), un marcador de eosinófilos activados, después de la provocación con alérgeno (*Blaiss Allergy Asthma Proc. 26: 35-40, 2005.* La afluencia de eosinófilos se correlaciona estrechamente con el desarrollo de los síntomas. Además, la pérdida de la integridad epitelial en la mucosa nasal de pacientes con rinitis se correlaciona con el número de eosinófilos en lugar de los números de mastocitos o neutrófilos (*Borish J. Allergy Clin Immunol. 112: 1021-1031, 2003.*) Parece que la rinitis alérgica se desarrolla a partir de un proceso agudo mediado por mastocitos, principalmente que es sensible a los antihistamínicos, a través de una enfermedad inflamatoria crónica que es mediada principalmente por eosinófilos y es mucho menos sensible a los antihistamínicos. Este es el caso de los pacientes con rinitis alérgica persistente. La progresión a una condición que es refractaria a los antihistamínicos también puede ocurrir dentro de una temporada de alergias, para personas que sufren por la temporada. Para otros pacientes con enfermedades intermitentes leves, los antihistamínicos no son una terapia eficaz, lo que refleja la exposición de alérgenos intermitentes, que no son de suficiente duración para conducir progresión de la enfermedad en la fase resistente a antihistamínicos.

La primera línea de tratamiento para el asma es corticosteroides (ICS) inhalados, que se utilizan normalmente en combinación con agonistas β_2 (*Barnes, Br. J. Pharmacol. 147 Suppl 1:S297-303, 2006.*) Los agonistas β_2 alivian los síntomas en lugar de tratar la inflamación subyacente y tienen el potencial de empeorar el asma si se utilizan con frecuencia en ausencia de ICS. Sin embargo, esta parece que es la terapia preferida (a pesar de sus efectos secundarios) debido a la inmediatez de su efecto. La terapia con agonista β_2 en ausencia de ICS se ha dado una lista de "caja negra" por la FDA debido a los posibles problemas cardíacos asociados con esta terapia. Aunque los efectos secundarios son menores que con las formulaciones orales, los ICS no están exentos de efectos secundarios adversos locales y sistémicos. Un efecto secundario de los corticosteroides es la supresión del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPAA): se observan efectos adversos clínicamente relevantes y esto, es más evidente con algunos medicamentos que con otros. La densidad ósea y las fracturas también pueden ser un problema: ciertos efectos de ICS sobre el metabolismo óseo son detectables, pero la relevancia clínica no está clara. Por último, el retraso del crecimiento en niños es otro problema que puede preocupar de los pacientes (*Allen, Adv Pediatr. 53: 101-110, 2006.*) En general, los efectos secundarios son aceptables dadas las graves complicaciones del asma sostenida/controlada.

Otras terapias para el asma incluyen:

(1) Omalizumab, un anticuerpo anti-IgE (*Genetech*) y también se considera como no rentable para el tratamiento del asma estándar. Se utiliza principalmente como terapia complementaria a ICS, ya que no mejora la capacidad de respuesta de las vías respiratorias y tiene una eficacia modesta. Las restricciones de dosis y mecanismo de administración (inyección subcutánea) son un inconveniente añadido. Por otra parte, una advertencia de US Food and Drug Administration (FDA) ha vinculado la inyección de omalizumab a anafilaxia potencialmente mortal y más preocupante en algunos pacientes esta anafilaxia es retrasada, produciéndose más de 2 horas después de la inyección a más de 24 horas después de la inyección.

(2) Anti-leucotrienos (anti-LTs), que pueden causar broncodilatación. Su efecto es aditivo al de los agonistas de los receptores β_2 de acción corta, aunque solo tienen un efecto relativamente modesto. Anti-LT afecta principalmente la respuesta asmática temprana (EAR), mientras que, ICS muestran efectos pronunciados sobre respuestas asmáticas finales (*Palmqvist et al, Allergy 60:65, 2005.*) Por estas razones se han ensayado anti-LT en combinación con ICS. Los anti-leucotrienos no son rentables. Prácticamente no tienen efectos secundarios, pero su eficacia es baja.

Las terapias habituales para la rinitis alérgica son los antihistamínicos o corticosteroides intranasales (*Neilsen and Dahl, Am. J. Respir. Med. 2:55-65, 2003; Yanez and Rodrigo, Ann. Allergy Asthma Immunol. 89:479-84, 2002.*) Los antagonistas de H1 orales mayores primera generación (antihistamínicos) tienen un número de efectos secundarios adversos, el mejor reconocido es la somnolencia y efectos anticolinérgicos. Se desarrollaron los fármacos de segunda generación para superar estos efectos. Sin embargo, estudios recientes han indicado que la división entre los antagonistas H1 de primera y segunda generación en términos de somnolencia no es tan clara (*Golightly and Greos, Drugs 65:341-84, 2005.*) Los marcadores para cetirizina, el más potente antihistamínico aprobado por la FDA, incluyen una advertencia acerca de los posibles efectos adversos de somnolencia y la precaución con la conducción y el uso de equipo pesado cuando se instó tomando el fármaco. Además, el uso concomitante de otros inhibidores del sistema nervioso central (CNS) o alcohol debe evitarse ya que puede producirse una reducción adicional en el estado de alerta y el rendimiento del CNS. Por otra parte, los antihistamínicos no son eficaces contra la congestión asociada con rinitis alérgica crónica. La rinitis alérgica progresa a una enfermedad que es principalmente de eosinófilos mediada y refractaria a la terapia con antihistamínico. Cuando esto sucede, los corticosteroides intranasales (INCS) son la terapia principal. De hecho, para muchos INCS clínicos son los fármacos de elección para el tratamiento de toda la rinitis alérgica como el corticosteroide actúa para reducir la inflamación eosinofílica. A pesar de que los INCS son generalmente considerados seguros la recomendación es reducir la dosis de esteroides tanto como sea posible y optimizar las estrategias de ahorradores de esteroides (*Skoner, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2:7-10, 2002.*)

La etiología subyacente de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es diferente de la de las enfermedades inflamatorias alérgicas (Sutherland and Martin, *J Allergy Clin. Immunol.* 112:819-27, 2003). COPD implica un proceso inflamatorio crónico que afecta a las vías respiratorias periféricas y parénquima pulmonar y la inflamación es peor durante las exacerbaciones. Un importante factor que contribuye al desarrollo de la COPD es la respuesta inflamatoria al humo del cigarrillo. Los indicadores patológicos de la COPD son la destrucción del parénquima pulmonar (enfisema pulmonar), inflamación de las vías respiratorias pequeñas periféricas (bronquitis respiratoria) y la inflamación de las vías respiratorias centrales. La mayoría de los pacientes con COPD tienen las tres condiciones patológicas (bronquitis obstructiva crónica, enfisema y taponamiento de moco) que presentan diferentes patrones de inflamación (Adcock and Ito, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2:313-319, 2005). Se considera que los neutrófilos y los macrófagos son los principales efectores de la enfermedad. Los análisis de esputo y líquido de lavado broncoalveolar muestran aumentos tanto en los neutrófilos como en macrófagos en estas secreciones de los pacientes con COPD. Además, hay una creciente evidencia de que existe un subgrupo importante de pacientes con COPD que tienen eosinofilia crónica de las vías respiratorias.

Los macrófagos alveolares juegan un papel clave en la COPD, que se localizan en sitios de destrucción alveolar, y sus números se correlacionan positivamente con la gravedad de la enfermedad, obstrucción de las vías respiratorias y el grado de daño de la pared alveolar en el enfisema. Los neutrófilos de tejidos de las vías respiratorias se incrementan en las grandes y pequeñas vías respiratorias de los pacientes con COPD durante exacerbaciones y en la COPD grave o durante las infecciones. Los pacientes con COPD también muestran ya sea un aumento de la proporción de células T CD8+/CD4+, o un aumento en los números totales de ambas las células T CD8+ y CD4+ en la pared de las vías respiratorias (MacNee, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2:258-266, 2005). Los bronquiolos son obstruidos por la fibrosis y se infiltraron con macrófagos y linfocitos T.

Hay tres formas morfológicas de la COPD: bronquitis crónica, bronquiolitis obstructiva y enfisema (Szilasi et al., 2006. *Pathol. Oncol. Res.* 12:52-60). La inflamación asociada con la bronquitis crónica se encuentra en el epitelio de las vías respiratorias centrales. El proceso inflamatorio se asocia con aumento de la producción de moco y el aclaramiento mucociliar defectuoso. La inflamación se observa en la mucosa, en las capas de músculo liso y las glándulas submucosas. En células mononucleares de las vías respiratorias grandes, macrófagos, células T CD8+ y participación de células plasmáticas es común en la COPD estable y durante las exacerbaciones de la bronquitis crónica. Las células T CD8+ liberan factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), un potente mediador proinflamatorio. El papel de los neutrófilos no está claro. Los neutrófilos se ven en las vías respiratorias grandes sólo durante las exacerbaciones y en la COPD grave, que son, sin embargo, observados desde el principio en el lumen de las vías respiratorias y en el esputo.

La bronquiolitis obstructiva u obstrucción de las vías respiratorias pequeñas, es una condición inflamatoria que involucra a las vías respiratorias pequeñas y periféricas. La característica típica es lumen contraído con aumento de la mucosidad. Los macrófagos y las células T CD8+ dominan la inflamación de las vías respiratorias pequeñas, aunque los cambios inflamatorios mostraron una correlación positiva con obstrucción del flujo aéreo en la COPD. Por ejemplo, en macrófagos COPD de leve a moderados estables fueron dominantes, mientras que en los neutrófilos graves de la enfermedad eran el componente inflamatorio predominante, mientras que durante las exacerbaciones leves se encuentran eosinófilos. Un mayor número de fibroblastos y miofibroblastos y la matriz extracelular mejorada se encuentra en el subepitelio de las vías respiratorias pequeñas en la bronquiolitis obstructiva. Esta patología sugiere un mecanismo de la lesión repetitiva y la curación que conduce a la fibrosis y tejido de la cicatriz. El resultado neto es el estrechamiento de las vías respiratorias.

El enfisema se define por la ampliación del espacio aéreo permanente causado por la destrucción y la ampliación del tejido pulmonar más allá del bronquiolo terminal. El mecanismo de la enfermedad implica la inflamación no regulada y la liberación de grandes cantidades de enzimas proteolíticas. El desequilibrio proteasa/antiproteasa es la presunta causa de un enfisema pulmonar. Aunque la inflamación es dominada por células T CD8+, macrófagos y neutrófilos producen cantidades excesivas de proteasas que incluyen la elastasa de leucocitos, cathepsina G, proteinasa 3, metaloproteinasas de la matriz (MMP), proteinasas de cisteína y el activador del plasminógeno. Estas enzimas destruyen los componentes de elastina y otras de la pared alveolar, siendo la elastasa la enzima más implicada en este proceso.

Los mediadores proinflamatorios de estos procesos de enfermedad incluyen leucotrieno-B4, IL-8 y otras quimiocinas (por ejemplo, MIP-1 α , MCP-1), TNF- α , IL-13 e IL-4 (Barnes, *Pharmacol. Rev.* 56:515-548, 2004). Se ha sugerido que los efectos inhibidores de TNF- α e IL-4 sobre la producción de la TGF- β de citoquinas de regulación por las células epiteliales bronquiales pueden contribuir a la progresión de la respuesta inflamatoria. Además, el aumento de los niveles de IL-6, IL-1 β , TNF- α , e IL-8 se han medido en el esputo con incrementos adicionales durante las exacerbaciones.

La COPD es una carga muy importante en la sociedad. Es la quinta causa principal de muerte en el Reino Unido. Afecta a un 5% de la población adulta y es la única de las principales causas de muerte en los EE.UU., en los cuales la morbilidad y la mortalidad están aumentando. Para el año 2020 se estima que la COPD será la 3ª causa líder de muerte y la 5ª causa líder de discapacidad en el mundo (Halpin and Miravittles, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3:619-623, 2006). Las terapias existentes para la COPD son muy insuficientes. Ninguna progresión de la enfermedad lenta y la respuesta a los

tratamientos es pobre. COPD es relativamente resistente a los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides. Sin embargo, las opciones farmacológicas actuales incluyen fármacos para ayudar a dejar de fumar, agonistas β_2 de acción corta y prolongada, anticolinérgicos de acción corta y prolongada, corticosteroides inhalados, teofilina, N-acetil cisteína y otros mucolíticos y oxígeno (Anzueto, Am. J. Med. 119:S46-S53, 2006; Barnes and Stockley, Eur. Respir. J. 25:1084-1106, 2005). Se introdujeron los agonistas β_2 de acción corta y prolongada para mejorar la broncodilatación. Se utilizan a menudo en combinación con anticolinérgicos, ya que producen broncodilatación a través de diferentes rutas. Los corticosteroides inhalados se utilizan a menudo en combinación con agonistas β_2 y mejoras en las tasas de exacerbación son mayores que las observadas con el componente individual. La teofilina es un broncodilatador útil. El modo de acción de la cisteína N-acetil no está claro, pero puede actuar como un mucolítico o antioxidante para mejorar síntomas de la tos y en algunos pacientes parecen reducir la frecuencia de exacerbación.

A pesar de estas terapias la única intervención que claramente demostró reducir la mortalidad en los ensayos clínicos es dejar de fumar.

Resumen

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado o número entero o grupo de elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Polisulfato de pentosano (PPS) y otros compuestos del tipo xilano sulfatado se identifican como siendo útiles en el tratamiento y profilaxis de enfermedades respiratorias seleccionadas de asma, rinitis alérgica y enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (COPD). La referencia a "COPD" incluye enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva. Mientras PPS ha sido sugerido para uso en el tratamiento de la trombosis venosa profunda, ahora se ha determinado que xilanos sulfatados, i.e., PPS, son útiles en la prevención de, o en la mejora de los síntomas de, enfermedad respiratoria. Por lo tanto, xilanos sulfatados, i.e., PPS, se proponen para su uso en el tratamiento de una enfermedad respiratoria seleccionada de la lista de asma, rinitis alérgica, COPD. El término "enfermedad respiratoria" o "afección respiratoria" incluye una enfermedad o afección pulmonar tal como unas afecciones respiratorias o pulmonares inflamatorias y/o alérgicas.

Los xilanos sulfatados (por ejemplo, PPS), pueden ser sintéticos o semisintéticos en origen y/o pueden ser generados a partir de polisacáridos sulfatados más grandes. Además, los compuestos descritos en este documento pueden someterse a una serie de otras modificaciones tales como la adición de ramas laterales, sulfatación y/o fosforilación del esqueleto de xilano y cambios en la longitud de la cadena de polisacárido. Los agentes también pueden fusionarse con o ser parte de las unidades estructurales de aminoácidos o péptidos, las cadenas de polipéptido o proteína, denominados en este documento como moléculas de "compuestos".

De acuerdo con lo anterior, se revela un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un xilano sulfatado o un derivado u homólogo del mismo o una sal del mismo por un tiempo y en condiciones suficientes para la mejora de los síntomas de la enfermedad respiratoria.

El xilano sulfatado es polisulfato de pentosano (PPS).

Por lo tanto, se revela un método adicional para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un PPS o un derivado funcional u homólogo del mismo o una sal del mismo por un tiempo y en condiciones suficientes para la mejora de los síntomas de la afección respiratoria.

En una realización, el medicamento se administra por inhalación o como una pulverización nasal.

Un derivado "funcional" u homólogo de un xilano sulfatado tal como PPS como se revela en este documento es un compuesto, que mejora los síntomas que se tratan o previenen de un modo similar a la de xilano sulfatado. Un homólogo o derivado también incluye una molécula de compuesto que comprende un sulfato de xilano y una unidad estructural de aminoácido o un péptido, polipéptido o proteína. Una molécula de compuesto también puede comprender múltiples moléculas de xilano sulfatado y/o múltiples aminoácidos o múltiples péptidos, polipéptido o entidades de proteínas.

La afección respiratoria se selecciona de la lista que comprende asma, rinitis alérgica y COPD, incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva.

- 5 Por lo tanto, este aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende PPS para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria seleccionada de la lista de asma, rinitis alérgica y COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva) que comprende administrar al sujeto un xilano sulfatado o un derivado u homólogo de los mismos son una sal del mismo durante un tiempo y en condiciones suficientes para la mejora de los síntomas de la afección respiratoria.
- En un aspecto particular, se contempla el propósito del tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria seleccionada de la lista de asma, rinitis alérgica y COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva), el propósito que se administra a dicho PPS en cuestión durante un tiempo y en condiciones suficientes para la mejora de los síntomas de la afección respiratoria.
- 10 Y otro aspecto se refiere al uso de un xilano sulfatado, i.e., PPS, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una afección o enfermedad respiratoria. Las afecciones y enfermedades respiratorias contempladas en este documento son asma, rinitis alérgica y COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva).
- 15 También se contemplan en este documento composiciones que comprenden xilanos sulfatados o sus derivados u homólogos para el tratamiento de afecciones respiratorias seleccionadas entre asma, rinitis alérgica y COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva).
- 20 Sin embargo, otro aspecto en este documento revela protocolos de medicamentos para el tratamiento o la prevención de afecciones respiratorias. Los protocolos incluyen el diagnóstico de una afección o enfermedad respiratoria en un sujeto, la prescripción de un tipo y cantidad de xilano sulfatado tal como PPS o un derivado funcional u homólogo del mismo y el seguimiento del sujeto para mejora de los síntomas y/u otros signos de la enfermedad o afección. Los protocolos también pueden incluir la prescripción de otros agentes activos.
- De acuerdo con los aspectos anteriores, un sujeto puede ser cualquier animal, tal como un mamífero y en particular un humano.
- 25 Aunque no se pretende limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción propuesto, el sulfato de xilano puede actuar como un antagonista de una molécula inflamatoria tal como una citoquina o factor de crecimiento entre otras moléculas. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva también revela un ligando al que se une el xilano sulfatado tal como PPS. Por lo tanto, una fracción o derivado del xilano sulfatado tal como un PPS o una fracción o derivado del mismo puede actuar como un antagonista de un ligando. Ejemplos de ligandos incluyen, pero no se limitan a: una citocina incluyendo una interleucina (por ejemplo, la familia IL-5, IL-4, IL-13, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, T-10, IL-11, IL-12, IL-3, IL-14, IL-15 o IL-17, de citoquinas incluyendo IL-25), interferón (por ejemplo, α -interferón, β -interferón, γ -interferón) o un factor de crecimiento incluyendo pero no limitando a G-CSF, M-CSF, GM-CSF, BDNF, CNTF, EGF, EPO, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, LIF, PDGF, SCF, TGF α , TGF β , TNF α , TNF β , TPO, VEGF, GH, NGF, NT 3, NT4, NT5, NT6, NT7, oncostatina M (OSM) e insulina, o una quimiocina incluyendo, pero no limitando a MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, un miembro de la familia MIP-1 incluyendo MIP-1 α , MIP-2, eotaxina (eotaxina-1, -2 o -3), PBP (proteína básica de plaquetas), SDF-1, PBSF, PF4, RANTES, y similares; una enzima tal como elastasa; una enzima de la familia de la catépsina, moléculas de adhesión celular tales como PECAM-1; o un receptor soluble unido a virus o célula.
- 30
- 35
- 40 De acuerdo con lo anterior, la presente memoria descriptiva revela una composición que comprende una fracción o derivado de un xilano sulfatado que es un antagonista de un ligando seleccionado de la lista que comprende la familia IL-5, IL-4, IL-13, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-3, IL-14, IL-15 o IL-17 de citoquinas incluyendo IL-25, interferón, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, BDNF, CNTF, EGF, EPO, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, LIF, PDGF, SCF, TGF α , TGF β , TNF α , TNF β , TPO, VEGF, GH, NGF, NT 3, NT4, NT5, NT6, NT7, oncostatina M (OSM), insulina, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, un miembro de la familia MIP-1 incluyendo MIP-1 α , MIP-2, eotaxina (eotaxina-1, -2 o -3), PBP (proteína básica de plaquetas), SDF-1, PBSF, PF4, RANTES, elastasa; una enzima de la familia de la catépsina, una molécula de adhesión celular tal como PECAM-1 y un receptor soluble unido a célula o virus, comprendiendo dicha composición además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 45
- 50 Los ligandos particulares son IL-5, IL-4, IL-13, G-CSF y M-CSF; ligandos particulares también incluyen IL-8, MCP-1, MIP-1 α eotaxina-1 y eotaxina-2.
- El xilano sulfatado puede estar en una composición farmacéutica junto con uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las abreviaturas utilizadas en este documento se definen en la Tabla 1.

Tabla 1

Abreviaturas	
Abreviatura	Definición
Anti-LT	Antileucotrienos
AR	Rinitis alérgica
BALF	Líquido de lavado broncoalveolar
COPD	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
D. P.	Grado de polimerización
GAG	Glucosaminoglucano
GlcA	Ácido glucurónico
GlcN	Glucosamina
h	Humana
H	Heparina
HL	Similar a la heparina
HLGAG	Glicosaminoglicanos similares a heparina
HPAA	Eje pituitario adrenal hipotalámico
ICS	Corticosteroides inhalados
IdoA	Ácido idurónico
INCS	Corticosteroides intranasales
LT	Leucotrienos
MMP	Metaloproteinasa de matriz
OVA	Ovoalbúmina
PPS	Polisulfato de pentosano
r	Recombinante

Breve descripción de las figuras

5 La figura 1 es una representación esquemática de polisulfato de pentosano (PPS).

La figura 2 es una representación esquemática de los xilo-oligosacáridos sulfatados, $n=1, -9$, $X=H$ o SO_3Na . La anomericidad del residuo terminal (reducción de terminal antes de sulfatación) puede ser α , β o una mezcla de ambos.

10 Las Figuras 3A-E son representaciones gráficas que muestran: A) las curvas de dosis-respuesta de pentosano (línea continua) y heparina (línea discontinua) para la inhibición de la unión de IL-4; B) la dosis-respuesta de pentosano (línea continua) y heparina (línea discontinua) para la inhibición de la unión de IL-5. En cada caso, la unión se midió utilizando una célula de flujo heparinizada en el BIAcore. C) la unión de diferentes concentraciones de eotaxina humana (CCL11)

- con heparina inmovilizada en una superficie de sensor, se muestran sensogramas generados por un BIAcore 2000; D) dosis-respuesta de polisulfato de pentosano (diamantes azules), heparina (triángulos verdes) y un xilano sulfatado que consta de 8 sacáridos (DP 8) (cuadrados rojos) para la inhibición de la unión de eotaxina-1 con una célula de flujo heparinizada en el BIAcore; E) dosis-respuesta de polisulfato de pentosano (cuadrados rojos) y heparina (diamantes azules) para la inhibición de la unión de eotaxina-2 con una celda de flujo heparinizada en el BIAcore.
- 5 La figura 4 es una representación gráfica que muestra las curvas de dosis-respuesta de pentosano (línea continua) y heparina (línea discontinua) para la proliferación dependiente de IL-5 de células Ba/F-IL-5.
- La figura 5 es una representación gráfica que muestra las curvas de dosis-respuesta de pentosano (línea continua) y heparina (línea discontinua) para la proliferación dependiente de IL-4 de las células TF-1.8.
- 10 La figura 6 es una representación gráfica que muestra la curva de dosis-respuesta para la proliferación dependiente de GM-CSF de las células TF-1.8.
- La figura 7 es una representación gráfica que muestra el efecto de los carbohidratos sulfatados en la proliferación de la proliferación de células TF 1.8 obtenidas con 0.025 ng/mL de GM-CSF.
- 15 La figura 8 es una representación gráfica que muestra la curva de dosis-respuesta para la proliferación dependiente de IL-2 de las células CTLLuc.
- La figura 9 es una representación gráfica que muestra el efecto de los carbohidratos sulfatados sobre la proliferación de células CTLLuc obtenida con 1.25 ng/mL de IL-2 (rh) recombinante humano.
- La figura 10 A y B son representaciones gráficas que muestran: A) una curva de respuesta a la dosis para la inhibición de la actividad de elastasa de leucocitos humanos por PPS; y B) una curva de respuesta a la dosis para la inhibición de elastasa de leucocitos humanos por heparina.
- 20 La figura 11 es una representación gráfica que muestra el efecto tanto de heparina (H) como polisulfato de pentosano (PPS) en el contenido de proteína de fluido de lavado nasal de cobayas sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y desafiados intranasalmente con OVA (modelo animal de rinitis alérgica). Estos datos se compararon con el control positivo que fue sensibilizado y desafiado con OVA, pero no tratados con los fármacos. La significación estadística se muestra (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$), y se da el % de inhibición. Se utilizaron heparina y PPS a 1, 5, 10 y 20 mg/kg.
- 25 La figura 12 es una representación gráfica que muestra el efecto tanto de heparina (H) como de polisulfato de pentosano (PPS) en los niveles de leucocitos que se infiltran en las cavidades nasales y se recoge en el líquido de lavado nasal de cobayas sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y expuestos por vía intranasal con OVA (modelo animal de rinitis alérgica). Estos datos se compararon con el control positivo que fue sensibilizado y desafiado con OVA, pero no tratados con los fármacos. La significación estadística se muestra (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$), y se da el % de inhibición. Se utilizaron heparina y PPS a 1, 5, 10 y 20 mg/kg.
- 30 La figura 13 es una representación gráfica que muestra los efectos de PPS y la mezcla xilano sulfatado tetra- y penta-sacárido en el infiltrado celular contenida en el fluido de lavado nasal de cobayas sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y desafiados por vía intranasal con OVA (modelo animal de rinitis alérgica). Ambos fármacos se usaron a 5 mg/kg. Estos datos se compararon con el control positivo que fue sensibilizado y desafiado con OVA, pero no tratados con los fármacos. La significación estadística se muestra (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$), y se da el % de inhibición.
- 35 La figura 14 es una representación gráfica de la inhibición de PPS el nivel de proteína (A) y el infiltrado de leucocitos (B) en el líquido de lavado broncoalveolar recogido de cobayas sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y desafiados con OVA inhalado (modelo de asma). Se utilizó PPS a 0.1, 0.5, 2.5 y 10 mg/kg. La significación estadística se muestra (* = $p < 0.05$) y se da el % de inhibición.
- 40 La figura 15 es una representación gráfica del efecto de diversas concentraciones de PPS en los componentes de hiperreactividad de vías respiratorias medidos en cobayas sensibilizados con OVA y desafiados con OVA inhalado (modelo de asma). Se muestra la respuesta a tres concentraciones de metacolina (3, 10 y 30 mg/mL). Se utilizó PPS a 0.1, 0.5 y 2.5 mg/kg. La significación estadística se muestra (** = $p < 0,01$) para una comparación con el control positivo (sensibilizado y desafiado con OVA, pero administrando PBS). (A) Resistencia de las vías respiratorias (R_L); (B) Distensibilidad pulmonar ($C_{D_{dyn}}$).
- 45 La figura 16 es una representación gráfica del efecto de PPS y el pentasacárido xilano sulfatado utilizado en 20, 10, 2.5 y 1.25 $\mu\text{g/mL}$ en la proliferación mediada por IL-13 (2.5 ng/mL) de células TF-1. Se muestra el % de inhibición en relación con el control positivo, que fue IL-13 con fármacos no sulfatados.

La figura 17 es una representación gráfica del efecto de PPS y el pentasacárido xilano sulfatado en la capacidad de células HL-60 tratadas con DMSO para migrar en respuesta a 20 ng/mL de IL-8. El número de células que migran en la cámara inferior de una placa de quimiotaxis de 96 pozos se cuantificó utilizando colorante AQUEOUS ONE donde la absorbancia se midió a 490 nm. PPS y el pentasacárido xilano sulfatado se utilizaron a 10 y 50 µg/mL. Se muestran la migración celular en ausencia de quimioquina (sin agente) y con IL-8, pero sin inhibidor.

La figura 18 es una representación gráfica del efecto de PPS y el pentasacárido xilano sulfatado en la capacidad de las células THP-1 para migrar en respuesta a 10 ng/mL de MCP-1. El número de células que migran a la cámara inferior de una placa de quimiotaxis de 96 pozos se cuantificó utilizando colorante AQUEOUS ONE, donde la absorbancia se midió a 490 nm. PPS y el pentasacárido xilano sulfatado se utilizaron a 10 y 50 µg/mL. Se muestran la migración celular en ausencia de quimioquina (sin agente) y con MCP-1, pero sin inhibidor.

La figura 19 es una representación gráfica del efecto de PPS y el pentasacárido xilano sulfatado en la capacidad de células U937 tratadas con DMSO para migrar en respuesta a 40 ng/mL de MIP-1 α . El número de células que migran a la cámara inferior de una placa de quimiotaxis de 96 pozos se cuantificó utilizando colorante AQUEOUS ONE, donde la absorbancia se midió a 490 nm. PPS y el pentasacárido xilano sulfatado se utilizaron a 10 y 50 µg/mL. Se muestra la migración celular en ausencia de quimioquina (sin agente) y con MIP-1 α pero sin inhibidor.

Descripción detallada

La presente invención se define por las reivindicaciones.

Esta memoria descriptiva revela los siguientes aspectos.

A menos que se indique lo contrario, la memoria descriptiva en cuestión no se limita a formulaciones específicas de los componentes, métodos de fabricación, regímenes de dosificación o similares, como tal, puede variar. La terminología utilizada en este documento es para el propósito de describir realizaciones o aspectos particulares únicamente y no pretende ser limitante.

Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un xilano sulfatado" incluye un único xilano sulfatado, así como dos o más xilanos sulfatados; referencia a "un agente activo" incluye un agente activo único, así como dos o más agentes activos; referencia a "la invención" incluye un solo aspecto o varios aspectos de una invención; y así sucesivamente.

Los términos "compuesto", "agente activo", "agente químico", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "activo", "fármaco" y similares se usan indistintamente en este documento para referirse a un compuesto químico tal como un xilano sulfatado que induce un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. En este contexto, el efecto incluye el tratamiento o la profilaxis de, o la mejora de los síntomas asociados con una afección respiratoria tal como asma, rinitis alérgica y/o COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva). Los términos también abarcan ingredientes farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activos de los agentes activos mencionados específicamente en este documento incluyendo, pero no limitado a, sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos activos, análogos y similares. Cuando se utilizan los términos "compuesto", "agente activo", "agente químico", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "activo", "fármaco" y similares, entonces se debe entender que esto incluye el activo agente *per se*, así como sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos, análogos, etc. farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activos. También están abarcadas las moléculas de compuestos y composiciones.

La referencia a un "compuesto", "agente activo", "agente químico" "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "activo", "fármaco" y similares incluye combinaciones de dos o más sustancias activas, tales como dos o más xilanos sulfatados o moléculas compuestas-xilano sulfatado o un xilano sulfatado y otro agente terapéutico. Una "combinación" también incluye varias partes, tales como una composición farmacéutica de dos partes, donde se proporcionan los agentes por separado y se les da o dispensan por separado o mezclados juntos antes de la dispensación. Por ejemplo, un paquete farmacéutico multiparte puede tener un xilano sulfatado o población de xilanos sulfatados y/o uno o más agentes antiinflamatorios. Un "agente antiinflamatorio" incluye una antihistamina, así como inhibidores de un factor estimulante de colonias (CSF) o factor de crecimiento o citoquina tal como un antagonista de IL-5, IL-4 "IL-13, G-CSF o M-CSF o inhibidores de una quimiocina tal como IL-8, MCP-1, un miembro de la familia MIP-1 por ejemplo, MIP-1 α , o eotaxina o un receptor de la misma, o una enzima como leucocitos elastasa. Ejemplos de antagonistas incluyen anticuerpos y receptores solubles.

La referencia a una lista de citoquinas tales como "IL-5, IL-4, IL-13, G-CSF o M-CSF" o quimiocinas como "IL-8, MCP-1, eotaxina (eotaxina-1, -2 o -3), un miembro de la familia MIP-1, por ejemplo, MIP-1 α " significa que, en una realización, la citoquina es IL-5; en otra realización es IL-4; en otra realización es IL-13; en otra realización es IL-8; en otra realización es MPC-1; en otra realización es MIP-1 α ; y en otra realización es G-CSF, y en otra realización es M-CSF.

Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente como se usa en este documento significa una cantidad suficiente del agente para proporcionar el efecto terapéutico o fisiológico deseado. Los efectos indeseables, por ejemplo, efectos secundarios, a veces se manifiestan junto con el efecto terapéutico deseado; por lo tanto, un practicante equilibra los beneficios potenciales contra los riesgos potenciales en la determinación de lo que es una "cantidad eficaz" apropiada. La cantidad exacta requerida varía de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por lo tanto, puede que no sea posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto normal en el arte utilizando experimentación de rutina. La cantidad eficaz en este contexto incluye una cantidad requerida para tratar o prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad respiratoria tal como asma, rinitis alérgica y/o COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva). Por "mejorar" se incluye el alivio de los síntomas adversos, induciendo un estado de comodidad o bienestar o eliminación o reducción de los marcadores bioquímicos, fisiológicos o clínicos de la enfermedad.

Por portador, excipiente o diluyente "farmacéuticamente aceptable" se entiende un vehículo farmacéutico compuesto de un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, i.e., el material se puede administrar a un sujeto junto con el agente activo seleccionado sin causar ninguna o una reacción adversa sustancial. Los portadores pueden incluir excipientes y otros aditivos tales como diluyentes, detergentes, agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, conservantes y similares. Una composición también puede ser descrita *inter alia* como un medicamento, formulación, agente o fármaco.

De manera similar, una sal, éster, amida, profármaco o derivado de un compuesto "farmacológicamente aceptable" como se proporciona en este documento es una sal, éster, amida, profármaco o derivado que este no es biológicamente o de otra manera indeseable.

Los términos "tratar" y "tratamiento" como se utiliza en este documento, se refieren a la reducción en la gravedad y/o frecuencia de los síntomas de la condición de la enfermedad o infección, eliminación de los síntomas y/o causa subyacente, la prevención de la aparición de los síntomas de la afección enfermedad o la infección y/o su causa subyacente y la mejora o reparación de los daños después de una enfermedad o condición. La afección que se está tratando o previniendo es una afección respiratoria. Los términos "afección respiratoria" y "enfermedad respiratoria" se pueden utilizar indistintamente en este documento. En un aspecto, la enfermedad o afección respiratoria es una enfermedad o afección pulmonar. En otro aspecto, la enfermedad o afección respiratoria o pulmonar es una enfermedad o afección inflamatoria y/o alérgica.

"Tratar" un paciente puede implicar la prevención de una enfermedad o afección o evento fisiológico adverso en un individuo susceptible, así como el tratamiento de un individuo clínicamente sintomático inhibiendo una enfermedad o afección.

"Paciente" como se utiliza en este documento se refiere a un animal, tal como mamífero, incluyendo un ser humano que puede beneficiarse de las formulaciones y métodos farmacéuticos descritos en este documento. No hay limitación en el tipo de animal que podría beneficiarse de las formulaciones y métodos farmacéuticos descritos actualmente. Un paciente independientemente de si un animal no humano o humano puede ser referido como un individuo, sujeto, animal, anfitrión o receptor, así como del paciente. Los compuestos y métodos descritos en este documento tienen aplicaciones en la medicina humana, medicina veterinaria, así como en la cría de animales, domésticos o salvajes en general, así como la industria de las carreras en relación con las afecciones respiratorias.

Los polianiones se han sugerido como tratamientos para el asma y la rinitis alérgica, incluyendo heparina y heparinas de peso molecular bajo, heparinas modificadas, oligosacáridos preparados a partir de heparina, maltohexaosa sulfatada y sacáridos sulfatados de tamaño D. P. 2-4 [Suchankova et al, Eur J Pharmacol, 507(1-3):261-71, 2005. Effects of bemiparin on airway responses to antigen in sensitized Brown-Norway rats; Parish et al, US Patent 6,143,730; Kuzsmann et al, WO2006017752]. De manera significativa, las moléculas descritas en estas referencias tienen un mayor grado de sulfatación por residuo monosacárido que los de la presente invención. Los xilanos están limitados a un máximo de dos sulfatos por residuo, mientras que los oligosacáridos que contienen glucosa pueden poseer tres sulfatos por residuo. Las heparinas y preparaciones de heparina de bajo peso molecular tienen el inconveniente de que son anticoagulantes y por lo tanto comprometen la seguridad de medicamentos para uso rutinario en el asma y la rinitis alérgica. En contraste, PPS es barato de fabricar y fácilmente disponibles comercialmente en una forma apropiada para la administración. Por otra parte, debido a su uso a largo plazo como un agente terapéutico, la farmacología de PPS está bien establecida. En particular, ya que es un anticoagulante débil con sólo alrededor de 1/15^a del anticoagulante de la heparina, es menos probable que tenga los problemas de seguridad que acompañan el uso de heparina como un medicamento para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Polisulfato de pentosano se ha utilizado previamente como un tromboprolíptica para prevenir la trombosis venosa profunda. También se ha investigado para el uso en la enfermedad de priones, como un agente anti-angiogénico en oncología, como un reactivo para bloquear la infección por VIH-1, un reactivo para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal y un tratamiento para la artritis reumatoide. También se ha utilizado en la medicina veterinaria para tratar enfermedad de las articulaciones no infecciosas en particular en

perros y caballos, y más particularmente, osteoartritis, articulaciones traumáticas e inflamación periarticular, y osteocondrosis disecante.

La referencia a un "xilano sulfatado" incluye xilooligosacáridos sulfatados tales como los preparados a partir de los β 1-4 xilooligosacáridos, así como pentasacáridos xilano sulfatados. Los xilanos sulfatados incluyen xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, xilohexaosa, xilooctaosa xiloheptaosa, xilononaosa y xilodecaosa (véase Figura 2). En una realización particular, el xilano sulfatado es polisulfato de pentosano o PPS. PPS es un polisacárido heterogéneo, preparado por la sulfatación química de polisacárido xilano extraído de plantas, por lo general madera de haya [Bayol et al, Patente de los Estados Unidos 4,713,373]. Se ha caracterizado como un polímero de β 1-4 unido xilano sulfatado con un residuo de ácido 1-2 unido metilglucurónico que ocurre aproximadamente cada 10 residuo de xilosa. El peso molecular de PPS se informó que está en el intervalo 1000-6000 Da, con un peso molecular promedio de ~4500Da ["Elmiron". Pentosan Polysulfate Sodium. Product Monograph. Janssen-Ortho Inc January 2006]. No obstante, estas características, PPS también contiene xilo-oligosacáridos sulfatados pequeños de grado de polimerización (D.P.) 2-8 [Degenhardt et al, Arch Pharm (Weinheim), 334(1):27-9, 2001]. La referencia a "xilano sulfatado" incluye una fracción purificada, así como una mezcla heterogénea. El término también incluye derivados y homólogos de xilanos sulfatados.

Se revela un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un xilano sulfatado o un derivado u homólogo del mismo o una sal del mismo durante un tiempo y en condiciones suficiente para la mejora de los síntomas de la afección respiratoria.

A pesar de que se utilizan con mayor frecuencia las sales de sodio de los carbohidratos sulfatados, otros cationes pueden ser sustituidos por sodio. Los cationes sustituidos para el sodio en la formación de sales incluyen, calcio, zinc, amonio y trietanolamina, pero se puede utilizar cualquier sal "farmacológicamente aceptable".

En una realización, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un sulfato de xilano durante un tiempo y en condiciones suficientes para la mejora de los síntomas de la afección respiratoria.

El xilano sulfatado es polisulfato de pentosano (PPS), tal como se define por las reivindicaciones.

Por lo tanto, otro aspecto revela un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad efectiva de PPS o un derivado funcional u homólogo del mismo durante un tiempo y en condiciones suficientes para mejora de los síntomas de la afección respiratoria.

Sin embargo, otro aspecto revela un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad efectiva de PPS o una sal del mismo durante un tiempo y en condiciones suficientes para la mejora de los síntomas de la afección respiratoria.

La afección respiratoria se selecciona de la lista que comprende asma, rinitis alérgica, COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva) y las afecciones relacionadas fisiológicamente, bioquímicamente o clínicamente.

Al igual que con la lista CSF anterior, la lista de afecciones respiratorias significa que, en una realización, es el asma; en otra realización es la rinitis alérgica; y en otra realización es COPD.

Por lo tanto, este aspecto se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria seleccionada de la lista que comprende asma, rinitis alérgica, COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva).

Otro aspecto se refiere al tratamiento o la profilaxis de una condición respiratoria seleccionada de la lista que comprende asma, rinitis alérgica, COPD (incluyendo enfisema). La composición farmacéutica comprende PPS.

Como se ha indicado anteriormente, la afección también se puede considerar una enfermedad. En una realización, la enfermedad o afección es una afección pulmonar o respiratoria inflamatoria o alérgica.

Por lo tanto, se revela un método para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o afección respiratoria inflamatoria o alérgica, incluyendo pulmonar, en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un sulfato de xilano o un derivado u homólogo del mismo durante un tiempo y en condiciones suficientes para mejorar los síntomas o indicaciones clínicas de la enfermedad o afección.

En un ejemplo de la presente divulgación, el medicamento se administra por inhalación o como una pulverización nasal o como gotas nasales.

Todavía otro aspecto se refiere al uso de un xilano sulfatado o un derivado u homólogo del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección respiratoria.

El xilano sulfatado es un pentasacárido xilano sulfatado, i.e. PPS. Ejemplos de afecciones respiratorias incluyen enfermedades pulmonares tales como enfermedades alérgicas o inflamatorias pulmonares, como el asma, rinitis alérgica, y COPD (incluyendo enfisema, bronquitis crónica y bronquiolitis obstructiva).

Como se ha indicado anteriormente, un xilano sulfatado particular es PPS. En otra realización, el sujeto es un humano. A este respecto, otro aspecto proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o afección respiratoria inflamatoria o alérgica incluyendo pulmonar en un ser humano.

Los xilanos sulfatados descritos en este documento pueden ser sometidos a la sulfatación adicional u otra modificación. El grado de sulfatación, por ejemplo, puede ser modificada para modular la unión a ligandos de proteínas en las superficies celulares. La referencia a un "xilano sulfatado" o un "PPS" incluye sus sales.

Otro aspecto de la presente divulgación contempla un método para la producción de xilanos sulfatado o moléculas de compuestos del tipo xilano sulfatado que interactúan con un ligando tal como una proteína, comprendiendo dicho método la producción de una biblioteca de xilanos sulfatados o moléculas compuestas-xilano sulfatadas y luego detección de cada miembro de dicha biblioteca o grupos de miembros de dicha biblioteca para cualquier capacidad de interactuar con dicho ligando o para inhibir la interacción entre el ligando y xilano sulfatado conocida por interactuar con el ligando. La biblioteca puede ser de diferentes fracciones o derivados de los xilanos sulfatados. Como se indicó anteriormente, PPS es un ejemplo de un xilano sulfatado. Ejemplos de ligandos incluyen, pero no se limitan a: por ejemplo, familia IL-5, IL-4, IL-13, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-3, IL-14, IL-15 o IL-17 de citoquinas incluyendo IL-25), interferón (por ejemplo, α -interferón, β -interferón, γ -interferón) o un factor de crecimiento incluyendo pero no limitando a G-CSF, M-CSF, GM-CSF, BDNF, CNTF, EGF, EPO, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, LIF, PDGF, SCF, TGF α , TGF β , TNF α , TNF β , TPO, VEGF, GH, NGF, NT 3, NT4, NT5, NT6, NT7, oncostatina M (OSM) e insulina, o una quimiocina incluyendo, pero no limitando a MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, un miembro de la familia MIP-1 incluyendo MIP-1 α , MEP-2, eotaxina (eotaxina-1, -2 o -3), PBP (proteína plaquetaria básica), SDF-1, PBSF, PF4, RANTES, y similares; una enzima tal como elastasa; una enzima de la familia de la catepsina, moléculas de adhesión celular tales como PECAM-1; o un receptor soluble o unido a célula o virus. Ligandos particulares son IL-5, IL-4, IL-13, GCSF y M-CSF; ligandos particulares también incluyen IL-8, MCP-1, MIP-1 α eotaxina-1 y eotaxina-2.

Por supuesto, existe cualquier número de ensayos que pueden ser utilizados para la detección de la interacción entre un xilano sulfatado o molécula compuesta del tipo xilano sulfatado y un ligando o utilizados para detectar la inhibición de la interacción entre un ligando y un xilano sulfatado. Un ensayo es un ensayo de unión con el filtro. En este ensayo, uno de un xilano sulfatado, o molécula compuesta del tipo xilano sulfatado, o un ligando está marcado con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal de identificación tal como un colorante fluorescente y ambas moléculas se les permite interactuar en solución. La mezcla resultante se pasa luego a través de un filtro capaz de retardar una del xilano sulfatado o molécula compuesta del tipo xilano sulfatado o el ligando, o sólo un complejo xilano sulfatado-ligando o complejo molécula compuesta del tipo xilano sulfatado-ligando.

En un ejemplo, el filtro es un filtro de nitrocelulosa que retarda ligandos. En este caso, si la fracción de xilano sulfatado, marcada con una molécula indicadora, que no logra pasar a través del filtro, a continuación, la presencia de la señal indicadora en el filtro indica la unión del xilano sulfatado con el ligando.

Diferentes xilanos sulfatados van a interactuar con diferentes ligandos o diferentes ligandos interactuarán con diferentes xilanos sulfatados o ambos. De acuerdo con lo anterior, otro ensayo implica el uso de columnas de afinidad que llevan ligandos inmovilizados. Los xilanos sulfatados o moléculas compuestas del tipo xilano sulfatado se pasan luego a través de la columna y la presencia de retraso de los xilanos sulfatados determinados. Un gradiente de sal se utiliza convenientemente para eluir xilanos sulfatados unidos o moléculas compuestas del tipo xilano sulfatado. Una vez que se identifica una fracción que se une a un ligando en una columna, puede analizar adicionalmente la fracción para obtener una indicación de la cantidad de diferentes entidades estructurales en el mismo. Tal análisis puede comprender, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico, espectrometría de masas o electroforesis.

Una vez que una población de xilanos sulfatados que se unen a un ligando particular, ha sido identificado, esta fracción en sí puede ser útil como agente terapéutico para inhibir la interacción entre una proteína (u otro ligando) y una molécula de superficie celular (tal como un HLGAG). La proteína (u otro ligando) pueden estar libres de célula o asociados con una célula o virus, tal como una superficie de la célula o superficie viral. El xilano sulfatado también puede ser útil como agente terapéutico para modular la interacción entre un producto celular secretado y los componentes de la matriz extracelular o entre una proteína de la superficie celular y componentes de la matriz extracelular, o entre una proteína y su ligando, ambos o cualquiera de los cuales puede ser la superficie celular o célula

asociada. Alternativamente, el xilano sulfatado se puede utilizar como un objetivo para identificar los productos naturales o productos de una biblioteca química que imitan el xilano sulfatado en términos de unión a un ligando o que inhibe o promueve la interacción entre el xilano sulfatado y el ligando. Estas moléculas pueden ser antagonistas o agonistas o análogos químicos del xilano sulfatado. Por lo tanto, un "análogo" se extiende a y abarca cualquier estructura que es funcionalmente equivalente en que se une y/o modula un ligando de una manera análoga.

La referencia en este documento a "modular" o "modulación" se extiende y abarca la inhibición y/o la promoción de una interacción.

Otro aspecto proporciona una composición que comprende un xilano sulfatado y uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 En un aspecto particular, se revela una composición que comprende un xilano sulfatado que actúa como un antagonista a un ligando seleccionado de una citoquina incluyendo una interleucina (por ejemplo, familia IL-5, IL-4, IL-13, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-3, IL-14, IL-15 o IL-17 de citoquinas incluyendo IL-25), interferón (por ejemplo, α -interferón, β -interferón, γ -interferón) o un factor de crecimiento incluyendo pero no limitando a G-CSF, M-CSF, GM-CSF, BDNF, CNTF, EGF, EPO, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, LIF, PDGF, SCF, TGF α , TGF β , TNF α , TNF β , TPO, VEGF, GH, NGF, NT 3, NT4, NT5, NT6, NT7, oncostatina M (OSM) e insulina, o una quimiocina incluyendo pero no limitando a MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, un miembro de la familia MIP-1 incluyendo MIP-1 α , MIP-2, eotaxina (eotaxina-1, -2 o -3), PBP (proteína básica de plaquetas), SDF-1, PBSF, PF4, RANTES, y similares; una enzima tal como elastasa; una enzima de la familia de la catepsina, moléculas de adhesión celular tales como PECAM-1; o un receptor soluble unido a célula o virus, la composición que comprende además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos aceptables.

25 En un ejemplo relacionado de la presente divulgación se refiere a una composición que comprende una fracción o derivado de un xilano sulfatado que es un antagonista de un ligando seleccionado de la lista que comprende la familia IL-5, IL-4, IL-13, IL-6, IL-7, IL-8, IL 9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-3, IL-14, IL-15 o IL-17 de citoquinas incluyendo IL-25, interferón, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, BDNF, CNTF, EGF, EPO, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, LIF, PDGF, SCF, TGF α , TGF β , TNF α , TNF β , TPO, VEGF, GH, NGF, NT 3, NT4, NT5, NT6, NT7, oncostatina M (OSM), insulina, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, un miembro de la familia MIP-1 incluyendo MIP-1 α , MIP-2, eotaxina (eotaxina-1, -2 o -3), PBP (proteína básica de plaquetas), SDF-1, PBSF, PF4, RANTES, elastasa; una enzima de la familia de la catepsina, una célula de moléculas tal como PECAM-1 y un receptor soluble unido a célula o virus, dicha composición comprende además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos aceptables.

30 Moléculas particulares que se antagonizan incluyen IL-5, IL-4, IL-13, G-CSF y M-CSF; moléculas particulares también incluyen IL-8, MCP-1, MIP-1 α , eotaxina-1 y eotaxina-2.

35 Todo los xilanos sulfatados mencionados anteriormente están cubiertos genéricamente por el término "ingredientes activos". Se propone que estas composiciones para uso como composiciones o formulaciones farmacéuticas.

40 Las composiciones incluyen soluciones acuosas estériles y polvos estériles. Tales formas son convenientemente estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y, en general se conservan en comparación de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dilución que comprende, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas apropiadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de surfactantes. Las prevenciones de la acción de microorganismos se pueden llevar a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Las soluciones estériles se preparan incorporando los ingredientes activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con el ingrediente activo y opcionalmente otros ingredientes activos que se requiera, seguido por esterilización o al menos un proceso para reducir la contaminación de virus, bacterias u otras entidades biológicas a niveles aceptables para la administración a un sujeto humano o animal. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, métodos apropiados de preparación incluyen secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado.

50 Cuando el ingrediente activo está protegido apropiadamente, se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o se puede contener en cápsulas de gelatina de cubierta dura o

blanda, o pueden comprimirse en comprimidos. Para la administración terapéutica oral, el ingrediente activo se puede incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 1% en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 5 a aproximadamente 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación apropiada. Las composiciones o preparaciones particulares se preparan de modo que una forma de dosificación unitaria oral contiene entre aproximadamente 0.1 µg y 200 mg del compuesto activo. Las cantidades de dosificación alternativas incluyen de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1000 mg y de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 500 mg. Estas dosificaciones pueden ser por persona o por kg de peso corporal. La administración puede ser por segundo, minuto, hora, día, semana, mes o año.

Los comprimidos, trociscos, píldoras y cápsulas y similares también pueden contener los componentes como se enumeran en este documento en adelante. Un aglutinante tal como goma, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina se puede adicionar. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la dosificación unitaria. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el(los) compuesto(s) activo(s) se puede(n) incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en el arte y excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo; su uso en las composiciones terapéuticas está contemplado. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

La composición también se puede formular para la administración local o tópica. Las técnicas para la formulación y administración se pueden encontrar en, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton PA., 16th edition, 1980, Ed. Por Arthur Osol. Por lo tanto, para la administración local o tópica, las composiciones en cuestión se pueden formular de cualquier manera apropiada, incluyendo, pero no limitado a, cremas, geles, aceites, ungüentos, soluciones, suspensiones, polvos, nieblas o aerosoles. Para la administración transmucosal, se utilizan en las formulaciones penetrantes apropiados a la barrera que se va a permear. Tales penetrantes son generalmente conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, digitonina, dihidroxitocalasina B, y ácido cáprico.

Las composiciones descritas en este documento, en forma de lociones, cremas o geles pueden contener diluyentes o portadores aceptables para impartir la deseada textura, consistencia, viscosidad y aspecto. Los diluyentes y portadores aceptables son familiares para los expertos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, surfactantes etoxilados y no etoxilados, alcoholes grasos, ácidos grasos, aceites de hidrocarburos (tales como aceite de palma, aceite de coco, y aceite mineral), manteca de cacao, ceras, aceites de silicona, agentes reguladores, derivados de celulosa, agentes emulsionantes tales como bases orgánicos e inorgánicos no iónicos, agentes conservantes, ésteres de cera, alcoholes esteroideos, ésteres de triglicéridos, fosfolípidos tales como lecitina y cefalina, ésteres de alcoholes polihídricos, ésteres de alcoholes grasos, derivados de lanolina hidrófilos, y derivados de cera de abeja hidrófilos.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

En los ejemplos, los agentes, reactivos y métodos citados se emplean a continuación:

Polisulfato de pentosano (PPS)

Polisulfato de pentosano (PPS) está disponible bajo diversas marcas tales como: Elmiron; Elmiron; Fibrase; Fibrezym; Hémoclar; Pentosanpolysulfat SP 54; Polyanion; SP54; Tavan-SP; Thrombocid; Cartorphen Vet; y Pentosan equine. Un fabricante del ingrediente activo es Bene PharmaChem. Los números de registro químico para PPS incluyen 37300-21-3, 9014-63-5, 11096-31-4, 39432-58-1, 42613-02-5 y 104783-23-5. PPS se utiliza como un ejemplo de un xilano sulfatado.

Reactivos especializados

(1) IL-5 e IL-4

IL-4 e IL-5 recombinantes humanos se preparan utilizando un sistema de expresión de baculovirus. IL-4 recombinante humana también se expresa en un sistema de expresión *E. coli*. Mutaciones de sitio dirigido que llevan IL-4 o IL-5 recombinante humana, se expresan utilizando un sistema de expresión de baculovirus. Las proteínas resultantes se purifican a continuación por cromatografía de afinidad sobre columnas NHS activadas HiTrap, derivatizadas con hidrazina y acoplados ya sea con el anticuerpo monoclonal H30, o el anticuerpo monoclonal TRFK-5, ambos de los cuales reconocen IL-5, o el anticuerpo monoclonal, 11B4, que reconoce IL-4.

MALDI-MS

Espectrometría de masas láser de ionización desorción asistida por matriz (MALDI MS) se realizó utilizando el procedimiento descrito por Venkataraman et al, Science 286(5439):537-542, 1999. El péptido básico (RG)₁₉R se preparó como la sal de trifluoroacetato por Auspep (Melbourne, Australia). Se adicionaron aproximadamente 20 µg de resina de intercambio aniónico AG-1 X2 en la forma de hidróxido (Bioard, Sydney, Australia) a una alícuota enfriada con hielo (100 µL) de péptido 50 µM. La suspensión resultante se centrifugó brevemente y se mantiene en un baño de hielo. Una parte alícuota de péptido (1 µL) se mezcló con 10 mg /µL de ácido cafeico en 50% v/v de acetonitrilo (8 µL) y la muestra 5-100 µM (1 µL), 1 µL manchado sobre una placa de muestra de acero inoxidable y se dejó secar. Los espectros MALDI MS fueron adquiridos en el modo lineal utilizando un instrumento de tiempo de vuelo Voager reflectron PerSeptive Biosystems (Applied Biosystems, Melbourne, Australia) equipado con un láser de nitrógeno 337-nm. Se utilizó extracción con retraso para aumentar la resolución (22kV, rejilla al 93%, cable guía a 0.15%, retardo de pulso 150ns, puerta de masa baja a 2000, 50 disparos promediado). Como alternativa, los espectros se adquirieron con un ABI Modelo 4800 instrumento MALDI. La calibración de masa se logró mediante la calibración externa con la mezcla de calibración de péptido proporcionado por el fabricante. La masa del oligosacárido se dedujo restando la masa del péptido (RG)₁₉R observada para esa muestra.

Xilooligosacáridos sulfatados

La mezcla de xilooligosacáridos (5 g) se disolvió en 100 mL de DMF. Se adicionó complejo de piridina-trióxido de azufre (36 g) y la solución se agitó durante 20 horas. La reacción se inactivó por adición de agua (500 mL) y se ajustó a pH 6 con tributilamina. Esta solución se dializa en 2 x 10 litros de agua utilizando tubos de diálisis MWCO de 3.5kDa. El dializado se concentró por ultrafiltración utilizando una membrana MWCO de 1 kDa y se fraccionó por HPLC de apareamiento iónico de fase reversa preparativa por inyección repetida.

Condiciones del ejemplo:

30 Columna: Phenomenex Axia 100 x 21.2 mm Luna C18 (2) equipado con un cartucho de guardia de seguridad (o un sustituto apropiado).

Eluyente A: Tributilamina 8 mM en 20% v/v de acetonitrilo ajustado a pH 5.8 con ácido acético.

Eluyente B: 80% v/v de acetonitrilo.

Flujo: 20 mL/min.

35 Detector: Dispersión de la luz por evaporación con flujo dividido de ~1:40 conseguido con una pieza en T.

El tamaño de las fracciones se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando dos de las columnas 250 x 7.8 mm Biosep 2000 (Phenomenex, o equivalentes, por ejemplo, TSK2000W) conectadas en serie y se eluyó con NH₄Cl 0.25 M a 0.5 mL/min. El eluyente se controló con un detector de índice de refracción. La(s) fracción(es) de tamaño apropiado se concentra(n) en un evaporador rotatorio y la solución resultante se liofilizó para eliminar el exceso de acetato de tributilamina. Las sales de tributilamina se pueden usar directamente, o alternativamente convertidos en las sales de sodio por el siguiente procedimiento. El residuo se disolvió en agua y la solución resultante se ajustó a pH 5.5 con ácido acético. Esta solución se aplicó a una columna de 4 x 2cm de Dowex 50WX8 (forma NA⁺) 2 x 4 cm y se lavó con tres volúmenes de columna de agua. El flujo a través y los lavados se recogieron y agruparon. Los lavados combinados se ajustaron a pH 7 y se dializan por ultrafiltración repetida con una membrana MWCO de 1 kDa. La solución concentrada se liofilizó para dar un polvo blanco.

Malto-oligosacáridos sulfatados

El uso de oligosacáridos purificados como materiales de partida que pueden ser preparadas por los procedimientos descritos en cualquiera de las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,021,544; US 6,271,215 y US 5,541,166. Estos materiales también se pueden preparar mediante un procedimiento análogo al descrito anteriormente, ya sea a partir de

un oligosacárido purificado o una mezcla de oligosacáridos. Por ejemplo, se disolvió maltohexaosa (0.1 g, Sigma-Aldrich) en DMF (10 mL) y se adicionó complejo de piridina-trióxido de azufre (1 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas y el producto se dejó separar como un aceite. El sobrenadante se decantó y el residuo se disolvió en agua (15 mL) y se ajustó a pH 6 con tributilamina. El material en bruto se purificó por HPLC y se procesa adicionalmente como se describe anteriormente para los xilo-oligosacáridos sulfatados. Se preparó de una manera similar maltoheptaosa sulfatada.

Las mezclas de oligosacáridos también pueden ser sulfatados y después fraccionados como se describe para los xilooligosacáridos sulfatados. Por ejemplo, jarabe pentrup de Hayashibara Internacional (5 g) se disolvió en 100 mL de DMF. Se adicionó complejo de piridina-trióxido de azufre (54 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas y el producto se dejó separar como un aceite. El sobrenadante se decantó y el residuo se disolvió en agua (15 mL) y se ajustó a pH 6 con tributilamina. La mezcla se fraccionó por HPLC y se procesa adicionalmente como se describe anteriormente para los xilo-oligosacáridos sulfatados.

Ejemplo 1

Ensayo de selección BIAcore

El fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial se utiliza para monitorizar las interacciones físicas entre las moléculas. Pasando una solución de un potencial ligando de proteína (por ejemplo, IL-4, IL-5 o eotaxina) sobre una superficie de sensor a la que una diana (por ejemplo, heparina) está acoplada controla la unión a tiempo real de ligandos de proteínas para la diana inmovilizada. La detección se logra midiendo los cambios del índice de refracción muy cerca de la superficie del sensor. Cuando se altera el índice de refracción, el ángulo en el cual la resonancia de plasmón produce cambios y este cambio se correlaciona directamente con la cantidad de proteína que interactúa con la superficie. Se utiliza convenientemente un BIAcore 2000. Es muy sensible y su microfluidica asegura que sólo se requieran pequeñas cantidades de material.

La heparina biotinilada se inmoviliza en el chip biosensor. La biotinilación se produce a través de grupos amino, o reduce el terminal modificado con amoniaco por aminación reductora, utilizando sulfo-NHS-biotina. Las soluciones que contienen potenciales ligandos de proteínas de interés se inyectan sobre la superficie del chip sensor, y la unión se mide en tiempo real (Fernig, In: Proteoglycan protocols, Ed. R.V. Iozzo, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2001). Baculovirus expresó IL-4 (rhIL-4) recombinante humana y baculovirus expresó IL-5 (rhIL-5) recombinante humana, se unen fácilmente a heparina inmovilizada por este método (véase PCT/AU2005/000551). La unión es específica, ya que hay poca interacción con los chips sensores que carecen de heparina con IL-4 o IL-5, y la unión es inhibida por heparina exógena. Del mismo modo, la eotaxina recombinante humana (CCL11) expresada en *E. coli* se une fácilmente a la heparina inmovilizada y la unión es específica ya que hay poca unión de eotaxina a heparina que carece del chip sensor. Por otra parte, la unión es dependiente de la concentración (Figura 3C). La unión de eotaxina a la heparina inmovilizada es inhibida por heparina exógena con una IC₅₀ de aproximadamente 160 nM.

Preparaciones de PPS inhiben la unión de IL-4, IL-5 y eotaxina con la heparina inmovilizada en el chip de BIAcore. Los experimentos de titulación indican que PPS es un inhibidor más potente de unión de IL-4 con la heparina inmovilizada que la heparina en sí con una IC₅₀ de alrededor de 25-80 nM frente a la IC₅₀ de 3.3-1 µM que se obtiene con heparina (Figura 3A). Experimentos de titulación similares indican que PPS es también un inhibidor más potente de unión de IL-5 con la heparina inmovilizada que la heparina en sí con una IC₅₀ de alrededor de 4-10 nM frente a la IC₅₀ de alrededor de 30-100 nM que se obtiene con heparina (Figura 3B). PPS es también un inhibidor más potente de unión de eotaxina-1 y eotaxina-2 con la heparina inmovilizada que la heparina en sí con una IC₅₀ de alrededor de 15 nM (Figura 3D y 3E). El tamaño de los polisacáridos xilosa sulfatados es un componente importante de su capacidad para unirse a eotaxina y de este modo bloquear la unión de eotaxina con la heparina. Un xilano sulfatado de D.P. 8 era menos capaz de inhibir la unión de eotaxina-1 con la heparina inmovilizada tiene una IC₅₀ de aproximadamente 3.5 µM (Figura 3D).

Estos datos indican que PPS se une a IL-4 en el sitio donde la heparina se une y que su unión con esta región es más estable que la de la unión con heparina. Estos datos indican de manera similar que PPS se une a IL-5 en el sitio donde la heparina se une y que es la unión a esta región es más estable que la de la unión a heparina. Los datos de eotaxina también indican que PPS se une a eotaxina-1 y eotaxina-2 en un sitio en la proximidad de donde se une la heparina y que es la unión a esta región más estable que la de la unión a heparina.

Ejemplo 2

50 Análisis funcional de polisulfato de pentosano sobre asma y rinitis alérgica de la proteína diana, IL-5

PPS inhibe la proliferación de una línea celular sensible a IL-5. Esto se produce a dosis muy bajas y no se debe a un efecto tóxico del PPS como otros polisacáridos sulfatados de manera similar no tienen ningún efecto en este ensayo.

Estos experimentos se llevan a cabo con las células sensibles IL-5, Ba/F-IL-5. Las células Ba/F-IL-5 se derivaron de la línea celular Ba/F3.

5 La línea celular Ba/F3 fue transformada para ser a la vez dependiente de IL-5 y expresar luciferasa por la cotransfección de las células con el vector de control pGL3 (Promega, EE.UU.) y pEE6hcmv-IL-5R α . El vector de control, pGL3 expresa una luciferasa modificada bajo el control directo del promotor de SV40 y el potenciador, pero no contiene ningún marcador seleccionable. Para preparar pEE6hcmv-hIL-5R α una cadena α del receptor IL-5 humano de longitud completa (hIL-5R- α) se clonó mediante RT PCR a partir de las células HL60. La preparación de las células Ba/F-IL-5 ha sido descrito por Coombe et al, Journal of Immunological Methods 215: 145-150, 1998. Las células Ba/F-IL-5 se pueden modificar adicionalmente por la cotransfección con pPGK-puromicina-luciferasa, un vector que contiene luciferasa, bajo el control del promotor SV40 con el marcador seleccionable, puromicina.

10 Después de la transfección, los transfectantes positivos se seleccionan en 3 μ g/mL de puromicina. Los transfectantes positivos se clonan para producir una línea con la expresión de la luciferasa detectable. Los ensayos de proliferación se realizan en microplacas de 96 pozos apropiadas para tales ensayos (Falcon). Los pozos son de fondo plano, con las caras blancas y un fondo claro. Las células se lavan para eliminar cualquier citocina en el medio de crecimiento y luego se resuspendieron en RPMI/5% p/v de FCS. Las células se contaron con un contador de partículas Coulter Z2 y Analizador de Tamaño (Coulter Electronics, Inglaterra) y habitualmente se adicionan 1.6×10^4 células a pozos de microplacas que contienen ya sea sin IL-5 (control negativo) o diversas diluciones de IL-5. Cuando el efecto de PPS, u otros polisacáridos sulfatados se van a medir, los pozos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas.

15 20 Las células proliferan durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada, después de lo cual la actividad de la luciferasa se mide por la adición de 50 μ L de solución reguladora de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, MgSO₄ 15 mM, DTT 33.3 mM, EDTA 0.1 mM, Na-luciferina 0.5 mM, ATP 0.5 mM, litio Co A 0.25 mM y 0.5% v/v de Triton X-100). Inmediatamente después de la adición de la solución reguladora de luciferasa a la placa se evaluó para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un contador Victor 1420 Multi-label (Wallac, Turku, Finlandia). Utilizando este ensayo se ha demostrado que PPS es un inhibidor eficaz de la proliferación celular Ba/F-IL-5 dependiente de IL-5 (Figura 4).

25 30 La capacidad de PPS para bloquear la unión de IL-5 marcado fluorescente (IL-5-Alexa 488) con su receptor también se prueba. Las células sensibles a IL-5, TF-1.8 y Ba/F-IL-5 se utilizan para estos experimentos. Las células TF-1.8 son un subclón de las células TF-1 que se han seleccionado para el crecimiento en IL-4 o IL-5. Las células TF-1 se establecieron inicialmente a partir de una muestra de médula ósea a partir de un varón con pancitopenia grave. Estas células son dependientes de IL-3 o GM-CSF para el crecimiento a largo plazo y son sensibles a una variedad de citoquinas incluyendo IL-4, pero no IL-5. La unión de IL-5 marcado fluorescente para células TF-1.8 o Ba/F-IL-5 se mide en presencia o ausencia de PPS por citometría de flujo.

35 40 Para apreciar completamente el efecto de la PPS sobre la actividad de IL-5, se examinan las células primarias sensibles a IL-5. Los eosinófilos de sangre periférica humana se aíslan de donantes sanos por un protocolo de selección negativa CD16. Una forma común para evaluar la activación de eosinófilos es mediante el seguimiento de su adhesión a IgG inmovilizada. El número de eosinófilos unido a IgG inmovilizada cuando IL-5 se presenta con los oligosacáridos seleccionados, o con heparina o heparán sulfato, en comparación con IL-5 por sí sola, se determina midiendo la actividad de la mieloperoxidasa. Los eosinófilos separados de sangre periférica no sobreviven más de cuatro días en ausencia de citoquinas. El efecto de la IL-5 en presencia de PPS en la supervivencia de eosinófilos respecto a la de IL-5 solo se evalúa en un intervalo de concentraciones de citoquinas. La supervivencia de eosinófilos se determina por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio.

Ejemplo 3

Análisis funcional de polisulfato de pentosano en el asma proteína diana, IL-4

45 50 PPS inhibe la proliferación de una línea celular sensible a IL-4 humana. Esto se produce a dosis muy bajas y no es debido a un efecto tóxico del polisulfato de pentosano porque otros, polisacáridos sulfatados de manera similar, a las mismas concentraciones de IL-4 y el polisacárido no tienen ningún efecto. Estos experimentos utilizan las células TF-1.8. Las células TF-1.8 son un subclón de las células TF-1 que se han seleccionado para el crecimiento en IL-4 o IL-5. Las células TF-1 se establecieron inicialmente a partir de una muestra de médula ósea a partir de un varón con pancitopenia grave. Estas células son dependientes de IL-3 o GM-CSF para el crecimiento a largo plazo y son sensibles a una variedad de citoquinas incluyendo IL-4, pero no IL-5.

Las células TF-1.8 se han transfectado con el gen de la luciferasa de luciérnaga contenida en el vector de expresión, pPGKpuromicina-luciferasa (Coombe et al, 1998, supra). Los transfectantes positivos se clonan para producir una línea con buena expresión de luciferasa. Los ensayos de proliferación se realizan en microplacas de 96 pozos apropiadas

para tales ensayos (Falcon). Los pozos son de fondo plano, con las caras blancas y un fondo claro. Las células se lavan para eliminar cualquier citocina en el medio de crecimiento y luego se resuspendieron en RPMI/5% p/v de FCS. Las células se contaron con un contador de partículas Coulter Z2 y Analizador de Tamaño (Coulter Electronics, Inglaterra) y habitualmente se adicionan 2.5×10^4 células a pozos de microplacas que contienen ya sea, sin IL-4 (control negativo) o diversas diluciones de IL-4. Cuando el efecto de PPS, u otros polisacáridos sulfatados que se van a medir, los pozos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas.

Las células proliferan durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada, después de lo cual la actividad de la luciferasa se mide por la adición de 50 µL de solución reguladora de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, MgSO₄ 15 mM, DTT 33.3 mM, EDTA 0.1 mM, Na-luciferina 0.5 mM, ATP 0.5 mM, litio Co A 0.25 mM y 0.5% v/v de Triton X-100). Inmediatamente después de la adición de la solución reguladora de luciferasa la placa se evaluó para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un contador Victor 1420 Multi-label (Wallac, Turku, Finlandia).

Utilizando este ensayo, los inventores demostraron que PPS inhibe notablemente la proliferación dependiente de IL-4 de células TF-1.8 (Figura 5).

Se examina, la capacidad de IL-4 marcado fluorescentemente para unirse a su receptor, en presencia o ausencia de polisulfato de pentosano. Estos experimentos se realizaron utilizando diferentes concentraciones de IL-4, que ha sido conjugado con AlexaFluor-488, y PPS. Las comparaciones con otros polisacáridos sulfatados demostraron que no tienen actividad en la inhibición de la proliferación dependiente de IL-4 de células TF-1.8, demostrará la especificidad.

Ejemplo 4

Polisulfato de pentosano no inhibe la actividad de GM-CSF o IL-2

Las células TF-1.8 se derivaron de células TF-1 que responden a GM-CSF humano (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Las células TF-1.8 conservaron su capacidad de respuesta a GM-CSF. Habitualmente se adicionan 2.5×10^4 células a pozos de microplacas que contienen ya sea sin GM-CSF (control negativo) o diversas diluciones de GM-CSF. Las células se cultivan durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada, después de lo cual la actividad de la luciferasa se mide por la adición de 50 µL de solución reguladora de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, MgSO₄ 15 mM, DTT 33.3 mM, EDTA 0.1 mM, Na-luciferina 0.5 mM, ATP 0.5 mM, litio Co A 0.25 mM y 0.5% v/v de Triton X-100). Inmediatamente después de la adición de la solución reguladora de luciferasa la placa se evaluó para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un contador Victor 1420 Multi-label (Wallac, Turku, Finlandia). Una titulación de GM-CSF estableció que estas células son dependientes de este factor de crecimiento (Figura 6). Cuando el efecto de PPS, u otros polisacáridos sulfatados se van a medir, los pozos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas, así como el GM-CSF. Estos experimentos han indicado que las concentraciones de 10 µg/mL y 1 µg/mL de PPS reproducible no tienen efecto sobre la proliferación de células TF-1.8 obtenida con 0.025ng/mL de GM-CSF (Figura 7).

La línea linfocítica T citotóxica (CTLL) murino es un subclón de células T derivadas de un ratón C57b1/6. Las células requieren de la interleucina-2 (IL-2) para el crecimiento y se utilizan para el ensayo de su presencia en los medios acondicionados. Las células son sensibles a tanto murino como IL-2 humana. Las células CTLL se han transfectado con el gen de la luciferasa de luciérnaga contenida en el vector de expresión, pPGK-puromicina-luciferasa (Coombe et al, 1998, supra). Los transfectantes positivos se clonan para producir una línea con buena expresión de luciferasa y estas células se denominan CTL-Luc. Los ensayos de proliferación se realizan en microplacas de 96 pozos apropiadas para tales ensayos (Falcon). Los pozos son de fondo plano, con las caras blancas y un fondo claro. Las células se lavan para eliminar cualquier citocina en el medio de crecimiento y luego se resuspendieron en RPMI/5% p/v de FCS. Las células se contaron con un contador de partículas Coulter Z2 y analizador de tamaño (Coulter Electronics, Inglaterra) y habitualmente se adicionan 1.6×10^4 células a pozos de microplacas que contienen ya sea sin IL-2 recombinante humano (rhIL-2) (control negativo) o diversas diluciones de rhIL-2. Cuando el efecto de PPS, u otros polisacáridos sulfatados se van a medir, los pozos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas.

Las células CTL-Luc proliferan durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada, después de lo cual la actividad de la luciferasa se mide por la adición de 50 µL de solución reguladora de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, MgSO₄ 15 mM, DTT 33.3 mM, EDTA 0.1 mM, Na-luciferina 0.5 mM, ATP 0.5 mM, litio Co A 0.25 mM y 0.5% v/v de Triton X-100). Inmediatamente después de la adición de la solución reguladora de luciferasa, la placa se evaluó para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un contador Victor 1420 Multi-label (Wallac, Turku, Finlandia). Los experimentos en los que se titula la concentración de rhIL-2 indican que CTL-Lucs son dependientes de IL-2 para la proliferación (Figura 8). Los experimentos en los que las células CTL-Luc se cultivan en la presencia de cualquiera de 10 µg/mL o 1 µg/mL de PPS reproducible no tienen ningún efecto sobre la proliferación de células CTL-Luc obtenidos con 1.25ng/mL de rhIL-2. (Figura 9). Estos experimentos con las líneas celulares sensibles GM-CSF IL-2 e indican que polisulfato de pentosano no interactúa con estas citoquinas de una manera que afecta su

actividad proliferativa. Estos experimentos también indican que PPS no es tóxico para las líneas celulares linfocíticas dependientes de citoquinas.

Ejemplo 5

Xilanos sulfatados muestran un aumento dependiente de tamaño en la actividad anti-IL-5 y anti-IL-4

5 Un número de diferentes preparaciones de xilano sulfatados medidos han sido preparados y se demuestra que el tamaño del sacárido es un componente importante de su actividad anti-IL-5. Estos experimentos utilizan las células Ba/F-IL-5 transfectadas con luciferasa. Habitualmente, se adicionan 1.6×10^4 células a pozos de microplacas que contienen ya sea sin IL-5 (control negativo) o IL-5 (0.4 ng/mL) o IL-5 (0.4 ng/mL) y diversas diluciones de polisulfato de pentosano, o una de las diferentes preparaciones de sulfato de xilano que poseen diferentes números de unidades de sacárido. Las células se dejan proliferar durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada, después de lo cual la actividad de la luciferasa se mide por la adición de 50 µL de solución reguladora de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, MgSO₄ 15 mM, DTT 33.3 mM, EDTA 0.1 mM, Na-luciferina 0.5 mM, ATP 0.5 mM, litio Co A 0.25 mM y 0.5% v/v de Triton X-100). Inmediatamente después de la adición de la solución reguladora de luciferasa la placa se evaluó para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un contador Victor 1420 Multi-label (Wallac, Turku, Finlandia). Utilizando este ensayo se ha demostrado que a pesar de polisulfato de pentosano es un inhibidor eficaz proliferación de células Ba/FIL-5 de dependiente de IL-5, los polisacáridos pequeños que comprenden 2, 3 o 4 unidades de xilosa sulfatados 1-4 unidas no fueron inhibidores eficaces cuando se utilizan a 1 µg/mL (Tabla 2). Los polisacáridos más grandes que comprenden de 5, 6 o 7 unidades de xilosa sulfatados 1-4 unidos inhibieron células Ba/F-IL-5 dependientes de IL-5 en aproximadamente un 15-16%, mientras que el xilano sulfatado de D.P. 8 inhibió en aproximadamente un 24% y una mezcla de polisacáridos de xilosa sulfatada de todo mayor que un octasacárido inhibida por 40%. PPS era un potente inhibidor a 1 µg/mL dando una inhibición de alrededor de 55% en este ensayo.

El tamaño de los polisacáridos de xilosa sulfatada es también un componente importante de su actividad anti-IL-4. Estos experimentos utilizan las células TF-1.8 transfectadas con luciferasa. Habitualmente, se adicionan 2.5×10^4 células a pozos de microplacas que contienen ya sea sin IL-4 (control negativo) o IL-4 (2.5 ng/mL) o IL-4 (2.5 ng/mL) y diversas diluciones de PPS, o uno de las diferentes preparaciones de sulfato de xilano que poseen diferentes números de unidades de sacárido. Las células se dejan proliferar durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada, después de lo cual la actividad de la luciferasa se mide por la adición de 50 µL de solución reguladora de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, MgSO₄ 15 mM, DTT 33.3 mM, EDTA 0.1 mM, Na-luciferina 0.5 mM, ATP 0.5 mM, litio Co A 0.25 mM y 0.5% v/v de Triton X-100). Inmediatamente después de la adición de la solución reguladora de luciferasa la placa se evaluó para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un contador Victor 1420 Multi-label (Wallac, Turku, Finlandia). Utilizando este ensayo se ha demostrado que a pesar de que PPS es un inhibidor eficaz de la proliferación de células TF-1.8 dependiente de IL-4, los polisacáridos más pequeños que comprenden 2, 3 o 4 unidades de xilosa sulfatadas 1-4 unidas fueron inhibidores totalmente ineficaces cuando se utilizan en cualquiera de 2.5 µg/mL o 5 µg/mL (Tabla 3). Los polisacáridos más grandes que comprenden 5, 6, o 7 unidades de xilosa sulfatada 1-4 unidas inhibieron células TF 1.8 dependientes de IL-4 en aproximadamente un 15-29%, cuando se utiliza a 2.5 µg/mL, mientras que el octasacárido y una mezcla de polisacáridos de xilosa sulfatada todo mayor que un octasacárido y utilizado en 2.5 µg/mL inhibió en aproximadamente un 21%. PPS fue un potente inhibidor a 2.5 µg/mL dando una inhibición de alrededor de 48% en este ensayo.

40

Tabla 2

Inhibición de la proliferación celular BA/F inducida por IL-5 en presencia de xilooligosacáridos sulfatados de D.P. y PPS especificada. Los carbohidratos estuvieron presentes en 1 µg/mL y se adicionó IL-5 a 0.39 ng/mL.

porcentaje de inhibición

D.P. 2	17%
D.P. 3	13%
D.P. 4	11%

D.P. 5	17%
D.P. 6	16%
D.P. 7	15%
D.P. 8	24%
PPS	55%

Tabla 3

Inhibición de la proliferación celular de TF 1.8 inducida por IL-4 en presencia de los xilooligosacáridos sulfatados de D.P. y PPS especificada. Se adicionó IL-4 a 2.5 ng/mL.

Concentración de inhibidor	Porcentaje de inhibición	
	2.5 µg/mL	5.0 µg/mL
D.P. 2	-21%	-18%
D.P. 3	-16%	-16%
D.P. 4	-5%	4%
D.P. 5	15%	22%
D.P. 6	29%	35%
D.P. 7	26%	38%
D.P. 8	21%	37%
PPS	48%	58%

5

Ejemplo 6

Polisulfato de pentosano inhibe la actividad de la elastasa

La elastasa es una proteína que es un objetivo potencial para el tratamiento de la COPD. Los ensayos de elastasa se realizaron en microplacas de plástico de 96 pozos para una fácil cuantificación por el lector de placas fluorescente. La elastasa de leucocitos humanos (5 nM/pozo) se incubó en presencia de ausencia de polisulfato de pentosano, u otros polisacáridos sulfatados, con el sustrato fluorogénico MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-amido-metil-cumarina (20 µM/pozo) en una solución reguladora de fosfato de sodio, pH 7.4. La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos antes de que la reacción se detuvo mediante la adición de 10 µL/pozo de ácido acético 250 nM y la mezcla se transfirió a un microplaca de 96 pozos con fluorescencia que se mide utilizando una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Diversas concentraciones de inhibidores se utilizan para permitir el cálculo de la concentración de polisacárido requerida para inhibir la actividad de la enzima en un 50% (IC₅₀). Estos datos indicaron que PPS inhibe la actividad de la elastasa que tiene una IC₅₀ en este ensayo de aproximadamente 1.8 µM, que se compara con la heparina IC₅₀ de aproximadamente 200 nM (Figura 10A y B).

También se midió la actividad de la elastasa utilizando un sustrato fisiológico, colágeno. Para estos experimentos de colágeno se revistió sobre los pozos de una microplaca. Se adicionó solución reguladora Tris (50 µL) junto con 25 µL de cualquiera de inhibidor (PPS u otros polisacáridos sulfatados) o solución reguladora. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos, antes de la tinción de los pozos para la proteína. Después de secar los pozos a temperatura ambiente el color restante se disolvió mediante la adición de 200 µL de solución de lisis (10% p/v de SDS en DMSO) y el OD se mide a 590 nm. Los experimentos de control incluyen colágeno sin digestión con enzimas como los valores 100% y con

la digestión con enzimas, pero sin inhibidor como los valores de 0%. En estos experimentos PPS fue un inhibidor eficaz de la elastasa.

Ejemplo 7

Polisulfato de pentosano inhibe la infiltración de leucocitos en un modelo animal de rinitis alérgica

5 Se utilizó un modelo de rinitis alérgica en cobayas. Los cobayas se sensibilizaron a la ovoalbúmina (OVA) dos veces (en los días 0 y 7) por una inyección intraperitoneal de 0.5 mL de solución salina que contiene 100 mg de $Al(OH)_3$ y 2 μg OVA. Tres semanas después de la última sensibilización, los animales se anestesiaron y la exposición de la cavidad nasal al alérgeno se realiza dejando caer solución OVA a 20 mg/mL en las cavidades nasales bilaterales. Para el control negativo los animales reciben sensibilización y estimulación con solución salina. Los animales se tratan previamente con vehículo o fármaco (polisulfato de pentosano o budesonida) 30 min antes de la instilación intranasal de OVA. Vehículo o fármacos se administran, 25 μL - 50 μL /orificio nasal. Una comparación del polisulfato de pentosano con budesonida, como compuesto de referencia, se incluye. Los animales se terminan y todos los parámetros se miden ocho horas después de la provocación.

15 La permeabilidad de la barrera de la mucosa nasal se evalúa mediante la medición de la fuga de plasma no tamizado y rico en proteínas en las cavidades nasales. La cantidad de plasma extravasado se indica como niveles de lavado nasal de la proteína total o albúmina. El fluido de lavado nasal se recogió enjuagando suavemente de las cavidades nasales con solución salina regulada con fosfato. Las células en este fluido se separan por centrifugación y se resuspendieron en solución salina regulada con fosfato y se contaron utilizando un analizador de hematología semiautomatizado. La composición de las células del lavado nasal se determina después de un cytospin y tinción con May Grynwald Giemsa.

20 Los datos indican que los niveles de exudación de plasma en la cavidad nasal se incrementaron significativamente, 8 horas después de la exposición intranasal con OVA. PPS redujo significativamente el contenido de proteína del fluido de lavado nasal que indicando una reducción en la exudación de plasma con este fármaco (Figura 11). Una evaluación de la infiltración de leucocitos en el fluido de lavado nasal indicó un aumento del recuento de leucocitos sobre la observada con animales sensibilizados con solución salina, sin embargo, PPS inhibió la infiltración de leucocitos en todas las concentraciones ensayadas (Figura 12). Los leucocitos más marcados en el lavado nasal son los eosinófilos con alguna evidencia de la infiltración de neutrófilos, los niveles de otros tipos de células: basófilos, linfocitos, monocitos y células epiteliales nasales son bajos y no significativamente diferentes de los observados en animales sensibilizados con solución salina. Los animales que recibieron el corticosteroide budesonida tuvieron una marcada disminución de la exudación de plasma en el lavado nasal y también una marcada disminución en el número total de células blanco en el fluido de lavado nasal, siendo la disminución más pronunciada en el número de eosinófilos. PPS de manera similar marcadamente redujo el infiltrado celular en el fluido de lavado nasal y como el corticosteroide su efecto más pronunciado fue una reducción de los eosinófilos (Figura 13). Otro xilano sulfatado que consiste en una mezcla de tetrasacárido y pentasacárido no fue tan eficaz como un inhibidor de la infiltración celular en la cavidad nasal como PPS (Figura 13).

Ejemplo 8

Polisulfato de pentosano es eficaz en un modelo animal de asma

Se utilizó un modelo de cobayas de asma. Los cobayas (8 por grupo) fueron sensibilizados a la ovoalbúmina por dos inyecciones intraperitoneales de ovoalbúmina (grado V, 20 μg) en gel de hidróxido de aluminio en los días 1 y 11. En el día 20 (24 horas antes de la evaluación de la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR)) cada animal recibió una dosis de desafío de OVA - esto tomó la forma de una exposición con aerosol 1 hora de OVA (10 μg). Los animales de control negativo no recibieron, ni sensibilización y ni desafío. Los controles positivos fueron sensibilizados y desafiados, pero no se les dio ningún tratamiento adicional o se trataron con vehículo (solución salina). Los compuestos de ensayo (PPS y el pentasacárido xilano sulfatado) y el vehículo se administraron por vía intratraqueal como microaspersión acuosa utilizando un dispositivo Century Penn. El dispositivo utilizado fue la jeringa de alta presión FMJ250 y un tubo de suministro de microaspersión 1A-1C. La entrega de tamaño de partícula sube a 32 μm . Durante el estudio el volumen entregado fue 100 μl para todas las formulaciones de prueba. Los compuestos de ensayo se administraron 30 minutos antes de la estimulación con OVA. Los animales se sometieron a cirugía de 24 horas después de la exposición para insertar una cánula en la tráquea, la cánula se conectó a la instrumentación que mide la presión y desafío en el flujo de aire. Después de la cirugía se les permitió a los animales a estabilizar durante 10 min antes de que se toman las lecturas de línea de base. La broncoconstricción fue evocado con metacolina en aerosol (10 mg/mL y 30 mg/mL) durante 20 segundos. La diferencia entre las lecturas de línea de base y la que se obtiene después de metacolina se utilizaron para calcular C_{dyn} y R_L . Por lo tanto, las mediciones de la función pulmonar se tomaron aproximadamente 25 horas después de la droga se administró. Tanto polisulfato de pentosano y el pentasacárido xilano sulfatado cuando se administró a 10 mg/kg fueron eficaces en la reducción de las lecturas de la hiperreactividad de las vías respiratorias. Su eficacia fue aproximadamente equivalente al que usualmente se ve con 7.5 mg/kg de dexametasona en este modelo.

Tabla 4

Datos de AHR expresado cómo % de disminución de la del control positivo para R _L y el % de aumento del control positivo para C _{dyn}				
Compuesto	R _L		C _{dyn}	
	MCh 10 mg/mL	MCh 30 mg/mL	MCh 10 mg/mL	MCh 30 mg/mL
Dexametasona*	93.9% **	86% **	76.5%**	84.8%**
Pentasacárido xilano sulfatado #	34%	25% *	48% **	37% **
Polisulfato de pentosano #	32%	35% **	38% *	49% **

* Dexametasona 15 mg/kg administrada por microaspiración intratraqueal

Compuestos glicanos de 10 mg/kg administrados por microaspiración intratraqueal

* Significativamente diferentes del control positivo P <0.05

** Significativamente diferentes del control positivo P <0.01

MM = metacolina

También se examinó un modelo animal ligeramente diferente. En este modelo los cobayas fueron sensibilizados a OVA dos veces por una inyección intraperitoneal de 0.5 mL de solución salina que contiene 20 mg de Al(OH)₃ y 20 µg de OVA. Las sensibilizaciones se llevan a cabo en los días 0 y 7. Tres semanas después de la última sensibilización, los animales fueron tratados previamente con ya sea vehículo o fármacos 30 min antes de la inhalación de OVA (en 10 mg/mL), durante 6 min (exposición al alérgeno). Para el control negativo, los animales recibieron o bien sensibilización y desafío con solución salina o sensibilización con solución salina y el desafío con OVA. Los animales se concluyeron y todos los parámetros se midieron 8 horas después de la provocación. Se administraron vehículo o fármacos por vía intratraqueal, 1 mL/kg de peso corporal, 30 min antes del desafío por vía intratraqueal con OVA. El vehículo para los compuestos fue solución salina. La budesonida como el compuesto de referencia se disolvió en el vehículo a concentraciones de 1 mg/mL. Para medir la resistencia de las vías respiratorias (R_L) y la distensibilidad pulmonar (C_{dyn}), broncoconstricción fue evocado con metacolina en aerosol (3 mg/mL, 10 mg/mL y 30 mg/mL). La diferencia entre las lecturas de línea de base y la que se obtiene después de metacolina se utilizaron para calcular C_{dyn} y R_L. El lavado broncoalveolar (BAL) se realizó inmediatamente después de las mediciones de la función pulmonar. Se analizó BAL para medir el contenido de proteína (como una medida de la fuga) y se realizaron recuentos del número de leucocitos, células diferenciales para indicar qué subconjuntos de leucocitos fueron mejor afectados por los fármacos.

Los datos indican que PPS redujo significativamente el número total de leucocitos que se infiltran en el fluido broncoalveolar de animales desafiados con OVA también redujo significativamente el contenido total de proteínas en el fluido broncoalveolar. Las concentraciones ensayadas fueron 0.1, 0.5, 2.5, y 10 mg/kg de peso. Todas las concentraciones de pentosano excepto 0.1 mg/kg significativamente (P <0.05) redujeron el contenido de proteína del observado cuando PBS se administró a los animales sensibilizados con OVA (control positivo) en una manera dependiente de la dosis (Figura 14A). Todas las dosis de pentosano también mostraron efectos inhibitorios de entre 85 y 100% (a excepción de 0.5 mg/kg) en el número de leucocitos que infiltran los tejidos respiratorios y se recogen en el fluido broncoalveolar y los efectos inhibitorios fueron significativos (P <0.5) (Figura 14B).

La medición de la hiperreactividad de R_L indicó que todas las dosis de polisulfato de pentosano mostraron efectos inhibitorios de más de 90% después de la estimulación con 10 mg de metacolina/mL y las dosis más altas de 0.5, 2.4 y 10 mg/kg de polisulfato de pentosano también inhibió de manera muy significativa R_L (siendo la inhibición 103%, 94% y 100%, respectivamente) (Figura 15A). Los efectos inhibitorios de polisulfato de pentosano se observaron también en las alteraciones de la distensibilidad pulmonar, las tres concentraciones más bajas ensayadas se muestran en la Figura 15B. Estos efectos se representan como un aumento en la distensibilidad pulmonar.

Ejemplo 9

Polisulfato de pentosano es eficaz en un modelo animal de COPD

Se utilizó un modelo en ratón de enfisema. La exposición aguda y crónica de los ratones a humo de cigarrillo condujo a las respuestas pulmonares que en parte imitan los cambios inflamatorios y estructurales observados en la COPD. En este modelo ratones C57B1/6J macho se someten a la exposición aguda y crónica al humo, siendo el aire ambiente normal la situación control. En el estudio agudo los ratones fueron expuestos a aire ambiente o al humo de cinco cigarrillos (aproximadamente 12 mg de alquitrán y 0.9 mg de nicotina) durante 20 minutos. En el estudio crónico, los ratones fueron expuestos a aire ambiente o al humo de tres cigarrillos/día durante 5 días/semana durante 6 meses. Los 4 grupos de ratones se dividieron adicionalmente de manera que los ratones dentro de cada grupo también recibieron PPS a través de una vía inhalatoria.

En los grupos de ratones de la exposición aguda, se les dio polisulfato de pentosano 30 minutos antes de la exposición al humo del cigarrillo. Evaluación de la eficacia del fármaco para los ratones en los grupos de la exposición aguda involucrados en la evaluación de capacidad antioxidante equivalentes de Trolox del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) al final de la exposición al humo. El BALF se examinó para citocinas y quimiocinas que están asociadas con una respuesta inflamatoria. Los niveles de estos agentes se determinaron a las 4 horas después de la exposición y a las 24 horas después de la exposición a humo de cigarrillo. Se midió una variedad de citocinas y quimiocinas. Estas incluyen: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, RANTES, MIP-1 α , quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas (KC), TNF- α y IFN- γ). También se determinó un recuento diferencial de células de las células en el BALF. Los resultados de este estudio indicaron que polisulfato de pentosano disminuyó el infiltrado celular en BALF de los animales expuestos a humo de cigarrillos, en particular, el número de neutrófilos fue atenuado de manera significativa en los animales expuestos a humo de cigarrillo y que también recibieron PPS.

Los animales en el estudio crónico recibieron PPS una vez al día durante la duración del experimento. A la terminación del experimento los animales se mataron y los pulmones se fijaron de forma intratraqueal con formalina (5%) y el volumen pulmonar se midió mediante desplazamiento de agua. El tejido pulmonar se preparó para histoquímica e inmunohistoquímica, los tejidos pulmonares que se tiñeron para hematoxilina-eosina y/o ácido periódico-Schiff o con anticuerpos para el marcador de macrófagos Mac-3. También se determinó el nivel de desmosina en el tejido pulmonar. Desmosina es un ácido imino-elastina específico; la evaluación de desmosina en el pulmón se toma como un indicador del contenido de elastina pulmonar. Una disminución en el contenido de desmosina evidencia de que los cambios enfisematosos están asociados con la proteólisis y degradación de la matriz. En conjunto los resultados de este estudio indicaron que PPS está actuando como un agente antiinflamatorio en este modelo COPD.

Ejemplo 10

30 Polisulfato de pentosano y un xilano sulfatado DP5 inhiben la actividad de la proteína IL-13 de asma

IL-13 es una citoquina con un papel clave en el asma y las enfermedades alérgicas (incluyendo rinitis alérgica) y parece particularmente importante en el bloqueo de la hiperreactividad de vías respiratorias observada con asma (Wills-Karp, Immunol. Rev. 202:175-190, 2004). Los datos recientes sugieren que la IL-13 también tiene un papel muy importante en la COPD (Tyner et al, J. Clin. Invest. 116:309-321, 2006; Lee et al, Respir. Res. 8:64-73, 2007). Polisulfato de pentosano (PPS) y un xilano sulfatado DP5 inhibe la proliferación de una línea celular sensible a IL-13 humana. Esto se produce a dosis muy bajas y no es debido a un efecto tóxico del PPS porque otros, polisacáridos sulfatados de manera similar, a las mismas concentraciones de IL-13 y el polisacárido no tienen ningún efecto. Estos experimentos utilizan las células TF-1. Las células TF-1 se establecieron inicialmente a partir de una muestra de médula ósea a partir de un varón con pancitopenia grave. Estas células son dependientes de IL-3 o GM-CSF para el crecimiento a largo plazo y son sensibles a una variedad de citoquinas incluyendo IL-4 e IL-13.

Los ensayos de proliferación se realizan en microplacas de 96 pozos apropiadas para tales ensayos (Falcon). Los pozos son de fondo plano, con las caras blancas y un fondo claro. Las células se lavan para eliminar cualquier citocina en el medio de crecimiento y luego se resuspendieron en RPMI/5% p/v de FCS. Las células se contaron con un contador de partículas Coulter Z2 y Analizador de Tamaño (Coulter Electronics, Inglaterra) y habitualmente se adicionan 2.5×10^4 células por pozo de microplacas que contienen ya sea sin IL-13 (control negativo) o diversas diluciones de IL-13. Cuando el efecto del PPS se va a medir, los pozos también contienen diversas concentraciones de esta molécula. Las células proliferan durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada, después de lo cual el número de células presentes se cuantifica por tinción con el colorante AQUEOUS ONE (30 μ L/pozo) durante 3 horas y después la absorbancia se lee a 490 nm. Utilizando este ensayo, los inventores demostraron que el PPS y un DP5 xilano sulfatado notablemente inhibe la proliferación dependiente de IL-13 de células TF-1 (Figura 16) con el 75-80% de la proliferación celular mediada por IL-13 bloqueada en concentraciones de PPS de 5- 10 μ g/mL.

Ejemplo 11

Polisulfato de pentosano y un xilano sulfatados DP5 inhiben la actividad de diversas quimiocinas, que desempeñan un papel en la inflamación asociada con la COPD

Se sabe que las quimiocinas juegan un papel importante en la mediación de la inflamación asociada con la COPD incluyen IL-8, MCP-1 y MIP-1 α (Barnes 2004, supra). Se demostró que PPS bloquea la migración celular provocada por IL-8. Estos experimentos se realizaron con células promielocíticas humanas HL-60 tratadas con DMSO. Estas células se derivan de un paciente con leucemia promielocítica aguda. Las células fueron tratadas con DMSO (1.2%) durante 4 días antes de ser utilizados en los experimentos. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas de 96 pozos Costar de quimiotaxis que constan de una cámara inferior a la que se adicionó la IL-8 humana (+/- inhibidor) y luego las células en RPMI y 1% v/v de FCS fueron adicionados a una cámara superior y la placa se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir que las células se muevan desde la cámara superior en la parte inferior. El número de células que migran a la cámara inferior se cuantificó mediante la marcación con una AQUEOUS ONE (20 μ L/pozo) durante 1.75 horas antes de leer la absorbancia a 490 nm. IL-8 se utilizó a una concentración final de 20 ng/mL y los inhibidores fueron pentasacárido xilano sulfatado (10 y 50 μ g/mL) y polisulfato de pentosano (10 y 50 μ g/mL). La migración celular se compara con la observada sin IL-8 o con IL-8 y sin inhibidor. Estos datos indican que PPS es un buen inhibidor en este ensayo como la migración celular se inhibe en un 74% con 50 μ g/mL de PPS (Figura 17).

Para examinar si PPS o el pentasacárido xilano sulfatado eran inhibidores eficaces de la quimiocina MCP-1, se utilizó la línea celular de monocitos humanos THP-1. Estas células se derivan originalmente de la sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda. El ensayo fue muy similar a la descrita anteriormente. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas de 96 pozos Costar de quimiotaxis y se adicionó MCP-1 humano (+/- inhibidor) a la cámara inferior y las células THP-1 en medio RPMI/1% de FCS se adicionaron a la cámara superior y la placa se incubó a 37°C, durante 2.5 horas para permitir que las células se muevan desde la cámara superior en la parte inferior. El número de células que migran a la cámara inferior se cuantificó mediante la marcación con AQUEOUS ONE (30 μ L/pozo) durante 4 horas antes de leer la absorbancia a 490 nm. Se utilizó MCP-1 a una concentración final de 10 ng/mL y los inhibidores fueron pentasacárido xilano sulfatado (10 y 50 μ g/mL) y PPS (10 y 50 μ g/mL). En estos experimentos, tanto PPS como el pentasacárido xilano sulfatado fueron eficaces, pero PPS fue un mejor inhibidor (Figura 18) como en 50 μ g/mL de PPS inhibe el movimiento celular por 89%, mientras que a la misma concentración el movimiento celular pentasacárido xilano sulfatado por 53%.

Se utilizaron células U937 tratadas con DMSO para examinar la migración celular en respuesta a MIP-1 α . Las células U937 son una línea celular humana promonocítica derivada originalmente de la efusión pleural de un paciente con linfoma histiocítico. Estas células fueron tratadas con DMSO (1.2%) durante 4 días antes de ser utilizados en experimentos de quimiotaxis. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas de 96 pozos Costar chemotaxis y se adicionó MIP-1 α humano (+/- inhibidor) a la cámara inferior y las células U937 tratadas con DMSO en RPMI/HEPES se adicionaron a la cámara superior y la placa se incubó a 37°C durante 3 horas para permitir que las células se muevan desde la cámara superior en la parte inferior. El número de células que migran a la cámara inferior se cuantificó mediante la marcación con AQUEOUS ONE (30 μ L/pozo) durante 1 hora antes de leer la absorbancia a 490 nm. MIP-1 α se utilizó a una concentración final de 40 ng/mL y los inhibidores fueron el pentasacárido xilano sulfatado (10 y 50 μ g/mL) y PPS (10 y 50 μ g/mL). Está claro a partir de estos experimentos que tanto el PPS como el pentasacárido xilano sulfatado inhiben el movimiento de células estimuladas MIP-1 α . PPS fue más eficaz siendo un buen inhibidor tanto en 10 y 50 μ g/mL, inhibiendo el movimiento celular por respectivamente 48% y 69%; donde como el pentasacárido xilano sulfatado sólo fue eficaz a 50 μ g/mL, inhibiendo el movimiento celular en un 44% (Figura 19).

Estos datos indican que PPS inhibe el movimiento celular inducido por tres quimiocinas clave IL-8, MPC-1 y MIP 1 α conocidas para jugar un papel en las inflamaciones asociadas con la COPD.

Los expertos en el arte apreciarán que la invención descrita en este documento se define por las reivindicaciones, y se revela por la memoria descriptiva. La divulgación también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualesquiera dos o más de dichas etapas o características.

45 Bibliografía

- Adcock and Ito, Proc. Am. Thorac. Soc. 2:313-319, 2005
- Allen, Adv Pediatr. 53:101-110, 2006
- Anzueto, Am. J. Med. 119:S46-S53, 2006
- Barnes, Pharmacol. Rev. 56:515-548, 2004
- 50 Barnes, Br. J. Pharmacol. 147 Suppl 1:S297-303, 2006
- Barnes and Stockley, Eur. Respir. J. 25:1084-1106, 2005

- Bayol et al, US Patent 4,713,373
- Blaiss, Allergy Asthma Proc. 26: 35-40, 2005
- Borish, J. Allergy Clin Immunol. 112: 1021-1031, 2003
- Casu, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 43: 51-134, 1985
- 5 Casu, Ann. N.Y. Acad. Sci. 556: 1-17, 1989
- Coombe et al, Journal of Immunological Methods 215: 145-150, 1998
- Degenhardt et al, Arch Pharm (Weinheim) 334(1):27-9, 2001
- Elmiron".Pentosan Polysulfate Sodium. Product Monograph.Janssen-Ortho Inc January 2006
- Fernig, In: Proteoglycan protocols, Ed. R.V. Iozzo, Humana Press, Totowa, NJ, USA, p. 505-518, 2001
- 10 Gelfand, J. Allergy Clin. Immunol 114: S135-138, 2004
- Golightly and Greos. Drugs 65:341-384 2005
- Green et al, Curr. Opin. Allergy Immunol. 7:43-50, 2007
- Halpin and Miravittles. Proc. Am. Thorac. Soc. 3:619-623, 2006
- Kuzmann et al, Patent WO 2006017752
- 15 Lander and Selleck, J. Cell Biol. 148(2): 227-232, 2000
- Lee et al, Respir. Res. 8:64-73, 2007
- MacNee, Proc. Am. Thorac. Soc. 2:258-266, 2005
- Neilsen and Dahl, Am. J. Respir. Med. 2:55-65, 2003
- Palmqvist et al., Allergy 60:65. 2005
- 20 Parish et al, US Patent 6,143,730
- Passalacqua et al, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 4:177-183. 2004
- Pawanker, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 4:1-4. 2004
- Sasisekharan and Venkataraman, Curr. Opin. Chem. Biol. 4(6): 626-631, 2000
- Skoner, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2:7-10. 2002.
- 25 Suchankova et al, Eur J Pharmacol. 507(1-3):261-71, 2005
- Sutherland and Martin, JAllergy Clin. Immunol. 112:819-27. 2003
- Szilasi et al, Pathol. Oncol. Res. 12:52-60. 2006
- Tyner et al, J. Clin. Invest. 116:309-321, 2006
- Venkataraman et al, Science 286(5439):537-542, 1999
- 30 Walls et al, Med. J. Aust. 182:28-33, 2005
- Wenzel, Lancet 368:804-813, 2006
- Wills-Karp, Immunol. Rev. 202:175-190, 2004

Yanez and Rodrigo, Ann. Allergy Asthma Immunol. 89:479-84. 2002

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un xilano sulfatado, en donde el xilano sulfatado es polisulfato de pentosano (PPS), para uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección respiratoria inflamatoria seleccionada de la lista que consiste en asma, rinitis alérgica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en un sujeto.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un humano.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, que comprende además un agente antiinflamatorio.
- 10 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde el agente antiinflamatorio es una antihistamina, un antagonista de G-CSF, M-CSF y/o GM-CSF, un antagonista de IL-5, IL-4 o IL-13, un antagonista de eotaxina-1 o eotaxina-2 o un antagonista de IL-8, MCP-1 o MIP-1 α .
5. Uso de un xilano sulfatado, en donde el xilano sulfatado es PPS, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad respiratoria inflamatoria seleccionada de la lista que consiste en asma, rinitis alérgica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en un sujeto.
6. Uso de una cualquiera de la reivindicación 5, en donde el sujeto es un humano.
- 15 7. Uso de la reivindicación 6, que comprende además el uso de un agente antiinflamatorio.
8. Uso de la reivindicación 7, en donde el agente antiinflamatorio es una antihistamina, un antagonista de G-CSF, M-CSF y/o GM-CSF, un antagonista de IL-4 o IL-5 o IL-13, un antagonista de eotaxina-1 o eotaxina-2 o un antagonista de IL-8, MCP-1 o MIP-1 α .
- 20 9. Composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de PPS y un agente antiinflamatorio seleccionado de la lista que consiste en un antagonista de G-CSF, MCSF, GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina-1, eotaxina-2, MCP-1 y MIP-1 α para uso en el tratamiento de un sujeto con asma, rinitis alérgica o COPD.

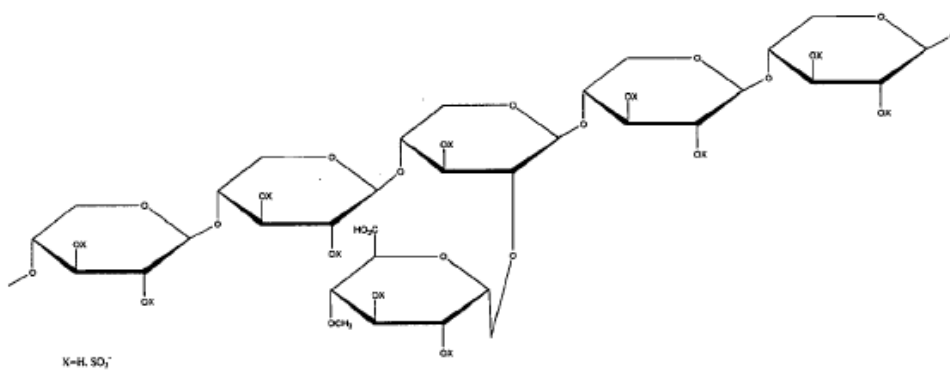


Figura 1

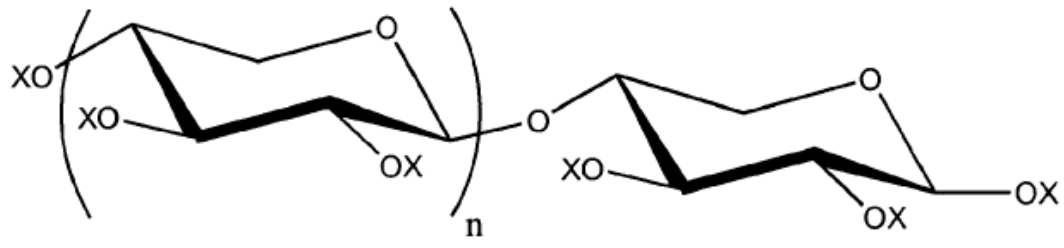


Figura 2

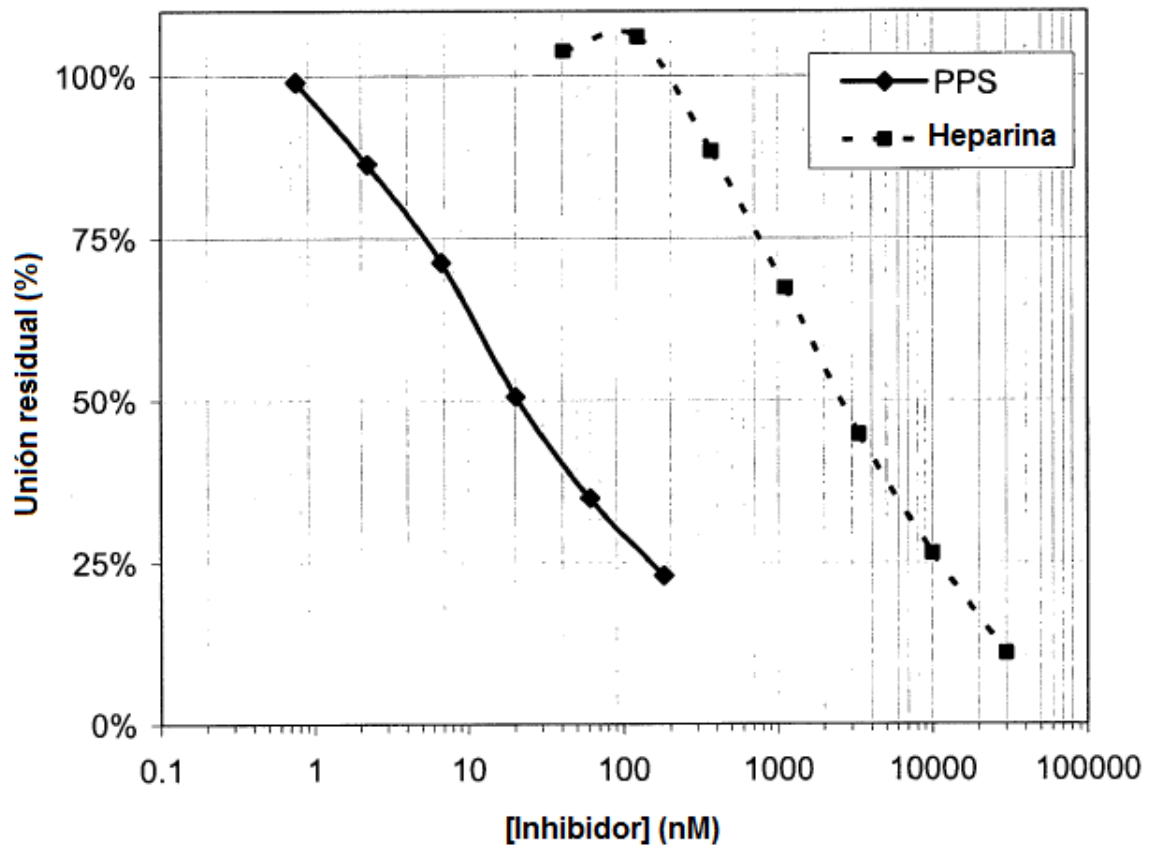


Figura 3A

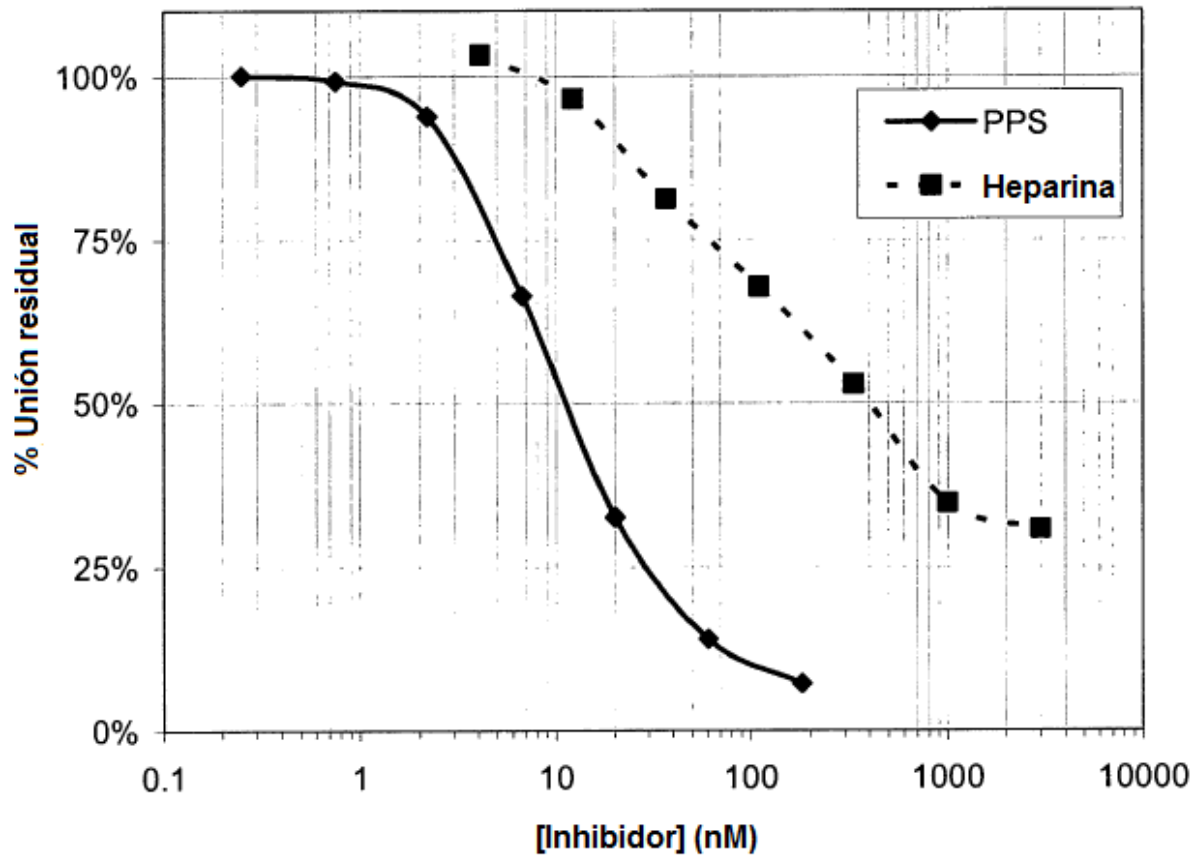


Figura 3B

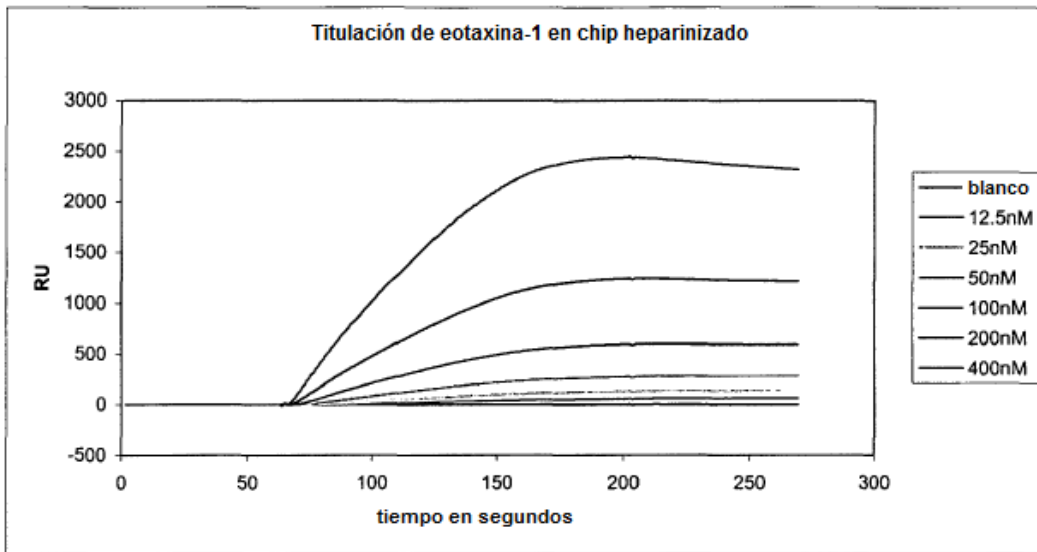


Figura 3C

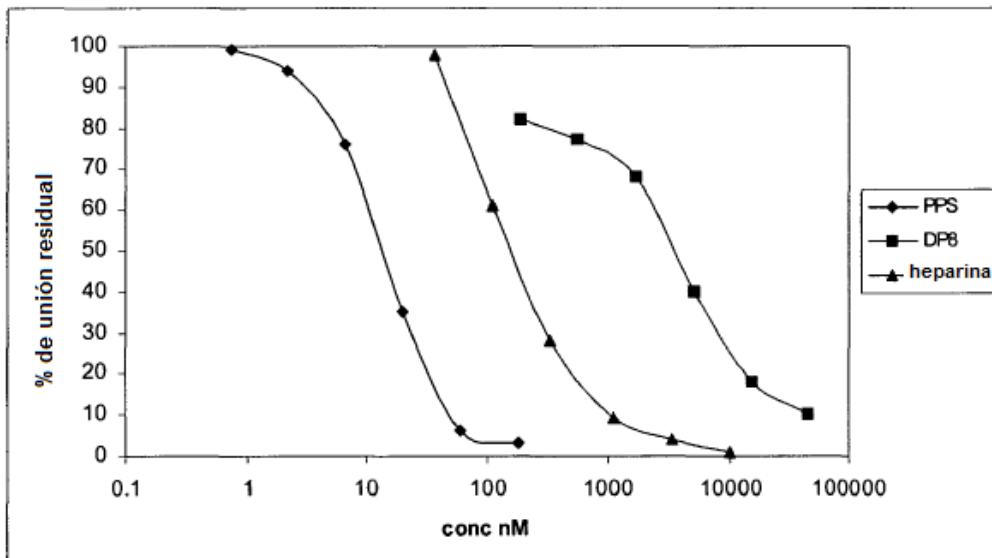


Figura 3D

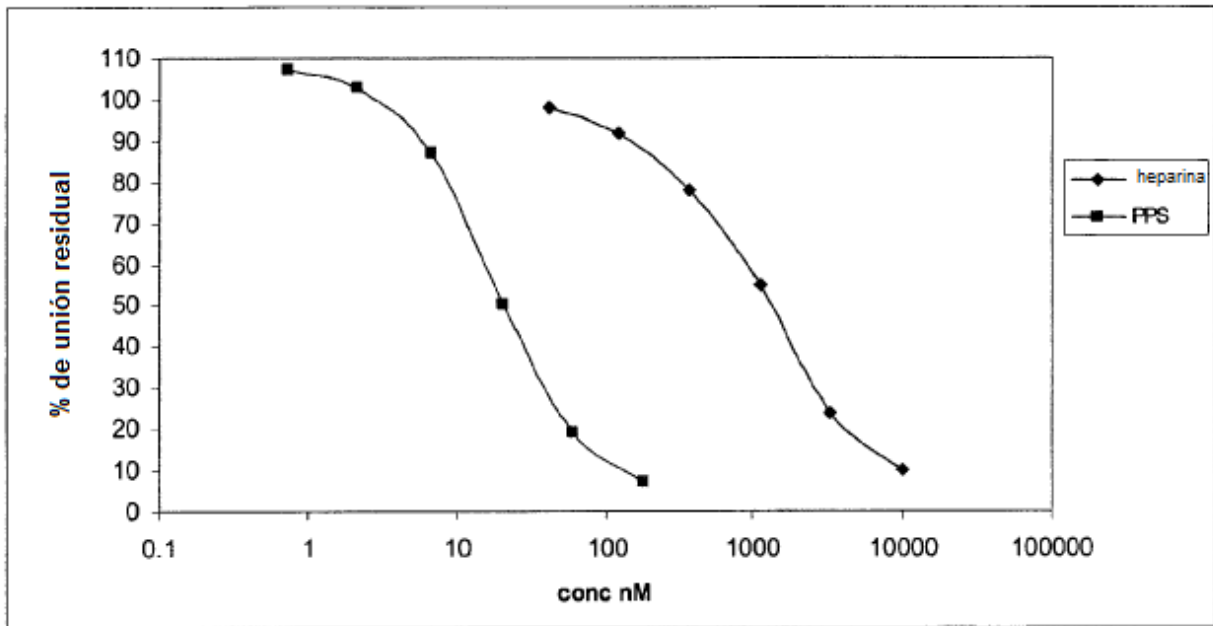


Figura 3E

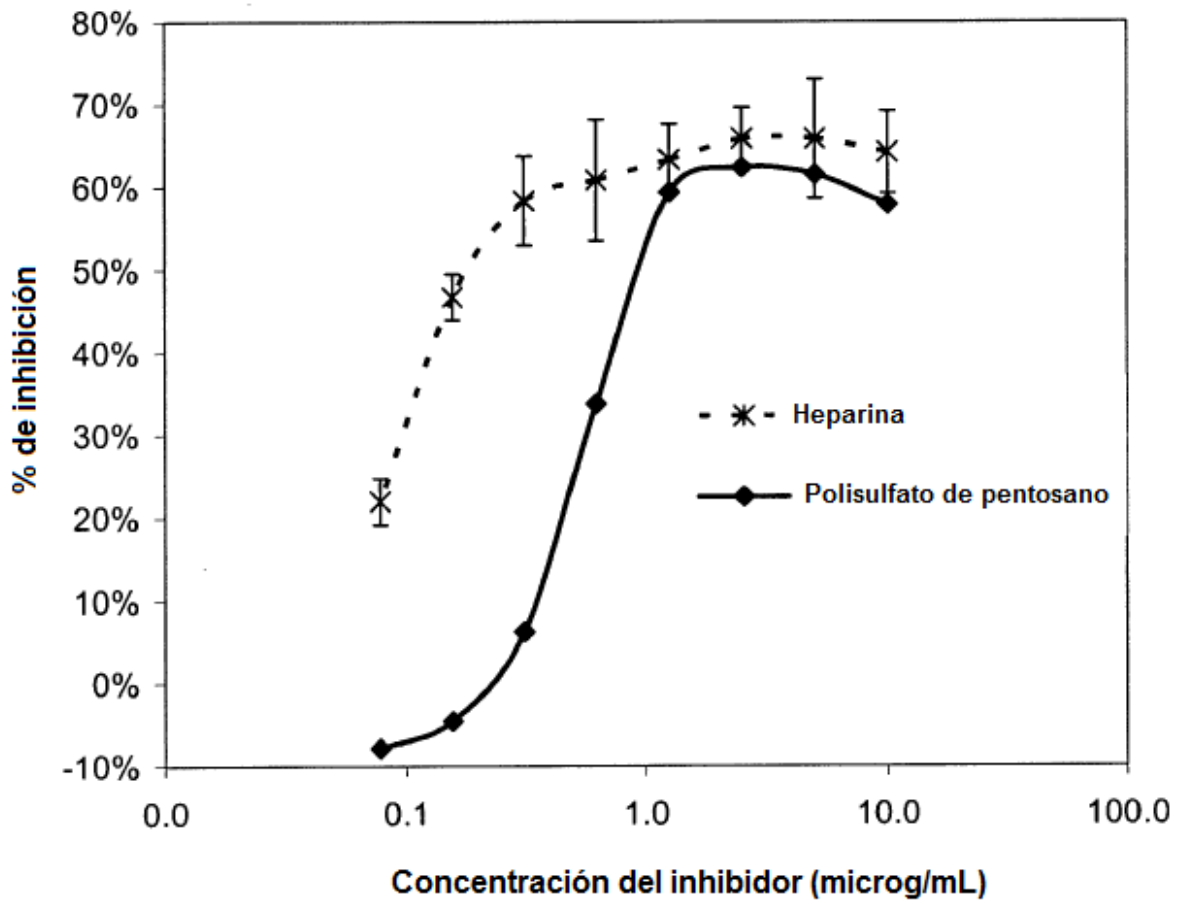


Figura 4

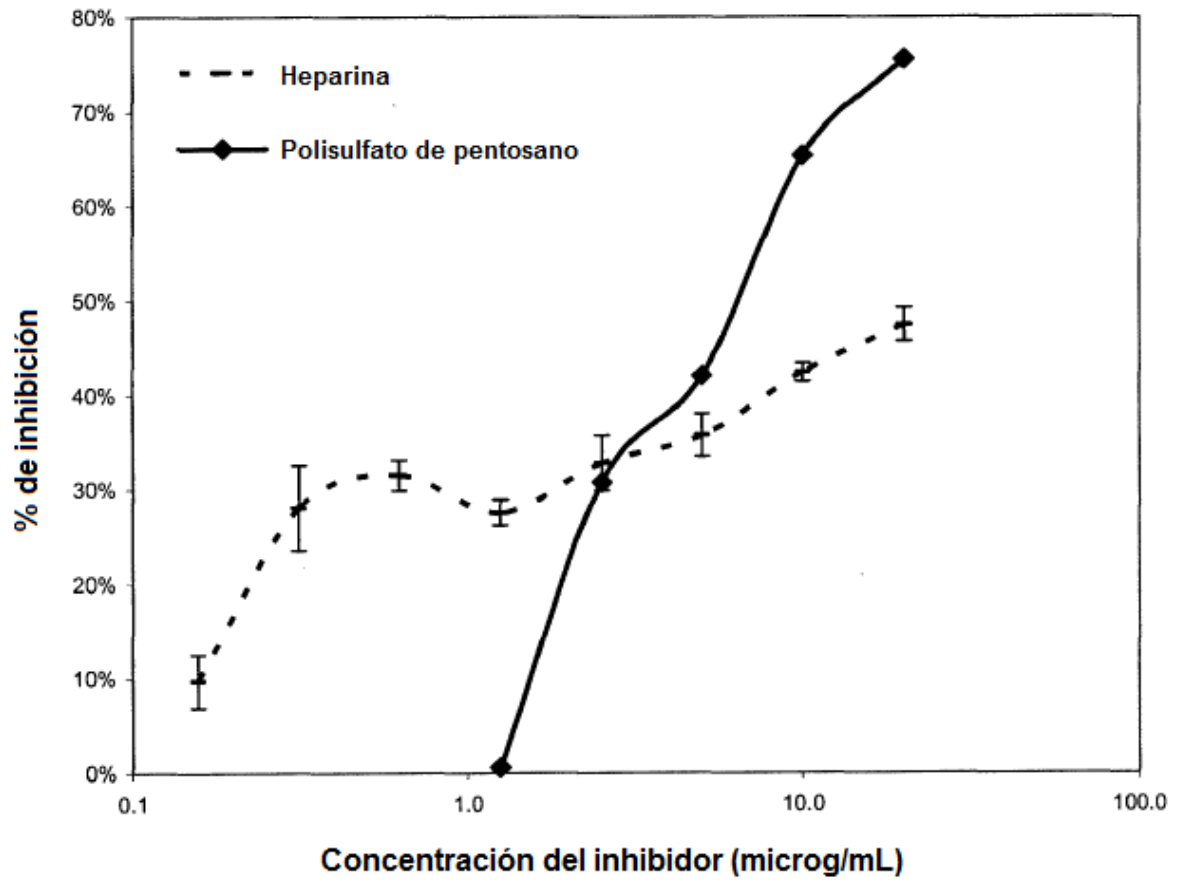


Figura 5

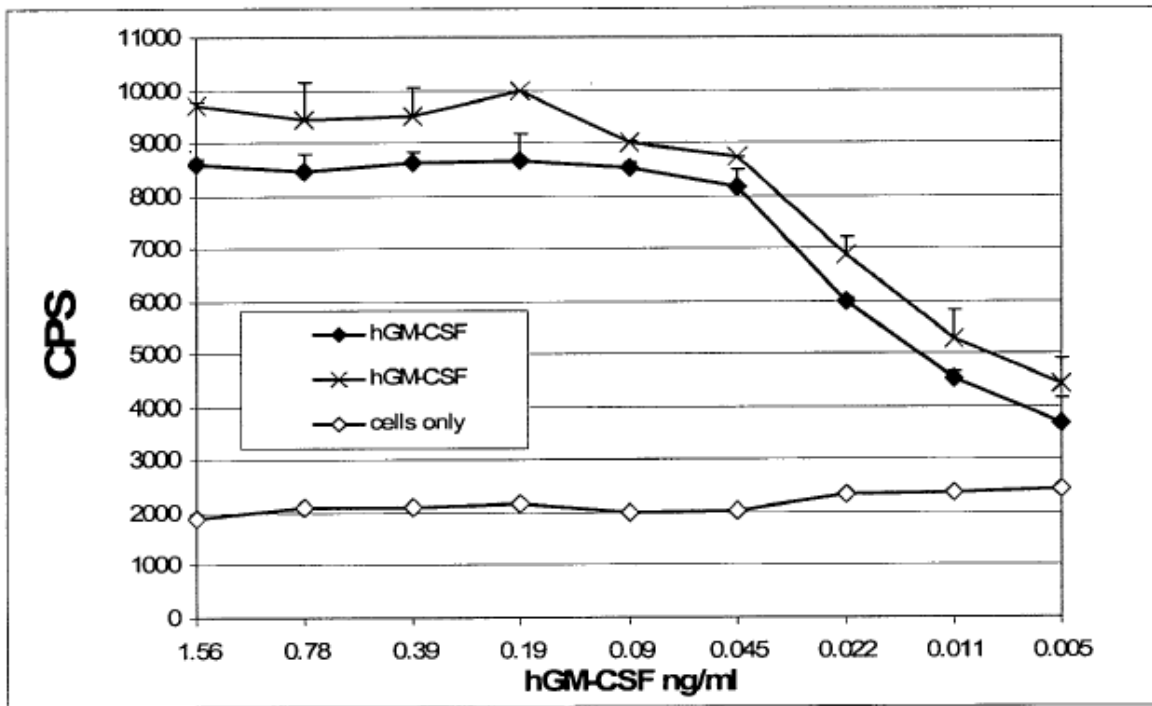


Figura 6

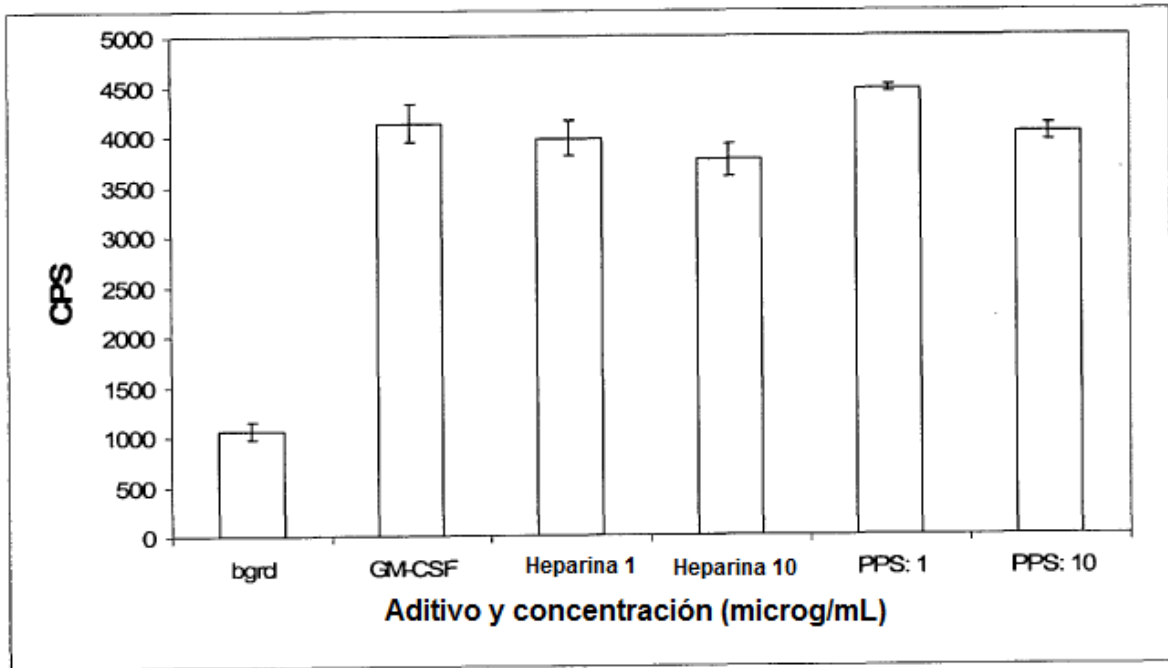


Figura 7

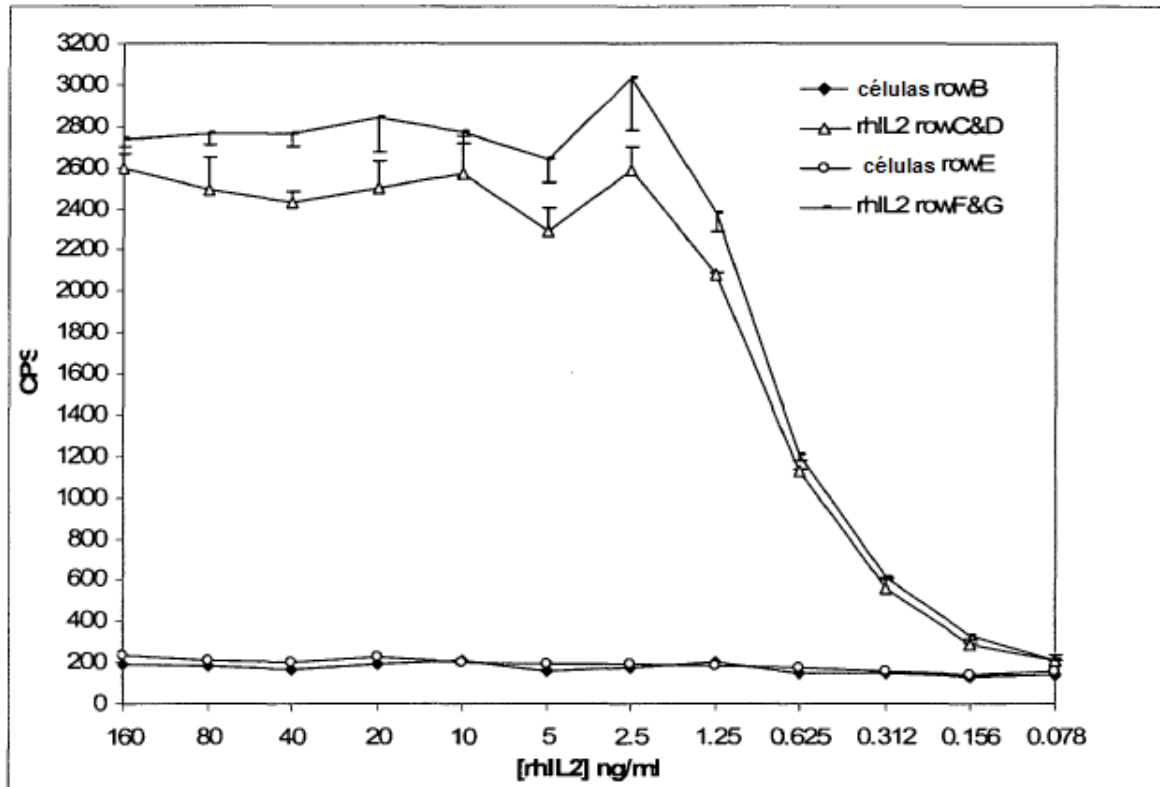


Figura 8

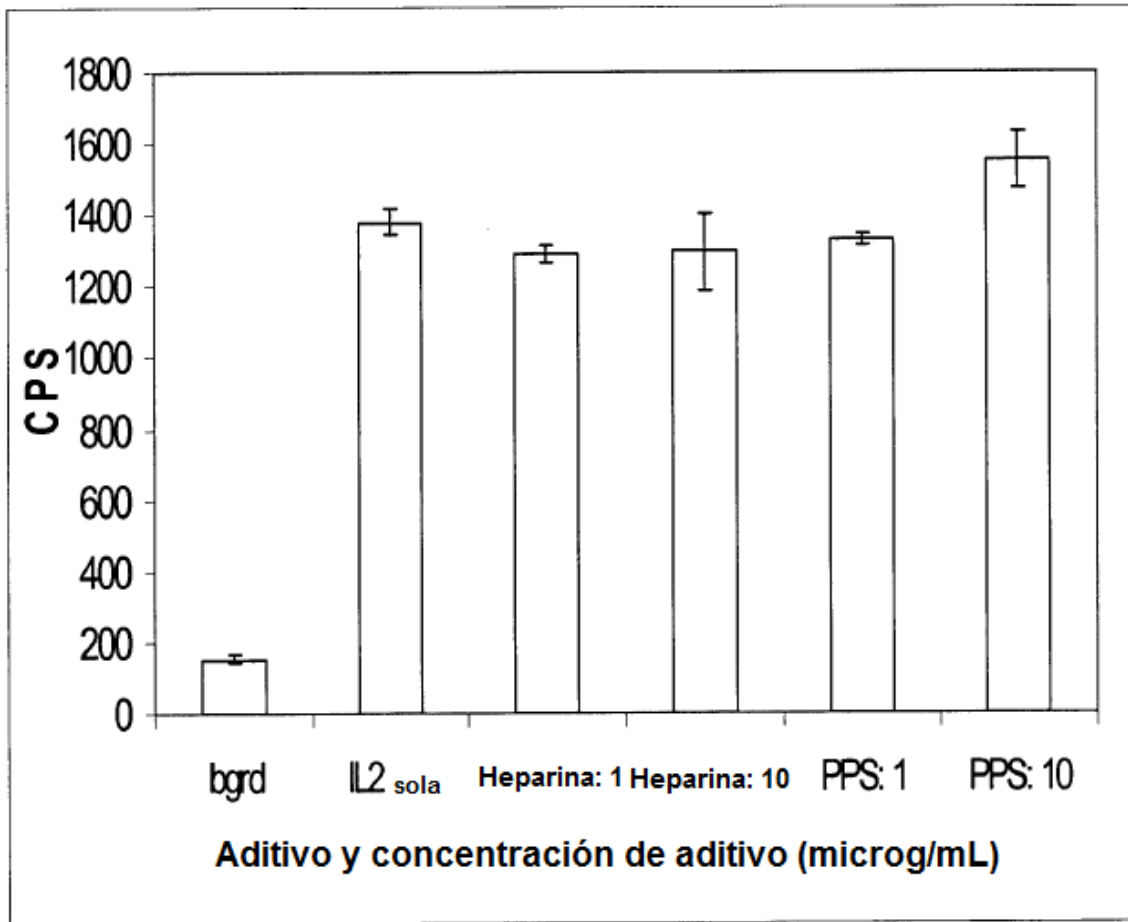


Figura 9

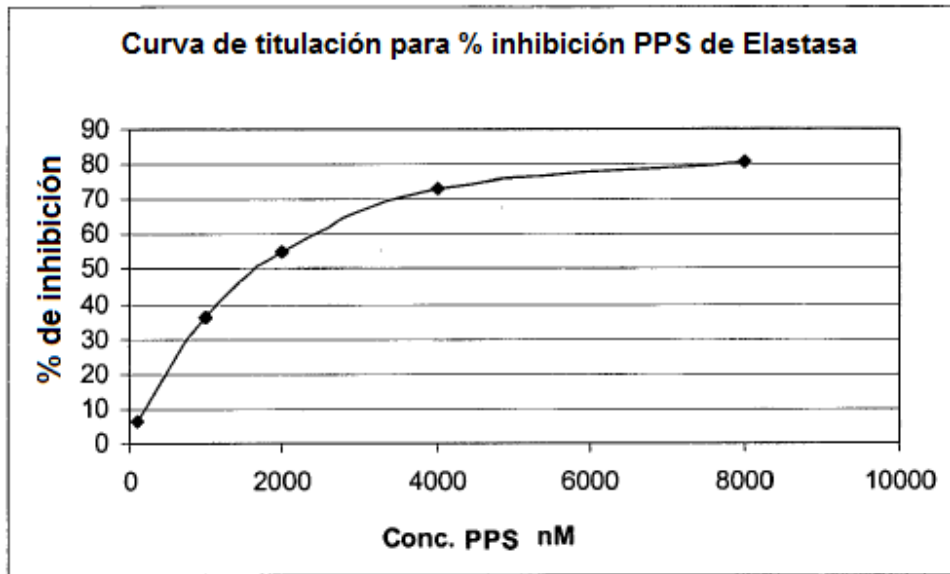


Figura 10A

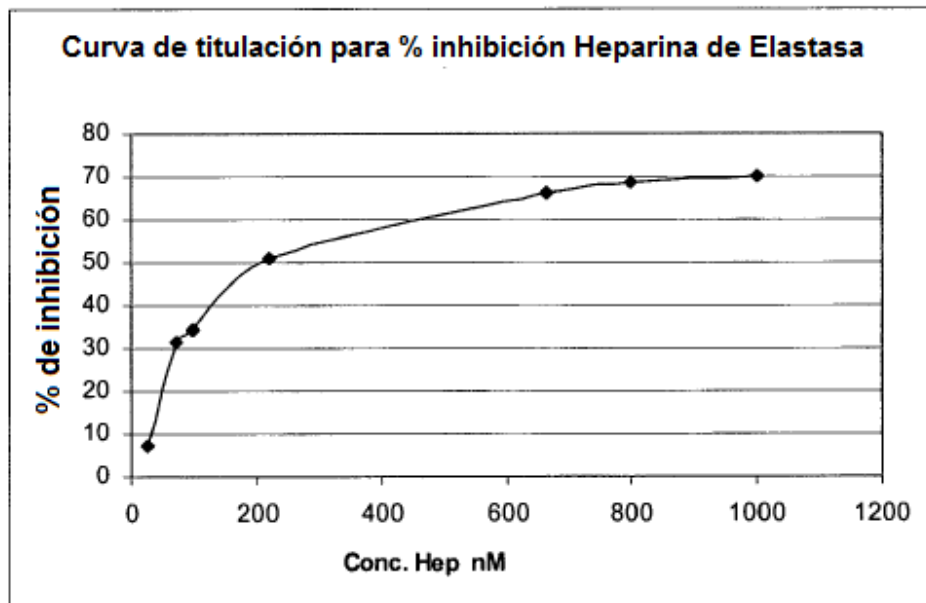


Figura 10B

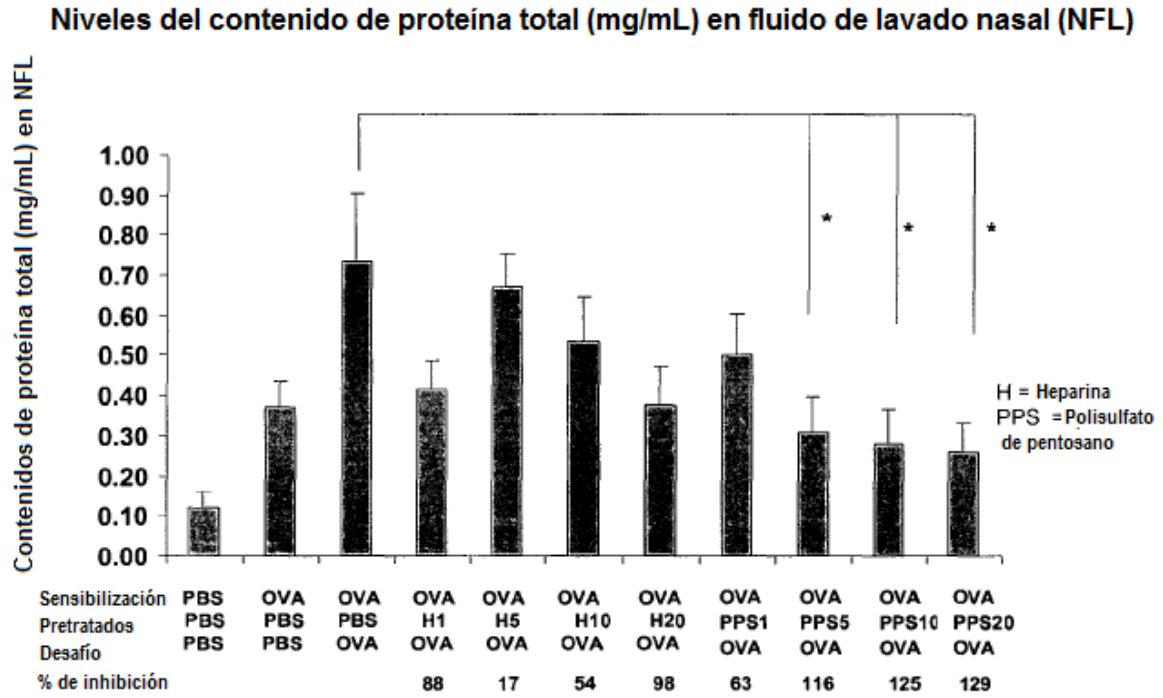


Figura 11

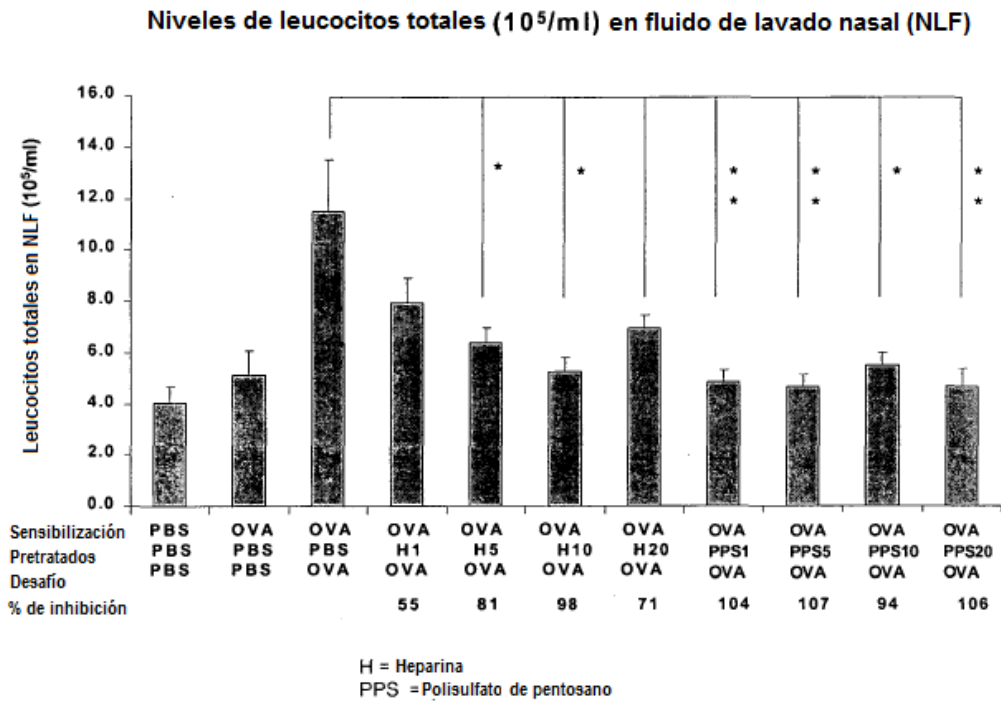


Figura 12

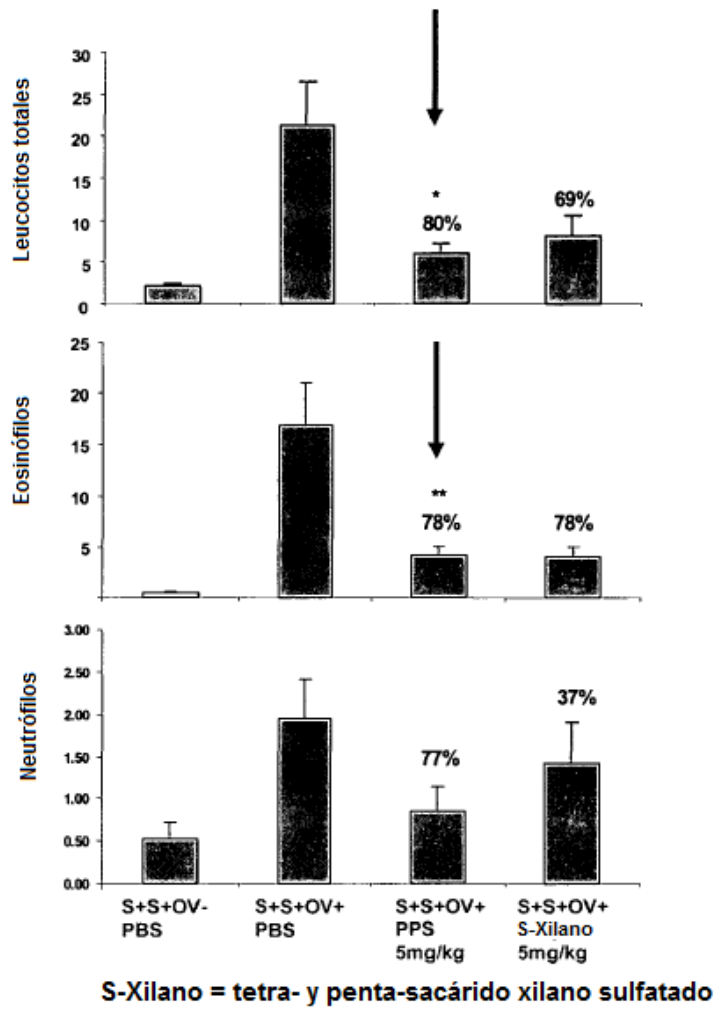


Figura 13

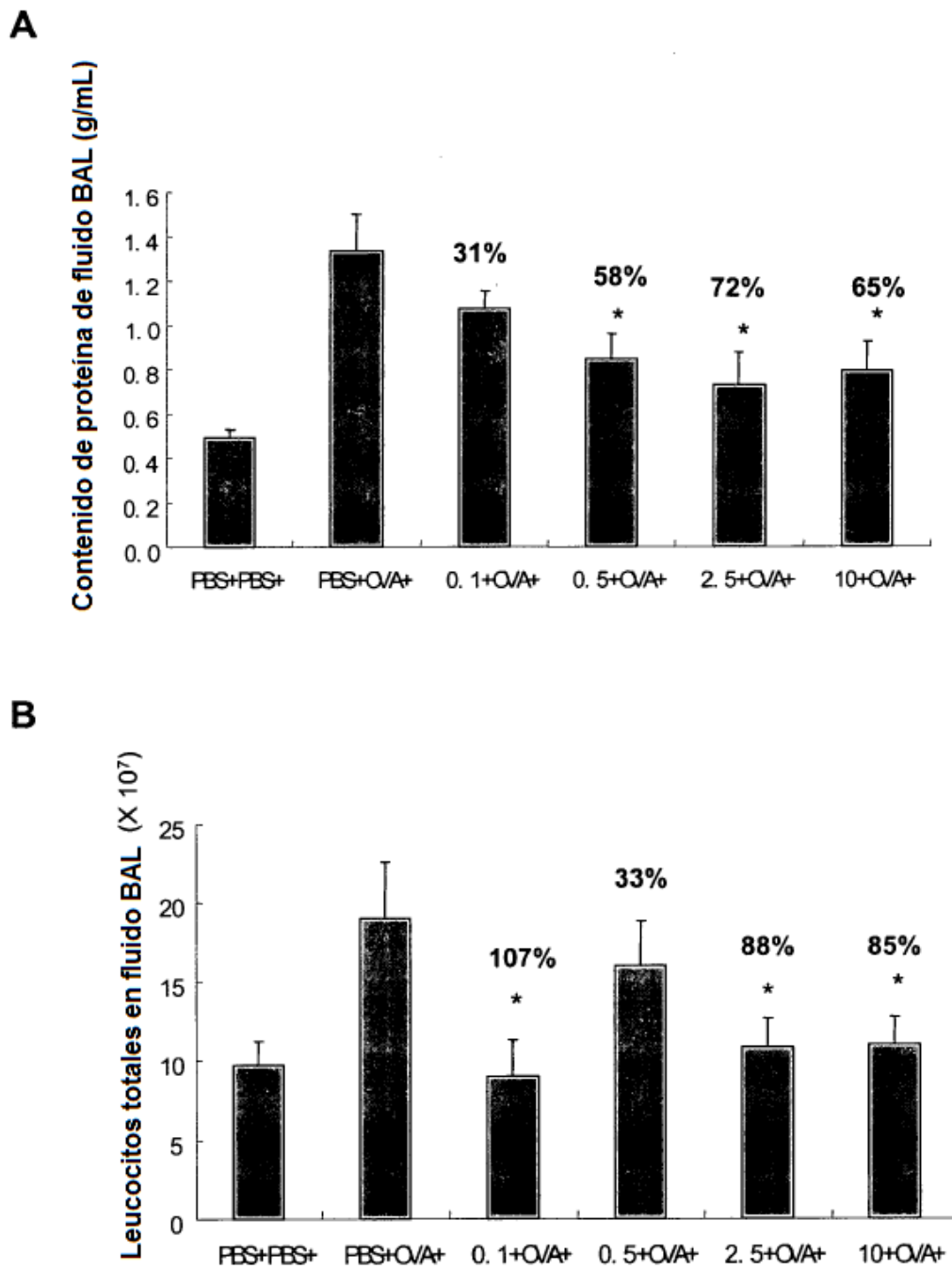
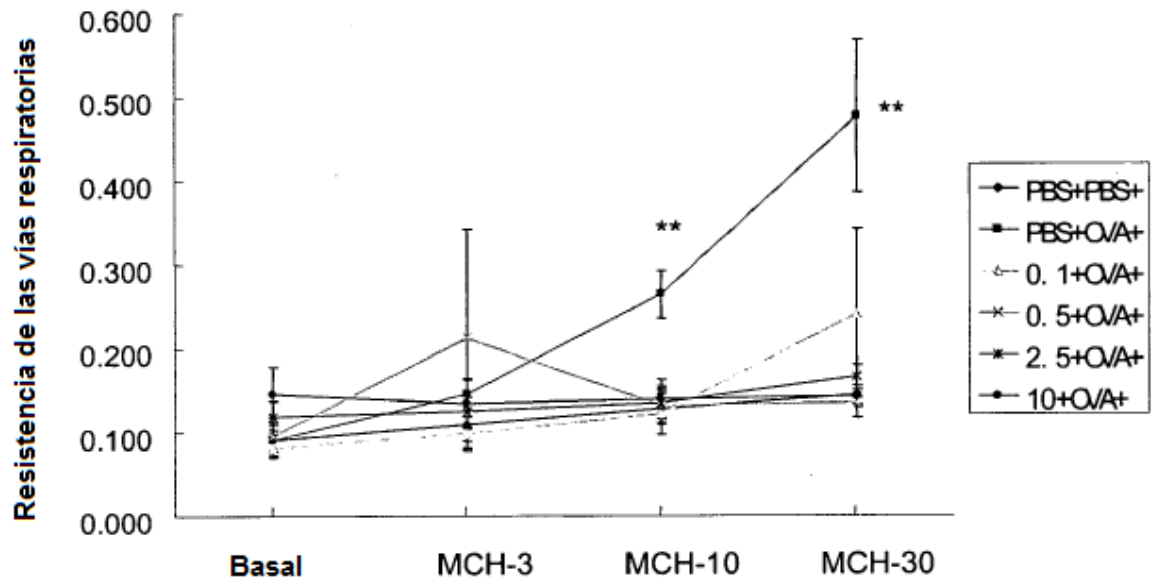


Figura 14

A



B

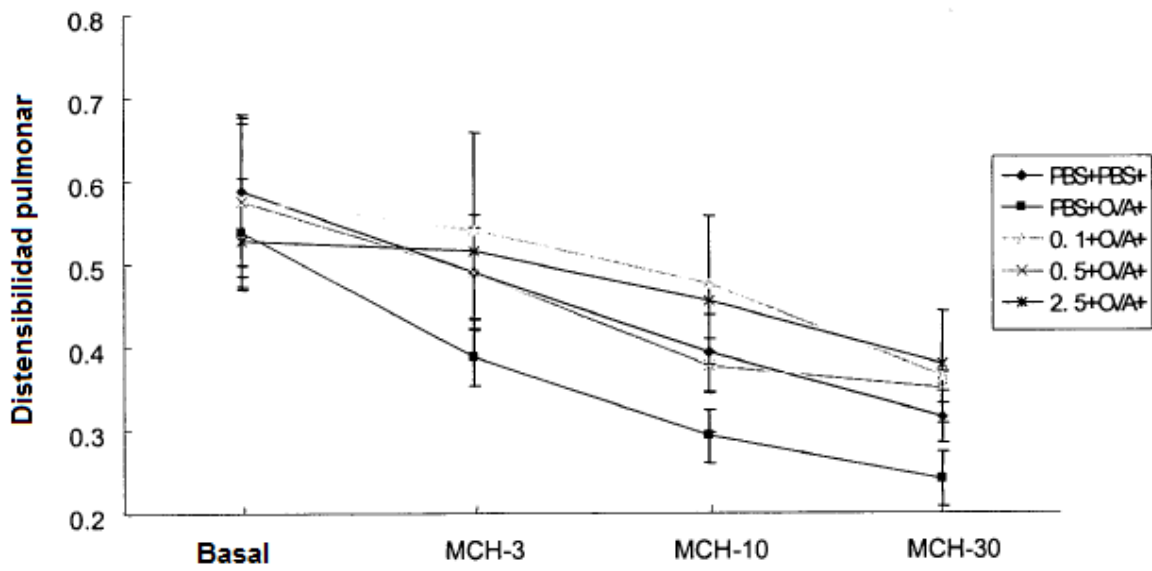


Figura 15

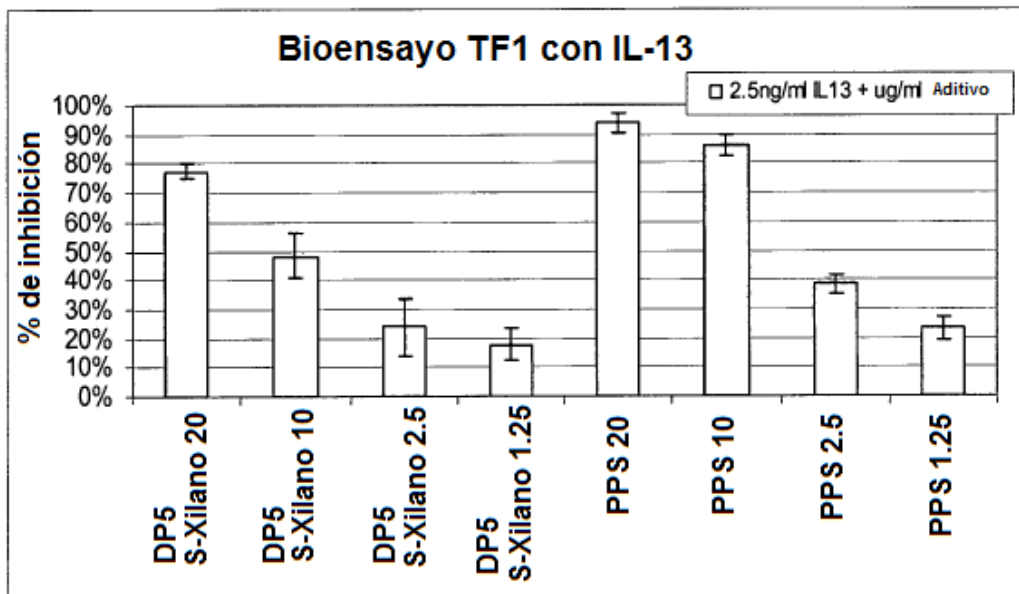


Figura 16

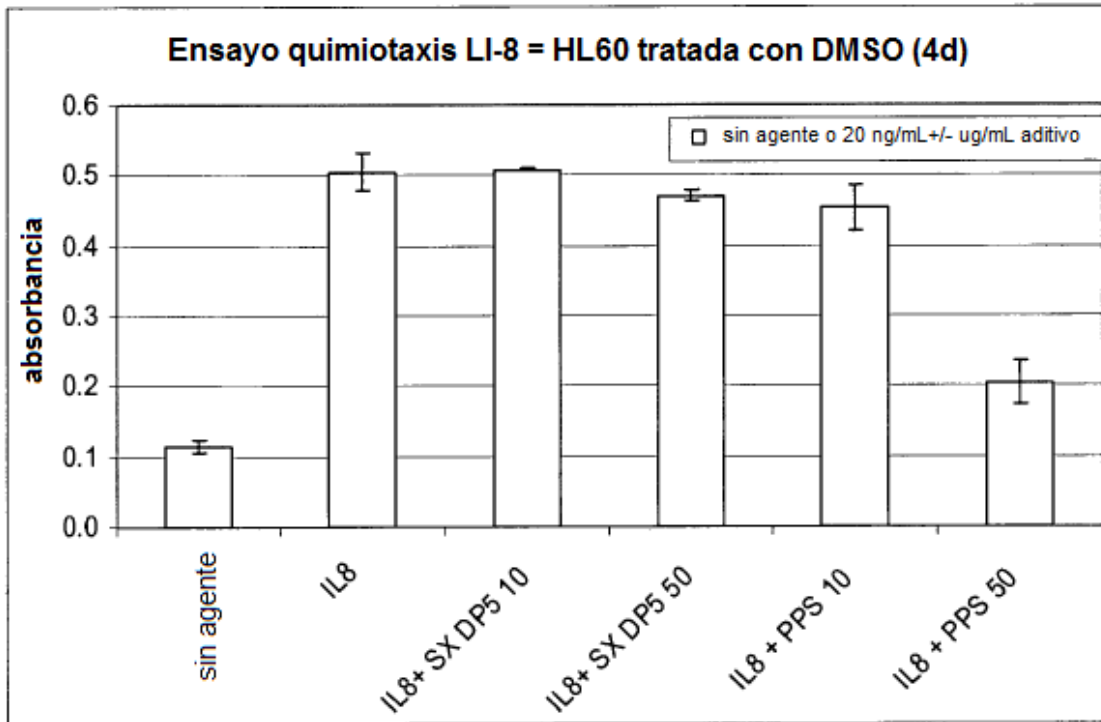


Figura 17

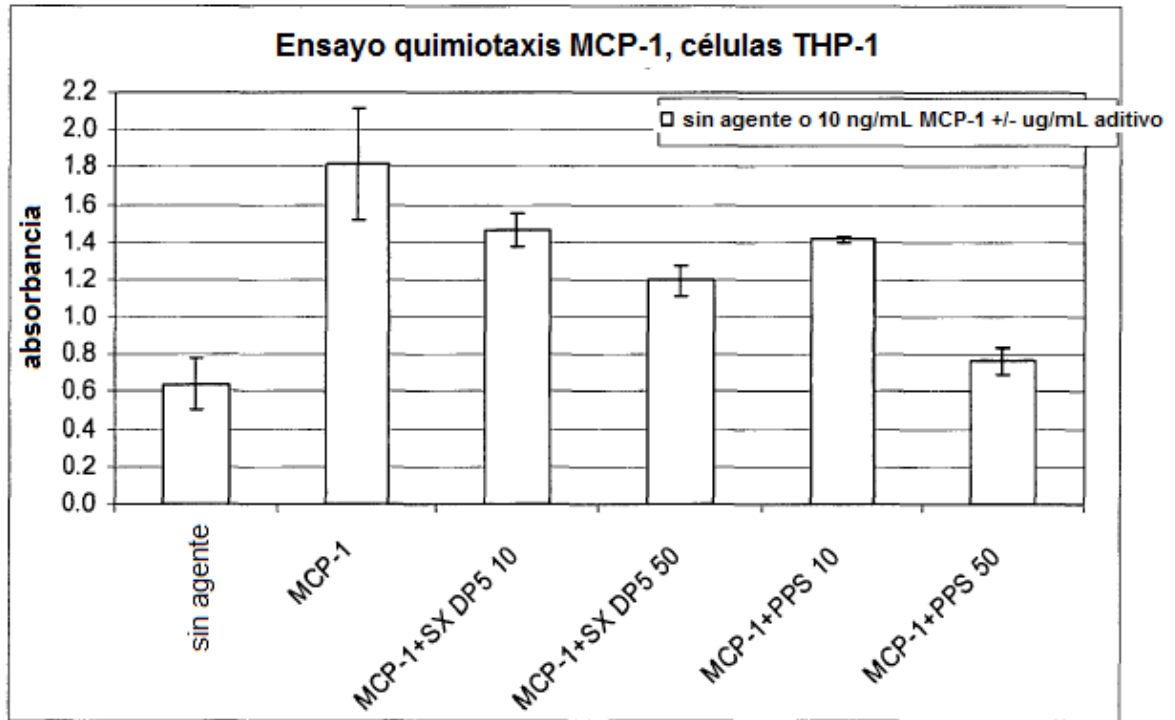


Figura 18

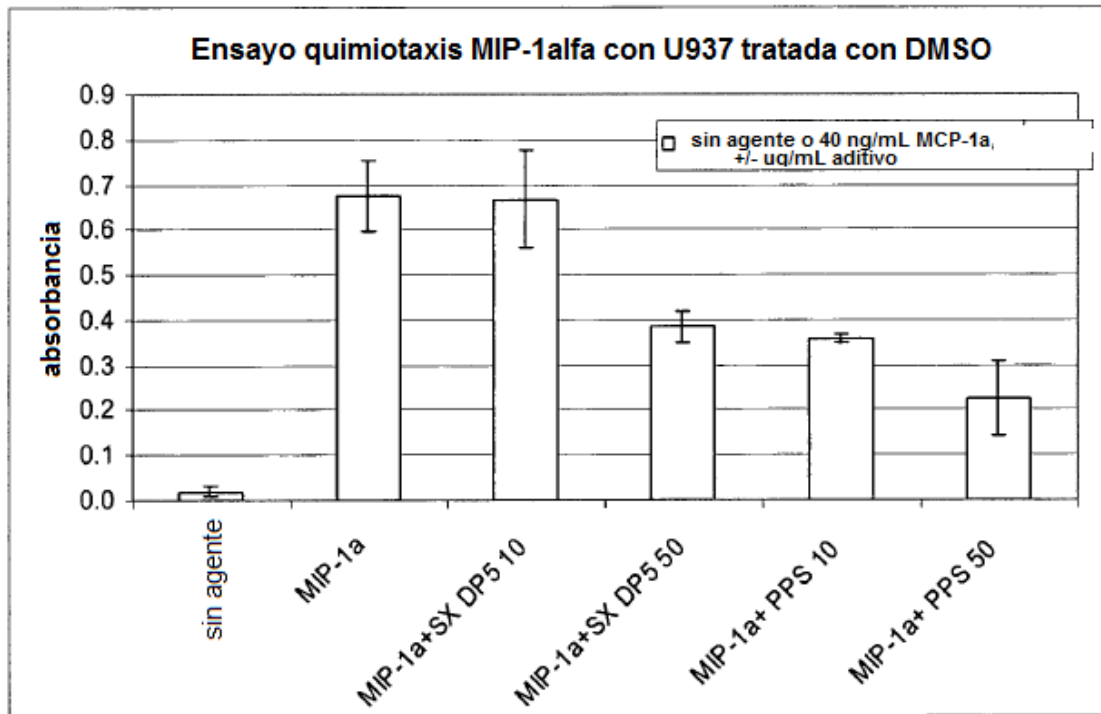


Figura 19