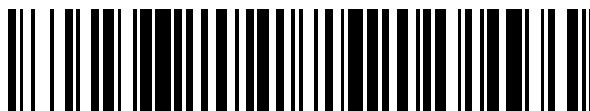


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 052**

51 Int. Cl.:

C07H 15/26 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2012** **PCT/FI2012/050650**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012** **WO12175813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2012** **E 12745500 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2723754**

54 Título: **Oligosacáridos de manosa con conexiones [beta]-1-2 multivalentes como compuestos inmunoestimuladores y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.06.2011 US 201161499229 P

21.06.2011 FI 20115631

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

07.08.2017

73 Titular/es:

TURUN YLIOPISTO (50.0%)

Yliopistonmäki

20014 Turun Yliopisto, FI y

ABO AKADEMI UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

SAVOLAINEN, JOHANNES;

RANTA, KAARINA;

LEINO, REKO y

MUKHERJEE, CHINMOY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 629 052 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

Oligosacáridos de manosa con conexiones [beta]-1-2 multivalentes como compuestos inmunoestimuladores y usos de los mismos

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a compuestos inmunoestimuladores, y a su uso para modular las respuestas inmunitarias mediadas por células T coadyuvantes (Th) y T reguladoras (Treg).

Antecedentes de la invención

- 10 Las alergias atópicas inmediatas de tipo I son uno de los problemas de salud más comunes en el mundo occidental y su prevalencia aumenta constantemente (ISAAC 1998). Se ha especulado que este aumento está asociado con la reducción de la carga microbiana en las sociedades desarrolladas, lo que ha debilitado las respuestas de las células T reguladoras (Treg) y Th de tipo 1 (Th1) naturales, dando paso a respuestas Th2 intensificadas que caracterizan las enfermedades atópicas.

- 15 Las células T CD4+ (Treg, Th1 y Th2) son los principales reguladores de la respuesta inmunitaria alérgica. Las células Th2 que secretan citoquinas tales como IL-4, IL-5 e IL-13 son importantes para el desarrollo de la inflamación alérgica al inducir la producción de IgE por las células B, la desgranulación de los mastocitos y el reclutamiento de eosinófilos. Las células T reguladoras y su citoquina IL-10 también tienen un papel importante en la regulación a la baja de las respuestas de tipo Th2 frente a los alérgenos. Las células Th1 son esenciales para la defensa contra los microbios, en particular los patógenos intracelulares, y el cáncer mediante la inducción de la activación de las células T citotóxicas (Tc) y las células asesinas naturales (NK). Además, las citoquinas de tipo Th1, incluyendo IFN- γ , IL-12 e IL-18, están implicadas en la supresión de respuestas inmunitarias de tipo Th2 inducidas por alérgenos. Por otra parte, en la vacunación alérgica, existe una regulación al alza de las citoquinas IFN- γ , IL-10 e IL-18, lo que indica su papel crucial en la supresión de la inflamación alérgica también *in vivo*.

- 20 Investigaciones recientes han demostrado que el momento crucial para el desarrollo de inmunidad tipo Th1 o Th2 es la infancia. Al nacer, hay una débil inmunidad de tipo Th2, que en individuos sanos se convierte en una respuesta de tipo Th1. Se cree que el cebado del sistema inmunitario por componentes microbianos en el entorno y la microflora intestinal (endotoxinas, lactobacilos, micobacterias) es esencial en esta conversión.

- 25 Se han realizado investigaciones sobre los efectos de los componentes microbianos sobre el equilibrio Th1-Th2. Se ha dedicado mucho esfuerzo a la búsqueda de moléculas microbianas, que podrían utilizarse en el desarrollo de vacunas más eficaces y seguras para la inmunización contra las infecciones y en nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, atópicas y malignas. Entre estas moléculas están el monofosforil lípido A 3-desacilado (MPL), el derivado no tóxico del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* (LPS), y secuencias de ADN bacteriano inmunoestimuladoras (CpG-ODN) que generalmente consisten en un di-nucleótido CG no metilado central. Estas moléculas se han sometido a ensayo clínicamente y se ha demostrado que son coadyuvantes eficaces y bien tolerados en una serie de vacunas para la inmunización contra y el tratamiento del virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la gripe A, y *Plasmodium falciparum*, así como en el tratamiento de cánceres como el linfoma no Hodgkiniano y el melanoma. Se ha demostrado que estas moléculas funcionan induciendo un patrón de tipo Th1 fuerte de producción de citoquinas que actúan sobre diversos receptores de tipo Toll en células presentadoras de antígeno tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Por otra parte, en varios estudios se han demostrado los efectos potenciadores de Th1 de micobacterias y lipopolisacáridos bacterianos con la subsiguiente supresión de la respuesta de tipo Th2, inflamación alérgica, respuestas de IgE e hiperreactividad bronquial. Adicionalmente, se ha demostrado que los lactobacilos probióticos reducen la prevalencia del eccema atópico a la edad de dos años cuando se administran oralmente durante el embarazo e inmediatamente después del nacimiento. También se ha demostrado que la inmunoterapia con oligonucleótidos CpG-ODN bacterianos unidos covalentemente a alérgenos disminuye la respuesta inflamatoria nasal en pacientes con rinitis alérgica. El MPL se ha sometido a ensayo con éxito como un coadyuvante en la inmunoterapia alérgica.

- 30 El uso terapéutico de estos compuestos microbianos se enfrenta con ciertos problemas. El LPS es una toxina y como tal no apta para uso terapéutico. CpG-ODN es un gen y, además de ser costoso para la síntesis a gran escala, implica problemas potenciales con la opinión pública (tales como productos alimenticios manipulados genéticamente). El coadyuvante MPL no es una sola entidad química, sino una mezcla de análogos, con diferencias reflejadas en el número y la longitud de las cadenas de ácidos grasos. Los lactobacilos probióticos son bacterias vivas, que comprenden problemas de seguridad con respecto a posibles infecciones, y además son difíciles de normalizar. También los productos lisados micobacterianos son mezclas brutas de componentes bacterianos fuera del intervalo de normalización biológica. Un componente terapéutico ideal para el tratamiento de la alergia sería una molécula natural, no tóxica, segura purificada con el menor tamaño molecular posible.

55 En el documento WO 02/09728 se presentan carbohidratos complejos para la prevención y el tratamiento de una variedad de más de 80 enfermedades. En esta publicación, los carbohidratos se definen como cualquier polímero que comprende más de dos radicales azúcar e incluyen clases de compuestos tales como polisacáridos (que

incluyen mucopolisacáridos y mananos) y oligosacáridos [que están compuestos por oligosacáridos ramificados tales como azúcares sialilados incluyendo azúcares de la leche; siendo los azúcares clave de la leche (también llamados hexaosas) incorporados en la clase general de carbohidratos complejos que son difucosilacto-N-hexaosa a y b, disialil-monofucosilacto-N-hexaosa y monofucosilacto-N-hexaosa I, II y III]. Las enfermedades enumeradas incluyen afecciones asociadas con alergias; mencionadas individualmente son anafilaxis, asma y picazón asociada con alergias e hipersensibilidad y se basan, p. ej. en la inhibición de la adherencia de los glóbulos blancos.

El documento US 2002/0054886 describe una vacuna, que comprende residuos de oligo-manosilo de cadena lineal con conexiones β -1,2 para el tratamiento de la candidiasis. Los residuos de oligo-manosilo se utilizan como epítipo para provocar una respuesta de anticuerpos protectores contra la candidiasis o para prevenir la adherencia de *Candida albicans* a células de mamífero. El efecto se basa en el uso de una sustancia sintética que imita compuestos microbianos, administrada para inducir una respuesta inmunitaria específica contra la sustancia.

El documento WO2006/096970 A1 describe otra aplicación para el tratamiento de la candidiasis. En él se proporcionan productos conjugados que comprenden oligosacáridos conectados a O y conectados a S nativos, más específicamente residuos de oligo-manosilo de cadena lineal con conexiones β -1,2, acoplados a un portador de proteína a través de un conector. Dicho producto conjugado comprende siempre una proteína. Es esencial que dicho portador de proteína provoque una respuesta inmunitaria dependiente del timo. También se presenta la estrategia de síntesis para conectar dichos radicales. Se sugiere que el producto conjugado formado por oligosacáridos y portador de proteína anclado covalentemente por un conector, sea utilizable para inducir una respuesta inmunitaria a una especie de *Candida* en un sujeto que lo necesite.

El documento WO2007/010084 describe polisacáridos de manano inmunoestimuladores que comprenden cadenas con conexiones β -1,2 y β -1,2-(D)-manooligosacáridos, y sus usos para modular las respuestas inmunitarias mediadas por células T coadyuvantes (Th). Sin embargo, la actividad de las cadenas de manooligosacáridos con conexiones β -1,2 simples sintetizadas que consisten en hasta cuatro oligosacáridos era inferior en comparación con las mezclas brutas de oligosacáridos naturales. Por lo tanto, se necesitaban nuevas modificaciones de estas cadenas de oligosacáridos sintéticos.

Objeto y resumen de la invención

En el esfuerzo de investigación en curso de los autores de la presente invención, se ha descubierto que los compuestos de manooligosacáridos con conexiones β -1-2 oligo- o multivalentes sintéticos tienen excelentes propiedades para la modulación de respuestas inmunitarias mediadas por células T coadyuvantes (Th) y T reguladoras (Treg).

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto inmunoestimulador y una composición para modular las respuestas inmunitarias mediadas por células T coadyuvantes (Th) y T reguladoras (Treg).

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto inmunoestimulador para su uso como medicamento. Sin embargo, otro objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto inmunoestimulador para su uso como un medicamento para el tratamiento de un mamífero, incluyendo seres humanos, que padece o es susceptible a una afección que se puede prevenir o tratar induciendo una respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1, y/o inhibiendo una de tipo Th2.

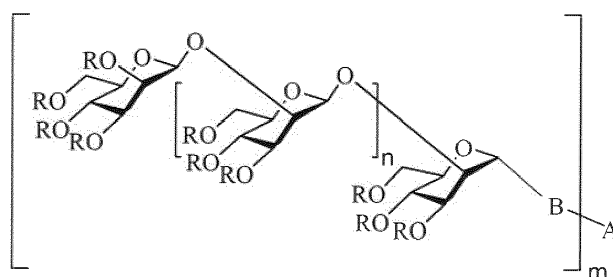
Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un compuesto inmunoestimulador para su uso como coadyuvante de una vacuna.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un compuesto inmunoestimulador para su uso como aditivo alimentario.

Para conseguir estos objetivos, la invención se caracteriza en lo que se presentará en las reivindicaciones independientes.

Algunas realizaciones preferidas de la invención se describirán en las otras reivindicaciones.

El compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la presente invención es un conjunto o matriz de carbohidratos oligo- o multivalentes en los que numerosos manooligosacáridos con conexiones β -1,2 tienen un grupo conector conectado a una unidad núcleo central o portador. Con más detalle, el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la presente invención es un manooligosacárido con conexión β -1,2 oligo- o multivalente de fórmula (I)



(I)

en donde n es de 0 a 6, m es de 3 a 5 y en donde cada R se selecciona independientemente entre acetilo (COCH_3), e hidrógeno (H), y en donde los manooligosacáridos con conexiones β -1,2 tienen un grupo conector (B) conectado a una unidad núcleo central o portador (A).

- 5 Como se ha presentado anteriormente, el último azúcar de fórmula (I) está conectado mediante alfa con el conector/portador.

Los autores de la presente invención han encontrado que los compuestos inmunoestimuladores proporcionan buenos resultados cuando se emplea un radical triazol como un grupo conector B de la molécula.

Dicho conector B se puede presentar como:



en donde X es cero o representa un grupo $-\text{CH}_2-$, o un átomo de O, S, o N, e; Y' representa un radical triazol, que está unido a X del nitrógeno 1 de dicho triazol con el grupo $-(\text{CH}_2)_p-$, en donde p es de 1 a 6, y cuya Y' está unida a Z del carbono 4 de dicho grupo triazol con el grupo $-(\text{CH}_2)_q-$ en donde q es de 1 a 6, y Z es cero o representa un átomo seleccionado entre O, S ó N. En la parte experimental, se han sintetizado los compuestos en donde X es un átomo de O, Y' es un grupo $-(\text{CH}_2)_p-$ en donde p es 2 ó 3, q es 1 y Z es cero, y se ha sometido a ensayo su actividad.

La unidad núcleo central o portador A puede ser una estructura alifática o aromática sustituida o no sustituida. Cuando se selecciona dicha unidad núcleo A entre moléculas relativamente pequeñas y simples, la estructura global y el tamaño del compuesto inmunoestimulador siguen siendo pequeños, respectivamente. Con moléculas relativamente pequeñas y simples se quiere hacer referencia aquí a una estructura alifática, aromática o cíclica, en donde la unidad núcleo A comprende hasta 20 moléculas de carbono, preferiblemente hasta 10 moléculas de carbono, más preferiblemente hasta 6 moléculas de carbono y lo más preferiblemente hasta 3 moléculas de carbono en su estructura de la cadena principal. Un experto en la técnica comprende fácilmente que el tamaño de la unidad núcleo tiene una correlación con el número de manooligosacáridos con conexiones β -1,2 anclables a los mismos a través de conectores (B). Por lo tanto, un compuesto núcleo que comprende tres moléculas de carbono puede estar conectado a través de tres conectores (B) a tres manooligosacáridos con conexiones β -1,2. Con las técnicas de conexión de acuerdo con la presente invención, se pueden conectar hasta cinco radicales manooligosacárido con conexiones β -1,2 a un anillo de glucopiranososa como se ilustra en la Figura 7b.

En una realización, los radicales manooligosacárido con conexiones β -1,2 se pueden unir/trabar por medio de conectores a silicio (Si) como portador, mostrando por lo tanto, por ejemplo, 9 ó 12 radicales carbohidrato. De acuerdo con otra realización más, la tirosina se puede utilizar como sustancia coadyuvante portadora/de depósito.

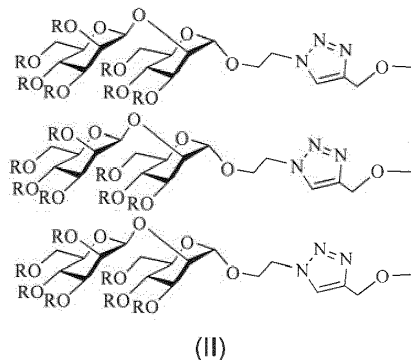
Quando se desea, se pueden seleccionar uno o más sustituyentes de dicha unidad núcleo central o portador para proporcionar funcionalidades adicionales. Uno o más carbonos pueden estar sustituidos con un grupo o sustituyente que proporciona un sitio de unión para conectar, anclar o unir dicho núcleo central o portador a otro compuesto similar o diferente, para inmovilizarlo o para modificar el mismo con otra funcionalidad u otras funcionalidades.

Un oligo- o multivalente se refiere al número de valencia de los mano-oligosacáridos con conexión β -1,2 unidos a través de los conectores B a una unidad núcleo central o portador en un compuesto de la invención. Los compuestos son ventajosamente oligovalentes, por lo tanto el número de valencia en un compuesto manooligosacárido con conexión β -1,2 es preferiblemente de 3 a 5, es decir, se prefieren los compuestos trivalentes, tetravalentes y pentavalentes. Sin embargo, si está dispuesto como un conjunto que comprende dos o más compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 inmunoestimuladores, que comprenden dos o más unidades núcleo central o portador, respectivamente, dicho conjunto puede formar una estructura multivalente.

En una realización preferida de la invención, los compuestos inmunoestimuladores de acuerdo con la invención son compuestos manooligosacárido con conexiones β -1,2 trivalentes (es decir, m es 3). Los compuestos manooligosacárido con conexiones β -1,2 trivalentes representan moléculas de carbohidrato oligovalentes en las que tres (m = 3) manooligosacáridos con conexión β -1,2 están acoplados a una unidad núcleo central o un portador a través del grupo conector (B). Cuando se acetila, el disacárido trivalente es más soluble en un entorno acuoso que

los análogos correspondientes con mayor valencia.

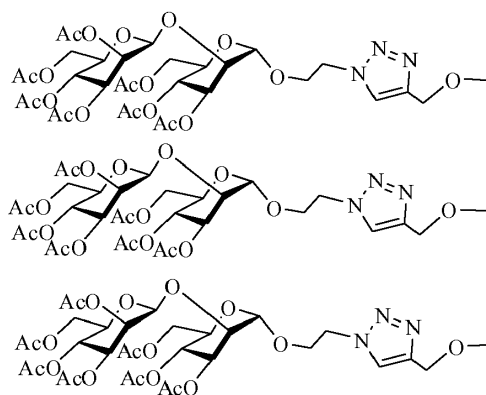
De acuerdo con una realización de la invención, el compuesto inmunoestimulador de la invención consiste en un derivado carbohidrato trivalente en el que tres manodisacáridos con conexión β -1,2 están conectados a una unidad núcleo central. Preferiblemente, el manodisacárido con conexión β -1,2 trivalente se corresponde con la fórmula (II)



en donde cada R se selecciona independientemente entre acetilo (COCH_3), hidrógeno (H), trifluoroacetilo (COCF_3) o un grupo sulfonato u otro grupo éster.

La síntesis de los compuestos inmunoestimuladores trivalentes de acuerdo con la invención se basa preferentemente en el uso del protocolo de la química click.

- De acuerdo con una realización de esta invención, todos los R en dicho compuesto representado por la fórmula I son los mismos. De acuerdo con una realización preferida, el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención está de acuerdo con la fórmula (II) y todos los R son acetilos. Por lo tanto, el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención es preferiblemente 1,2,3-tris[1-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-mano-piranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-manopiranosiloxietil)]-4-[metil-1-oxi]triazolil]propano como se muestra en la fórmula (IV):



La molécula trivalente de fórmula (IV) que incorpora un grupo conector que comprende un radical triazol y un derivado de propano como unidad núcleo, en la que se han acoplado tres radicales manodisacáridos con conexión β -1,2, se encontró como la sustancia más activa para la producción de citoquinas IFN- γ e IL-10 para la regulación potencial del sistema inmunitario. La molécula, que tiene un número decreciente de valencia en comparación con el compuesto de la invención, no tiene actividad inmunoestimulante y un número creciente de valencias compromete ciertos beneficios conseguidos debido al pequeño tamaño. Cuando se estudian, por ejemplo, compuestos inmunoestimuladores acetilados de la invención, el aumento en el tamaño de la molécula, es decir, de trivalente a pentavalente, causa problemas de solubilidad en agua. De este modo, se ha encontrado que la molécula trivalente de acuerdo con la invención es el compuesto inmunoestimulador más atractivo cuando se trabaja en condiciones acuosas. Sin embargo, en diferentes matrices o condiciones, p. ej., en lipófilos, otra valencia puede proporcionar mejores propiedades sobre la molécula trivalente.

El grupo funcional R se selecciona del grupo de acetilo (COCH_3), hidrógeno (H), trifluoroacetilo (COCF_3) o un grupo sulfonato tal como NaSO_3^- o algún otro grupo funcional. En algunas aplicaciones o realizaciones de la presente invención, puede existir la necesidad de ajustar las propiedades de un compuesto inmunoestimulador, p. ej., con respecto a la administración a un sujeto que lo necesite, la absorción en el metabolismo, la formulación del producto farmacéutico, los problemas de estabilidad, etc. La selección del grupo funcional R para ajustarse a estos requisitos

es un conocimiento rutinario para un experto en la técnica.

La presente invención también proporciona el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. Una realización de la presente invención proporciona el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención para su uso como un coadyuvante de una vacuna.

- 5 La presente invención también proporciona un compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención o cualquier combinación de los mismos para su uso en el tratamiento de una afección que se puede prevenir o tratar induciendo una respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1 y/o inhibiendo una de tipo Th2.

10 La respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1 es inducida por inducción de la producción de IFN- γ en células T, y/o inhibición o supresión de la función de células T de tipo Th2, mastocitos, granulocitos eosinófilos y/o granulocitos basófilos. La respuesta inmunitaria de tipo Th2 se inhibe por inducción de la producción de IL-10 en células T y/o inhibición o supresión de la función de células T de tipo Th2, mastocitos, granulocitos eosinófilos y/o granulocitos basófilos. La inhibición de la respuesta inmunitaria de tipo Th2 también se basa en la supresión de la producción de IL-5 inducida por alérgenos.

15 La invención proporciona también el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de la alergia atópica inmediata de tipo I. En las realizaciones preferidas, la alergia atópica inmediata de tipo I se selecciona del grupo de síndrome de eczema atópico/dermatitis (AEDS), asma alérgica, rinitis alérgica, urticaria alérgica, alergia alimentaria, alergia al veneno y rinoconjuntivitis alérgica. En otras realizaciones, la invención proporciona el compuesto inmunoestimulador de la invención para su uso en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

20 La presente invención se refiere también a una composición inmunoestimuladora que comprende al menos uno de los compuestos inmunoestimuladores de acuerdo con la invención o mezclas de los mismos y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona el uso del compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención y/o cualquier combinación de los mismos como un aditivo alimentario.

25 Se describe también un método para inducir respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1 que comprende administrar a un sujeto la composición de la invención en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1 y un método para la inhibición de la respuesta inmunitaria de tipo Th2 que comprende administrar a un sujeto la composición de la invención o el alimento de la invención en una cantidad eficaz para inhibir parcial o totalmente el desarrollo de la respuesta inmunitaria de tipo Th2.

30 Breve descripción de los dibujos

Figura 1 ilustra la modulación mediada por manooligosacáridos con conexión β -1,2 de la respuesta inmunitaria Th,

Figura 2 ilustra la síntesis de compuestos trivalentes que contienen manodisacárido con conexión β -1,2 de acuerdo con la fórmula (II) de la invención, y más específicamente el compuesto (IV),

35 Figura 3 ilustra la modificación del grupo funcional del compuesto trivalente que contiene manodisacárido con conexión β -1,2,

Figura 4 ilustra la síntesis del compuesto manodisacárido con conexión β -1,2 activo con un $-\text{CH}_2-$ añadido al conector que contiene triazol del compuesto (IV),

40 Figura 5 muestra la producción de citoquinas (eje vertical) inducida por tres compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 multivalentes sintetizados químicamente de la invención en PBMC humanas de tres sujetos evaluados mediante kits LINCoplex™ utilizando instrumental Luminex¹⁰⁰™. El eje horizontal proporciona la concentración, por lo tanto 20 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de cada compuesto estudiado,

45 Figura 6 muestra la supresión de la producción de IL-5 inducida por alérgenos (Abedul, Betula verrucosa) por dos compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 multivalentes químicamente sintetizados en PBMC humanas de cuatro sujetos de estudio (A, B, C, D) evaluados por medio de kits LINCoplex™ - utilizando instrumental Luminex¹⁰⁰™, y

Figuras 7a, 7b y 7c

ilustran las estructuras químicas de los compuestos manooligosacárido utilizados en los Ejemplos 1 y 2.

Descripción detallada de la invención

50 Se cree que el mecanismo proporcionado por los compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 oligo- o multivalentes inmunoestimuladores de la presente invención es la modulación mediada por carbohidratos de la respuesta inmunitaria Th como se presenta en la Figura 1. Los componentes esenciales de dicho radical

carbohidrato son manooligosacáridos con conexión β -1,2. En el contexto de esta solicitud, el término β -1,2-manooligosacárido se refiere a radicales carbohidrato que consisten en dos a ocho radicales de manopiranosos. El compuesto oligovalente también puede incorporar manosa u otros radicales monosacárido.

La inflamación alérgica se caracteriza por la producción de anticuerpos IgE, desgranulación de los mastocitos e inflamación eosinofílica. Estas respuestas están mediadas por células inmunitarias de tipo Th2 específicas de alérgenos que secretan citoquinas tales como IL-4 e IL-5. Las células Th1 que secretan citoquinas, incluyendo IFN- γ están implicadas en la supresión de las respuestas inmunitarias de tipo Th2 inducidas por alérgenos. La citoquina reguladora IL-10 es también importante en la regulación a la baja de las respuestas inmunitarias de tipo Th2. Basándose en los experimentos descritos en los ejemplos, el descubrimiento de que los manodisacáridos con conexión β -1,2 trivalentes de acuerdo con la invención estimulan IFN- γ e IL-10 en glóbulos blancos humanos sugiere que estas citoquinas tienen un papel en la supresión mediada por β -1,2-manooligosacáridos de la respuesta de células Th2, y por lo tanto en la inflamación alérgica.

La presente invención describe compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 oligo- o multivalentes inmunoestimuladores sintéticos y el uso de tales moléculas o sus profármacos para la modulación de las respuestas inmunitarias mediadas por Th descritas anteriormente y en la fabricación de un medicamento, una preparación farmacéutica y nutricional para la prevención o el tratamiento de alergias atópicas de tipo I y enfermedades infecciosas en un sujeto.

Cuando se habla de inmunología, vale la pena señalar que los inmunógenos se utilizan para estimular la respuesta inmunitaria específica contra el inmunógeno. Los inmunoestimulantes, sin embargo, se utilizan para estimular una activación no específica del sistema inmunitario con el fin de potenciar una respuesta inmunitaria específica contra un inmunógeno co-administrado.

El término *inmunoestimulante* o *compuesto inmunoestimulador* se refiere a una sustancia biológicamente activa, cuyas actividades afectan o juegan un papel en el funcionamiento del sistema inmunitario del sujeto anfitrión mediante la estimulación de respuestas de células T coadyuvantes de tipo 1 y T de tipo reguladora. El término *sujeto* se refiere a un mamífero, incluyendo un ser humano. El inmunoestimulante induce la activación no específica del sistema inmunitario. Los inmunoestimulantes se utilizan entre otras aplicaciones también como coadyuvantes de vacunas para mejorar una respuesta inmunitaria humoral o celular específica contra un inmunógeno de vacuna co-administrado junto con un compuesto inmunoestimulador.

Por lo tanto, el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención es también adecuado para su uso como un coadyuvante de vacunas. El compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención o sus mezclas se añaden a vacunas como coadyuvante para estimular la respuesta del sistema inmunitario al antígeno diana, pero no confieren en sí mismos inmunidad. Especialmente, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para su uso como coadyuvantes en inyecciones de desensibilización. Asimismo, los compuestos de la invención se pueden utilizar como coadyuvante en vacunas contra enfermedades infecciosas. Preferiblemente, cuando se utiliza como coadyuvante, el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención se puede co-administrar con el componente principal, el inmunógeno en cuestión. Sin embargo, el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la invención puede ser modificado genéticamente opcionalmente para que se una o se conecte adicionalmente a dicho inmunógeno o a otro componente de la composición de vacuna.

También se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1. El método implica la administración a un sujeto de una composición de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para inducir la síntesis de citoquinas de tipo Treg y/o Th1. En realizaciones preferidas, el método implica, pero no se limita a, la inducción de la síntesis de IFN- γ en células T.

También se describe un método para inhibir una respuesta inmunitaria de tipo Th2. El método implica la administración a un sujeto de la composición de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para inhibir parcial o totalmente el desarrollo de la respuesta inmunitaria de tipo Th2 a un alérgeno. En realizaciones preferidas, los mecanismos de inhibición incluyen, pero no se limitan a, la inducción de la producción de IL-10 en células T. El método también puede implicar la supresión de la respuesta inmunitaria de tipo Th2 por inhibición o supresión de la función de células T de tipo Th2, mastocitos y granulocitos eosinófilos y basófilos.

Más específicamente, el compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la presente invención es preferible para un uso en donde una respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1 es inducida por

a) inducción de la producción de IFN- γ en células T, y/o

b) inhibición o supresión de la función de las células T de tipo Th2, mastocitos, granulocitos eosinófilos y/o granulocitos basófilos.

Además, se prefiere un compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la presente invención para un uso en donde una respuesta inmunitaria de tipo Th2 es inhibida por

a) inducción de la producción de IL-10 en células T y/o

b) inhibición o supresión de la función de células T de tipo Th2, mastocitos, granulocitos eosinófilos y/o granulocitos basófilos.

También se describe un método para modular una respuesta inmunitaria mediada por Th. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria estimulada de acuerdo con la invención está polarizada hacia la respuesta de tipo Th1 y alejada de la respuesta de tipo Th2. En un aspecto, el método implica la administración a un sujeto de dicha composición en una cantidad eficaz para estimular la producción de citoquinas de tipo Th1. En realizaciones preferidas, el método implica, pero no se limita a, la inducción de la síntesis de IFN- γ en células T. En otro aspecto, el método implica la administración a un sujeto de dicha composición en una cantidad eficaz para inhibir parcial o totalmente el desarrollo de la respuesta inmunitaria de tipo Th2 al alérgeno. En realizaciones preferidas, los mecanismos de inhibición incluyen, pero no se limitan a, la inducción de la producción de IL-10 en células T. El método también puede implicar la supresión de la respuesta inmunitaria de tipo Th2 por inhibición o supresión de la función de células T de tipo Th2, mastocitos y granulocitos eosinófilos y basófilos.

La invención se refiere además al uso de una composición de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento, una preparación farmacéutica o nutricional para la prevención o el tratamiento de alergias atópicas inmediatas de tipo I. En las realizaciones preferidas, la alergia atópica inmediata de tipo I se selecciona del grupo que consiste en síndrome de eczema atópico/dermatitis (AEDS), asma alérgica, rinitis alérgica, urticaria alérgica, alergia alimentaria, alergia al veneno y rinoconjuntivitis alérgica. En otras realizaciones, el compuesto de la invención se puede utilizar para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas. El termino *prevenir, prevención o que previene* utilizado en la presente memoria se refiere a la inhibición total o parcial del desarrollo del trastorno en un sujeto que tiene o está en alto riesgo de desarrollar dicho trastorno. El termino *tratar, tratamiento o que trata* se define como la administración a un sujeto de una cantidad de dicho compuesto o composición eficaz para prevenir la aparición, aliviar los síntomas o detener la progresión del trastorno. El termino *cantidad eficaz* utilizado en la presente memoria se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. La cantidad terapéuticamente eficaz varía típicamente de aproximadamente 1 μ g a varios gramos dependiendo de la composición y especialmente del modo de administración. Por ejemplo la cantidad típica para la administración parenteral de manodisacárido con conexión β -1,2 trivalente de acuerdo con la invención, es de 1 μ g a 100 μ g, preferiblemente de 2 μ g a 30 μ g, lo más preferiblemente de 3 μ g a 10 μ g, y para la administración oral la cantidad puede ser típicamente mucho mayor de unos pocos mg hasta varios gramos. Si se administra un profármaco, la cantidad eficaz depende de la cantidad de compuesto manooligosacárido con conexión β -1,2 inmunoestimulador, p.ej., manodisacárido con conexión β -1,2 trivalente, que puede dar como resultado y de la cantidad que realmente se libera.

En realizaciones adicionales, el medicamento o preparación farmacéutica de la invención se pueden administrar a un sujeto por medio de cualquier ruta conocida en la técnica, incluyendo rutas entéricas, mucosales, parenterales y tópicas. Las rutas entéricas incluyen la ruta oral y cualquier ruta que implique la absorción desde el tracto gastrointestinal. Las rutas mucosales incluyen, pero no se limitan a, las rutas oral, nasal, sublingual, bucal, pulmonar, transdérmica y ocular. Las rutas parenterales incluyen, pero no se limitan a, las rutas intravenosa, intradérmica, intramuscular y subcutánea.

En algunas realizaciones, la composición de la invención se utiliza conjugada con un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición inmunoestimuladora de acuerdo con la invención incluye típicamente al menos uno de los compuestos inmunoestimuladores de acuerdo con la invención o mezclas de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable. El termino *portador farmacéuticamente aceptable* se refiere a una sustancia portadora con la que el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación a un sujeto y que es fisiológicamente aceptable para el receptor. El portador farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, portadores transdérmicos, portadores transmucosales, portadores orales, portadores parenterales, portadores para formulaciones de depósito y portadores para formulaciones de liberación prolongada.

El compuesto inmunoestimulador de la presente invención se puede encapsular, incorporar o disolver en una matriz, que puede proporcionar un suministro sistémico de liberación prolongada. Puede estar opcionalmente adaptado para que su utilización proporcione un suministro prolongado dentro de una región de tejido localizada, por ejemplo dentro del sitio de la reacción alérgica, el sitio de infección o el sitio de vacunación. Se pretende que esta liberación sostenida o liberación controlada hagan referencia a la inclusión de la liberación que se produce como resultado de la biodegradación in vivo del depósito o componente de la misma, o como resultado de la transformación metabólica o disolución liberando dicho compuesto inmunoestimulador. Por ejemplo, en inyecciones subcutáneas, cuando el compuesto inmunoestimulador se utiliza como adyuvante junto con el alérgeno, éste podría funcionar por sí mismo como un depósito que se filtrará a la sangre/tejido circundantes con el tiempo.

Alternativamente, el compuesto inmunoestimulador de la presente invención se puede conjugar desde la unidad núcleo o un portador directamente a un grupo de lípidos que puede proporcionar a continuación una preparación de depósito. Estos compuestos inmunoestimuladores modificados con lípidos o lipidados se pueden utilizar para la formación de suspensiones, la incorporación a emulsiones, membranas lipídicas, vesículas lipídicas, liposomas y similares.

En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica de la invención puede incluir otro compuesto terapéutico.

El término *compuesto terapéutico* utilizado en la presente memoria es preferentemente un medicamento para la alergia, un medicamento para el asma o un agente antimicrobiano. En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la invención comprende un antígeno. El término *antígeno* incluye en sentido amplio cualquier tipo de molécula (p. ej., proteína, péptido, polisacárido, glicoproteína, ácido nucleico o combinación de los mismos) que es reconocido por un sistema inmunitario del anfitrión y es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica. En algunas realizaciones, el antígeno es una preparación alérgica para inmunoterapia alérgica específica (vacunación alérgica o inmunoterapia sublingual). El término *alérgeno* utilizado en la presente memoria se refiere a una sustancia que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible, e incluye, pero no está limitada a pólenes, venenos de insectos, caspa de animales, esporas de hongos y ácaros del polvo de la casa. El término *inmunoterapia específica para alérgenos*, que también se conoce como inmunoterapia alérgica, terapia de hiposensibilización o desensibilización inmunológica, se refiere al tratamiento de un sujeto con un trastorno alérgico administrando cantidades progresivamente incrementadas de alérgeno por cualquiera de las rutas conocidas para inducir tolerancia inmunológica al alérgeno para prevenir nuevas reacciones alérgicas. Por lo tanto, la composición de la invención puede comprender también una preparación alérgica para inmunoterapia alérgica específica; y/o un medicamento adicional para la alergia o el asma.

Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención comprende adicionalmente una preparación de antígeno específico de microbios para la vacunación o inmunización contra enfermedades infecciosas y/o un agente antimicrobiano. El término *enfermedad infecciosa* se refiere a una enfermedad que surge de la presencia de microorganismos foráneos o patógenos infecciosos en el organismo. El término *patógenos infecciosos*, es decir microbios, se refiere a virus, bacterias y parásitos. Como tal, el término patógenos infecciosos también incluye la flora normal, lo cual no es deseable. En un aspecto, la administración combinada de la composición farmacéutica de la invención y del antígeno microbiano es útil para estimular una respuesta inmunitaria mejorada a células malignas y patógenos. El término *antígenos microbianos* utilizado en la presente memoria incluye microorganismos intactos, así como productos aislados naturales y fragmentos o derivados de los mismos, y también compuestos sintéticos, que son idénticos o similares a antígenos microbianos naturales. En otras realizaciones más, la composición farmacéutica de la invención comprende anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a, o reconocen específicamente, antígenos microbianos.

En otras realizaciones más, el compuesto de la invención se utiliza como aditivo alimentario. El compuesto de la invención también se puede formular en una preparación nutricional. La preparación nutricional es preferiblemente administrable entéricamente, p. ej., polvo, comprimido, cápsula, un producto concentrado líquido, un producto sólido o una bebida lista para beber. Alternativamente, la preparación nutricional de la realización se combina con una matriz adecuada como aditivo de productos alimenticios habituales. En otras realizaciones, la preparación nutricional de la invención se utiliza para el enriquecimiento de fórmulas infantiles y otros productos alimenticios funcionales. Una realización adicional que comprende la composición de la invención podría ser una goma de mascar.

Síntesis de compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 de acuerdo con la invención

Las síntesis y el desarrollo en este campo han sido impulsados por la necesidad de inhibidores potentes de carbohidratos para comprender los diferentes factores implicados en las interacciones proteína-carbohidrato. Se ha demostrado que características tales como estructura, forma, tamaño, geometría y valencia son factores determinantes que influyen en las propiedades de unión generalmente débiles de los ligandos de carbohidratos. Para superar estas interacciones de unión débiles, se han generado productos neoglicoconjugados multivalentes que van desde aglomerados y oligómeros hasta sistemas polidispersados macromoleculares tales como glicopolímeros y dendrímeros de glicol para proporcionar antiadhesinas de mayor afinidad. Un gran número de estos ligandos de carbohidratos multivalentes demostraron poderosas propiedades inhibitorias cuando se sometieron a ensayo contra sus lectinas animales o vegetales específicas. En el área de la multivalencia, el desarrollo de carbohidratos multivalentes de tamaño variable como efectores de procesos biológicos a través del agrupamiento de receptores ha sido un tema de interés. Generalmente, los carbohidratos implicados en la unión están conectados entre sí a través de conectores. La cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos para producir triazoles es probablemente la reacción "click" más potente para tales conexiones. En el campo de la química de los carbohidratos, la química click se ha utilizado para la síntesis de productos glicoconjugados y macrociclos de carbohidratos en los que un azúcar que posee una función azido se injerta sobre un sacárido, un péptido o una cadena polimérica.

Actualmente se dispone de algunos procedimientos para la síntesis de compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 de la invención. Uno especialmente adecuado es el llamado protocolo de química Click (Ballell *et al.*, 2006; Pérez-Balderas *et al.*, 2005).

Dicho protocolo de química Click se ha utilizado ahora para sintetizar moléculas trivalentes basadas en manodisacáridos con conexión β -1,2 de acuerdo con la invención. La reacción click mediada por Cu(I) entre el 2-azidoetil glicósido de manodisacárido con conexión β -1,2 y el compuesto de tri-O-propargilo basado en glicerol proporcionó las moléculas trivalentes deseadas con buen rendimiento.

Los compuestos trivalentes basados en manodisacáridos con conexión β -1,2 **9** (forma acetilo) y **10** (forma hidroxilo) se prepararon a partir de tioglicósido parcialmente protegido **1** (Crich *et al.*, 2006) en un número mínimo de etapas,

como se muestra en la Figura 2. El compuesto **9** es congruente con el compuesto de fórmula (IV) de la invención. Se introdujo un grupo acetilo (para la ayuda anquímica durante la glicosilación α -selectiva) en la posición C-2 de **1** para proporcionar el donador de glicosilo **2**. La glicosilación entre el donador **2** y el 2-azidoetanol (Pfaendler *et al.*, 1996) en presencia de N-yodosuccinimida-TMSOTf (Ohlsson *et al.*, 2000) proporcionó el producto 1,2-trans **3** con un rendimiento de 62%. La desacetilación de Zemplén del compuesto **3** proporcionó el aceptor de glicosilo **4** (Alpe *et al.*, 2003) con un rendimiento cuantitativo.

Utilizando la glicosilación selectiva de β mediada por BSP/Tf₂O (Crich *et al.*, 2001) del compuesto **4** y el donador de glicosilo **5** (Crich *et al.*, 2002) se proporcionó el disacárido **6** con un rendimiento de 65%. La presencia de la conexión β fue confirmada por el valor de la constante de acoplamiento ¹J_{CH} de 157,0 Hz del carbono anomérico a δ 100,8 (Bocks *et al.*, 1974), mientras que la presencia de la conexión α se confirmó por el valor de la constante de acoplamiento ¹J_{CH} de 168,2 Hz del carbono anomérico a δ 98,6 (Crich *et al.*, 2000). La desprotección mediada por TFA (Codée *et al.*, 2005) de todos los grupos éter del glicósido **6** seguida de acetilación convencional proporcionó el compuesto **7** con un rendimiento de 91% en dos etapas. La aplicación de un acoplamiento click fuerte entre el 2-azidoetil glicósido **7** y el tri-O-propargil-glicerol **8** (Mourer *et al.*, 2008) proporcionó el compuesto trivalente acetilado **9** con un rendimiento de 87%, que tras la desacetilación de Zemplén proporcionó el compuesto trivalente completamente desprotegido **10** con un rendimiento de 93% (Figura 2).

Modificación de grupos funcionales de compuestos mano-oligosacárido trivalentes con conexión β -1,2 de acuerdo con la invención

El compuesto manooligosacárido con conexión β -1,2 de la presente descripción comprende varios grupos funcionales representados por R en las fórmulas (I, II, III) y en las Figuras 2, 3 y 4. Estos se pueden convertir en derivados de manooligosacáridos de los mismos mediante tratamiento rutinario, en donde al menos un hidrógeno de los grupos hidroxilo del anillo se sustituye por otro radical químico. En una realización, se utiliza un grupo acetilo o acilo C₂-C₆ o un grupo protector tal como un grupo bencilo o clorobencilo para formar un derivado de manopiranososa. El uso de grupos protectores u otros sustituyentes en estas posiciones puede ser beneficioso durante la síntesis de compuestos o, alternativamente, la formulación o administración de un medicamento que comprende los compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 de la presente invención. Al convertir los grupos funcionales R en sus derivados, todos los grupos representados por R se pueden convertir en la misma etapa de reacción o alternativamente la conversión puede tener lugar en grupos R en posiciones seleccionadas dando como resultado un compuesto que tiene sustituyentes variables. Sin embargo, preferiblemente, todos los grupos R se hacen reaccionar para representar el mismo sustituyente. Los derivados acetilo y acilo se pueden hidrolizar *in vivo* para formar un producto conjugado de manopiranososa.

Esto se ilustra más específicamente en la Figura 3, que muestra cómo el manósido trivalente **10** puede derivatizarse a otros grupos funcionales. Tras la reacción con anhídrido trifluoroacético/piridina, **10** trivalente se puede transformar en **11**, mientras que en el tratamiento con SO₃.Py/piridina (de Paz *et al.*, 2005) los grupos hidroxilo de **10** se pueden convertir en grupos sulfato más hidrófilos formando así el trivalente **12** como se muestra en la Figura 3. La derivatización, si se desea, se puede eliminar, p. ej., antes de la administración, proporcionando de nuevo el compuesto **10**.

Modificación estructural en la porción conectora de los compuestos mano-oligosacárido con conexión β -1,2 de acuerdo con la invención

Los autores de la presente invención han encontrado y demostrado experimentalmente que los compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 proporcionan excelentes resultados incluso cuando se han empleado estructuras conectoras diferentes. El conector puede comprender, por ejemplo, un radical triazol o un derivado del mismo.

La reacción de cicloadición de azida-alquino mediada por cobre (química click) produce el radical triazol en el punto de anclaje. Estos radicales triazol pueden mejorar las bioactividades de una molécula por asociación con la diana a través de enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, puede no ser sólo un conector pasivo. Para conseguir su efecto, estos radicales triazol se pueden reemplazar por una simple cadena de carbono con una longitud de espaciador similar. Se puede sintetizar una molécula trivalente que contiene manodisacárido que tiene una cadena de carbono simple con una forma más o menos similar.

Para sintetizar compuestos trivalentes que contienen manodisacáridos con conexión β -1,2, se puede utilizar un tioglicósido como donador de glicosilo para la introducción de la conexión α inicial. La glucosilación α -selectiva mediada por NIS/TMSOTf de dicho tioglicósido con alcohol alílico podría proporcionar un alilglicósido. La desacetilación de Zemplén de este alilglicósido podría proporcionar un aceptor de glicosilo, que tras la glicosilación β -selectiva mediada por BSP/Tf₂ con un donador de glicosilo podría proporcionar un disacárido. La hidrobromación con 9-BBN seguida de oxidación con H₂O₂/NaOH podría convertir el doble enlace de dicho disacárido en un alcohol primario formando así un 2-hidroxietyl glicósido (Soderquist *et al.*, 1980). Tras el tratamiento con CBr₄/PPh₃, se puede transformar un grupo hidroxilo en un grupo bromo para proporcionar un intermedio de acuerdo con Bentz *et al.*, 2006 y Matsuda *et al.*, 2006).

Con el anión acetiluro, éste podría formar además un enlace carbono-carbono para proporcionar un compuesto trivalente que, tras la hidrogenación catalítica/hidrogenolisis en presencia de hidrógeno sobre Pd-C al 10%, podría proporcionar un compuesto trivalente que contenga un manodisacárido con conexión β -1,2 saturado y completamente desprotegido. La acetilación convencional del mismo podría proporcionar un derivado acetilado. Además, el tratamiento con $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ /piridina podría proporcionar un derivado sulfatado.

Ejemplos

Síntesis experimental de compuestos manooligosacárido trivalentes con conexión β -1,2

Compuestos

La síntesis experimental de manósidos trivalentes con conexión β se describe a continuación utilizando los números de referencia de la Figura 2.

Fenil 2-O-acetil-4,6-O-benciliden-3-O-*p*-metoxibencil-1-tio- α -D-manopiranosido (2): A una solución del compuesto 1 (1,85 g, 3,85 mmoles) en piridina (10 mL) se le añadió anhídrido acético (5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El disolvente se evaporó seguido de co-evaporación con tolueno (3 x 10 mL). La mezcla de reacción bruta se purificó sobre SiO_2 (hexano/EtOAc, 5:1) para proporcionar el compuesto **2** puro (1,9 g, 94%) en forma de una espuma incolora. ESI-HRMS, Calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 545,1610; Encontrado: 545,1622.

2-Azidoetil 2-O-acetil-4,6-O-benciliden-3-O-*p*-metoxibencil- α -D-manopiranosido (3): A una solución del compuesto **2** (1,5 g, 2,87 mmoles) y 2-azidoetanol (300 mg, 3,44 mmoles) en CH_2Cl_2 (15 mL) se le añadieron tamices moleculares de 4 Å (1,5 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos en atmósfera de argón. Se añadió NIS (775 mg, 3,44 mmoles) y la mezcla de reacción se enfrió a -40°C seguido de la adición de TMSOTf (38 mg, 31 μL , 0,17 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a la misma temperatura y se sofocó con Et_3N (100 μL). La mezcla de reacción se filtró sobre un lecho de celite y se lavó con CH_2Cl_2 (40 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (30 mL), NaHCO_3 acuoso saturado (2 X 30 mL) y solución de salmuera (2 x 30 mL), respectivamente. La capa orgánica se secó a continuación (Na_2SO_4), se concentró y se purificó sobre SiO_2 (hexano/EtOAc, 7:2) para proporcionar **3** puro (890 mg, 62%) en forma de una espuma incolora. ESI-HRMS, Calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 522,1852; Encontrado: 522,1839.

2-Azidoetil 4,6-O-benciliden-3-O-*p*-metoxibencil- α -D-manopiranosido (4): A una solución del compuesto **3** (780 mg, 0,05 mmoles) en MeOH (20 mL) se le añadió metóxido de sodio (0,1 M en MeOH, 600 μL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió Dowex[®] 50WX8-100 (H^+) para neutralizar. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con metanol (3 x 10 mL). La capa orgánica combinada se evaporó hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto **4** (690 mg, cuantitativo) en forma de un aceite incoloro. Los datos de caracterización para **4** están de acuerdo con lo referido en la bibliografía (Alpe *et al.*, 2003).

2-Azidoetil (4,6-O-benciliden-2,3-di-O-*p*-metoxibencil- β -D-mano-piranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-4,6-O-benciliden-3-O-*p*-metoxibencil- α -D-manopiranosido (6): A una solución de donador de glicosilo **5** (1,5 g, 2,49 mmoles) en CH_2Cl_2 (20 mL) se le añadieron tamices moleculares de 4 Å (2 g) y la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se añadieron BSP (630 mg, 2,99 mmoles) y TTBP (930 mg, 3,74 mmoles) a -60°C seguido de la adición de Tf_2O (920 mg, 550 μL , 3,24 mmoles) y agitación en las mismas condiciones durante 30 min. El compuesto **4** (950 mg, 2,08 mmoles) en CH_2Cl_2 (10 mL) se añadió a la mezcla de reacción a -78°C y se agitaron durante 2 h a esta temperatura antes de enfriar con Et_3N (1 mL). La mezcla de reacción se filtró a continuación a través de un lecho de celite seguido de lavado con CH_2Cl_2 (60 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (2 x 30 mL), salmuera (20 mL), se secó (Na_2SO_4), se concentró y se purificó sobre SiO_2 (hexano/EtOAc, 5:2) para proporcionar el isómero β **6** (1,27 g, 65%) en forma de una espuma incolora. ESI-HRMS, Calc. para $\text{C}_{52}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 970,3739; Encontrado: 970,3717.

2-Azidoetil (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido (7): A una solución agitada del compuesto **6** (1,0 g, 1,05 mmoles) y 1,3-propanoditiol (915 mg, 850 μL , 8,44 mmoles) en CH_2Cl_2 (10 mL) se le añadió TFA- H_2O (5 mL, 4:1) a 0°C y se continuó la agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua (15 mL) y se lavó con CH_2Cl_2 (4 X 15 mL) para eliminar todos los materiales orgánicos no polares. La capa acuosa se evaporó seguido de co-evaporación con tolueno (4 x 20 mL) a presión reducida. El producto bruto se disolvió a continuación en piridina (20 mL) seguido de la adición de Ac_2O a 0°C , después de lo cual la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Los disolventes se evaporaron a presión reducida seguido de co-evaporación con tolueno (3 x 20 mL). La mezcla bruta se purificó a continuación sobre SiO_2 (hexano/EtOAc, 1:1) para proporcionar el producto acetilado **7** (675 mg, 91%) en forma de un polvo de color blanco. ESI-HRMS, Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 728,2127; Encontrado: 728,2112.

1,2,3-Tris[1-[(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-(3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosiloxi-etil)]-4-[metil-1-oxi]triazolil]propano (9), es decir, compuesto de acuerdo con la fórmula (IV) de la invención: A una solución de 2-azidoetil glicosido **7** (300 mg, 0,43 mmoles) y **8** (26,6 mg, 0,13 mmoles) en $^t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (6 mL, 1:1:1, v/v/v), se le añadieron sulfato de cobre (6,2 mg, 0,04 mmoles) y ascorbato sódico (15,3 mg, 0,08 mmoles) respectivamente y se calentaron a 55°C durante 12 h. Se vertieron NH_4Cl saturado y agua (20 mL, 1:1) en la solución seguido de extracción con CH_2Cl_2 (3 X 20 mL). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró, se concentró y se purificó sobre

SiO₂ (MeOH en CH₂Cl₂ al 4%) para proporcionar el compuesto del título 9 puro (260 mg, 87%) en forma de un sólido incoloro. R_f: 0,45 (7% MeOH en CH₂Cl₂); [α]_D²⁵ -67,5° (c 1, CHCl₃); RMN H¹ (600,13 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (s, 1 H), 7,73 (s, 1 H), 7,72 (s, 1 H), 5,48-5,46 (m, 3 H), 5,25-5,21 (m, 6 H), 5,04-5,00 (m, 3 H), 4,91-4,87 (m, 3 H), 4,81-4,77 (m, 5 H), 4,70-4,69 (m, 3 H), 4,67-4,55 (m, 10 H), 4,34-4,30 (m, 3 H), 4,28-4,27 (m, 3 H), 4,20-4,16 (m, 3 H), 4,14-4,09 (m, 3 H), 4,02-3,99 (m, 6 H), 3,93-3,90 (m, 3 H), 3,82 (quintete, J = 5,2 Hz, 1 H), 3,69-3,54 (m, 10 H), 2,23 (s ancho, 9 H), 2,12 (s ancho, 9 H), 2,09 (s ancho, 9 H), 2,04 (s ancho, 9 H), 2,03 (s ancho, 6 H), 2,02 (s ancho, 9 H), 2,01 (s, 3 H), 2,00 (s ancho, 9 H); RMN C¹³ (150,9 MHz, CDCl₃) δ 170,8 (3 C), 170,6, 170,5 (2 C), 170,3, 170,2 (4 C), 170,1, 169,9, 169,8 (2 C), 169,6 (3 C), 169,2, 169,1 (2 C), 145,5, 145,0, 144,9, 123,8, 123,7 (2 C), 97,4 (3 C), 96,2 (3 C), 77,1, 72,1 (2 C), 72,0, 71,9, 71,8 (2 C), 70,6, 70,5 (2 C), 70,0 (4 C), 69,9, 68,9 (2 C), 68,8, 68,4 (3 C), 66,0 (3 C), 65,9 (3 C), 64,7 (3 C), 64,4 (2 C), 63,5, 62,3 (3 C), 61,6, 61,5 (2 C), 49,7 (2 C), 49,6, 20,7 (6 C), 20,6 (6 C), 20,5 (6 C), 20,4 (3 C); MALDI-TOF-MS, Calc. para C₉₆H₁₃₁N₉O₅₇Na [M + Na]⁺: 2344,752; encontrado: 2344,768.

1,2,3-Tris[1-(β-D-manopiranosil)-(1→2)-(α-D-manopiranosiloxietil)]-4-[metil-1-oxi]triazolil]propano (10): A una solución del compuesto 9 (47 mg, 0,02 mmoles) en MeOH (3 mL) se le añadió metóxido de sodio (0,1 M en MeOH, 100 μl) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió Dowex® 50WX8-100 (H⁺) para neutralizar. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con metanol (3 x 20 mL). La capa orgánica combinada se evaporó hasta sequedad a presión reducida para proporcionar 10 puro (27 mg, 93%) en forma de una espuma de color blanco. [α]_D²⁵ -2,0° (c 1, H₂O); RMN H¹ (600,13 MHz, D₂O) δ 8,09 (s ancho, 2 H), 8,08 (s, 1 H), 4,92-4,90 (m, 3 H), 4,74 (s ancho, 2 H), 4,70-4,64 (m, 13 H), 4,14-4,09 (m, 3 H), 4,08-4,06 (m, 3 H), 4,00 (d, J = 3,2 Hz, 3 H), 3,97-3,87 (m, 8 H), 3,74-3,61 (m, 21 H), 3,55 (t, J = 9,7 Hz, 3 H), 3,36-3,32 (m, 3 H), 3,02-2,98 (m, 3 H); RMN C¹³ (150,9 MHz, D₂O) δ 144,0 (3 C), 125,6 (3 C), 98,5 (3 C), 97,3 (3 C), 77,0 (3 C), 76,8, 76,3 (3 C), 72,8 (2 C), 72,7 (3 C), 70,7 (3 C), 69,8 (3 C), 69,0 (2 C), 66,6 (4 C), 66,5 (3 C), 65,5 (3 C), 63,3 (2 C), 62,1, 60,9 (3 C), 60,2 (3 C), 50,1 (3 C); MALDI-TOF-MS, Calc. para C₅₄H₈₉N₉O₃₆Na [M + Na]⁺: 1462,530; encontrado: 1462,548.

El mismo compuesto, de acuerdo con la fórmula (IV) de la invención, es decir, 1,2,3-tris[1-[(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-manopiranosil)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosiloxietil)]-4-[metil-1-oxi]triazolil]-propano (9) se produjo a mayor escala en otro experimento. La síntesis completa o la caracterización de productos intermedios o productos finales no se muestran aquí, pero dicha síntesis proporcionó el compuesto puro 1,2,3-tris[1-[(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-manopiranosil)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosiloxietil)]-4-[metil-1-oxi]triazolil]-propano (9) a partir de los compuestos 7 y 8 de manera análoga a la descrita anteriormente (230 mg, 74%) en forma de un sólido incoloro.

Síntesis del análogo del compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la fórmula (IV) de la invención con conector elongado

3-Azidopropil 2-O-acetil-4,6-O-benciliden-3-O-*p*-metoxibencil-α-D-manopiranosido (13): A una solución del compuesto 2 (2 g, 3,82 mmoles) y 3-azido-1-propanol (464 mg, 4,59 mmoles) en CH₂Cl₂ (15 mL) se le añadieron tamices moleculares de 4 Å (1,5 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo atmósfera de argón. Se añadió NIS (1,03 g, 4,59 mmoles) y la mezcla de reacción se enfrió a -40°C seguido de la adición de TMSOTf (45 mg, 36 μl, 0,20 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a la misma temperatura y se sofocó con Et₃N (100 μl). La mezcla de reacción se filtró sobre un lecho de celite y se lavó con CH₂Cl₂ (40 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (30 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 30 mL) y solución de salmuera (2 x 30 mL), respectivamente. La capa orgánica se secó después (Na₂SO₄), se concentró y se purificó sobre SiO₂ para proporcionar 13 puro (1,09 g, 56%) en forma de una espuma incolora. Calc. para C₂₆H₃₁N₃O₁₈Na [M + Na]⁺: 536,2127; encontrado: 536,1952

3-Azidopropil 4,6-O-benciliden-3-O-*p*-metoxibencil-α-D-manopiranosido (14): A una solución del compuesto 13 (920 mg, 1,79 mmoles) en MeOH (20 mL) se le añadió metóxido de sodio (0,1 M en MeOH, 600 μL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se añadió Dowex® 50WX8-100 (H⁺) para neutralizar. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con metanol (4 x 15 mL). La capa orgánica combinada se evaporó hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto 14 (827 mg, 96%) en forma de un aceite incoloro.

3-Azidopropil (4,6-O-benciliden-2,3-di-O-*p*-metoxibencil-β-D-manopiranosil)-(1→2)-4,6-O-benciliden-3-O-*p*-metoxibencil-α-D-manopiranosido (15): A una solución de donador de glicosilo 5 (1,24 g, 2,03 mmoles) en CH₂Cl₂ (20 mL) se le añadieron tamices moleculares de 4 Å (2 g) y la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se añadieron BSP (511 mg, 2,44 mmoles) y TTBP (727 mg, 2,92 mmoles) a -60°C seguido de la adición de Tf₂O (690 mg, 412 μl, 2,44 mmoles), después de lo cual la mezcla de reacción se agitó en las mismas condiciones durante 30 min. El compuesto 14 (800 mg, 1,69 mmoles) en CH₂Cl₂ (10 mL) se añadió a la mezcla de reacción a -78°C y se agitó durante 2 h a esta temperatura antes de enfriar con Et₃N (1 mL). La mezcla de reacción se filtró a continuación a través de un lecho de celite seguido de lavado con CH₂Cl₂ (60 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (2 x 30 mL), salmuera (20 mL), se secó (Na₂SO₄), se concentró y se purificó sobre SiO₂ para proporcionar el isómero β de 15 (930 mg, 57%) en forma de una espuma incolora. ESI-HRMS, Calc. para C₅₃H₅₉N₃O₁₄Na [M + Na]⁺: 985,0500; encontrado: 984,3821.

3-Azidopropil (2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-manopiranosil)-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosido (16): A una solución agitada del compuesto 15 (800 mg, 0,832 mmoles) y 1,3-propanoditioil (901 mg, 835 μL, 8,32 mmoles) en CH₂Cl₂ (10 mL) se le añadió TFA-H₂O (5 mL, 4:1) a 0°C y se continuó la agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua (15 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (4 x 15 mL) para eliminar todos los materiales orgánicos no polares. La capa acuosa se evaporó seguido de co-evaporación con tolueno (4 x 20 mL)

a presión reducida. El producto bruto se disolvió a continuación en piridina (15 mL) seguido de la adición de Ac_2O (10 mL) a 0°C, después de lo cual la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Los disolventes se evaporaron a presión reducida seguido de co-evaporación con tolueno (3 x 20 mL). La mezcla bruta se purificó a continuación sobre SiO_2 (hexano/ EtOAc , 1:1) para proporcionar el producto acetilado **16** (365 mg, 61%) en forma de un polvo de color blanco. ESI-HRMS, Calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 742,6507; Encontrado: 742,2282.

1,2,3-Tris[1-[(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-(3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-oxipropil)]-4-[metil-1-oxi]triazolil]propano (**17**): A una solución de **8** (26,6 mg, 0,13 mmoles) y 2-azidopropil glicósido **16** (300 mg, 0,41 mmoles) en $^t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (6 mL, 1:1:1, v/v/v) se le añadieron sulfato de cobre (6,3 mg, 0,042 mmoles) y ascorbato de sodio (15,4 mg, 0,08 mmoles) respectivamente y la mezcla se calentó a 55°C durante 12 h. Se vertieron NH_4Cl saturado y agua (20 mL, 1:1) en la solución seguido de extracción con CH_2Cl_2 (3 X 20 mL). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró, se concentró y se purificó sobre SiO_2 (4% MeOH en CH_2Cl_2) para proporcionar **17** puro (160 mg, 62%) en forma de un sólido incoloro. RMN ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) δ 7,69 (s, 1 H), 7,63 (s, 2 H), 5,48-5,47 (m, 3 H), 5,26-5,21 (m, 6 H), 5,05-5,03 (m, 3 H), 4,96-4,93 (m, 3 H), 4,77-4,73 (m, 8 H), 4,63 (s, 4 H), 4,49-4,45 (m, 6 H), 4,34-4,28 (m, 6 H), 4,34-4,22 (m, 3 H), 4,04-4,00 (m, 6 H), 3,87-3,85 (m, 3 H), 3,79-3,76 (m, 1 H), 3,76-3,73 (m, 3 H), 3,68-3,64 (m, 7 H), 3,48-3,37 (m, 3 H), 2,23 (s ancho, 9 H), 2,22-2,19 (m, 6 H), 2,09 (s ancho, 9 H), 2,08 (s ancho, 9 H), 2,04 (s, ancho, 9 H), 2,02 (s, ancho, 9 H), 2,01 (s, ancho, 9 H), 1,99 (s, ancho, 9 H); RMN ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) δ 170,9 (3 C), 170,6 (3 C), 170,4 (3 C), 170,3 (3 C), 169,9 (3 C), 169,6 (3 C), 169,3 (3 C), 145,6, 145,2 (2 C), 122,9, 122,7 (2 C), 97,8 (3 C), 96,3 (3 C), 77,3, 72,1 (3 C), 72,0 (3 C), 70,6 (3 C), 70,3 (3 C), 70,2 (2 C), 68,7 (3 C), 68,5 (3 C), 66,1 (3 C), 65,0 (3 C), 64,8 (3 C), 64,6 (2 C), 63,8, 62,4 (3 C), 61,8 (3 C), 47,1 (3 C), 30,0 (3 C), 20,8 (6 C), 20,7 (9 C), 20,6 (6 C); ESI-HRMS, Calc. para $\text{C}_{99}\text{H}_{137}\text{N}_9\text{O}_{57}\text{H}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 2364,8100; encontrado: 2364,8168.

Ensayos biológicos de compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 sintéticos de acuerdo con la invención

Los compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 de acuerdo con la invención se sometieron a ensayo a continuación para determinar su actividad inmunológica. Como los experimentos fueron conducidos por expertos en el campo de la inmunología, las muestras han sido renombradas, documentadas y referidas en consecuencia. Los compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 sintetizados en experimentos previos son referidos en los ensayos biológicos como sigue:

CM-C8-2010 se refiere a un compuesto manooligosacárido con conexión β -1,2 de acuerdo con la realización preferida y descrito anteriormente como compuesto de fórmula IV y proporcionado en la Fig. 2 como compuesto **9**.

RP-I-82 2010 se refiere a un compuesto manooligosacárido con conexión β -1,2 de acuerdo con la otra realización preferida y se somete a ensayo su actividad biológica en el ejemplo 4. El esquema de síntesis para este compuesto se describe en la Fig. 4 y su estructura como producto final **17**.

CM-C4-2010, CM-C7-2010 y CM-C4-2011 se refieren a estructuras proporcionadas en las Figuras 7a, Fig. 7b y Fig. 7c, respectivamente.

Además de las citoquinas comentadas en la descripción, los cultivos celulares se sometieron a ensayo adicionalmente para determinar el efecto sobre el factor de necrosis tumoral TNF en el ejemplo 4. El TNF es una citoquina inflamatoria pleiotrópica que se expresa en los mastocitos y está presente a concentraciones más altas en el líquido broncoalveolar de pacientes con asma, particularmente en el líquido de lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes con asma más severa. Se ha sugerido que quizás desempeña un papel en el asma refractario.

PBMC humanas

Las PBMC humanas se aislaron a partir de muestras de sangre heparinizada con centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (Ficoll-Paque, Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Las PBMC se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y se suspendieron en medio RPMI con un suplemento de suero autólogo al 5%, L-glutamina 2 mM (Fluka Biochemica, Alemania) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina (Biological Industries, Israel). La suspensión celular se diluyó en el medio de cultivo basado en RPMI a 10^6 células/mL y se aplicaron sobre placas de cultivo de 48 pocillos (Costar, Cambridge, MA, EE.UU.).

Ejemplo 1 Inducción de citoquinas por compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 sintéticos

Los oligosacáridos sintéticos se sometieron a ensayo para determinar la producción de citoquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ , en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres sujetos atópicos. Las PBMC se estimularon añadiendo oligosacáridos solubilizados en suspensión de cultivo celular. Los oligosacáridos con conexión β -1,2 polivalentes sintéticos utilizados en este ejemplo son una molécula de acuerdo con el compuesto de fórmula (IV) de la invención (codificado como CM-C8-2010), monosacárido trivalente ($\text{R} = \text{H}$) codificado como CM-C4-2010 y disacárido pentavalente ($\text{R} = \text{O}$) codificado como CM-C7-2010. Las estructuras químicas de CM-C4-2010 y CM-C7-2010 se muestran en las Figuras 7a y 7b. Las respuestas de citoquinas de PBMC se detectaron 72 h después del comienzo de la estimulación midiendo la secreción de citoquinas con kits LINCoplexTM de citoquina humana de alta sensibilidad (LINCO Research, St. Charles, MO, EE.UU.) utilizando instrumental Luminex¹⁰⁰TM. Los análisis se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante empleando la tecnología Luminex. De los

oligosacáridos sometidos a ensayo, un fuerte inductor de IFN- γ e IL-10 fue una molécula de acuerdo con el compuesto de fórmula (IV) de la invención codificada como CM-C8-2010, un inductor moderado una molécula codificada como CM-C7-2010 y un inductor débil una molécula codificada como CM-C4-2010 (Figura 5). No se observó producción de IL-4 e IL-5 en absoluto.

5 Ejemplo 2 Efecto de compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 sintéticos sobre la respuesta inmunitaria inducida por alérgenos

Para demostrar que la invención era válida, se estudió el efecto de la molécula sintética de acuerdo con el compuesto de fórmula (IV) de la invención codificado como CM-C8-2010 sobre la producción de IL-5, una de las principales citoquinas de tipo Th2 que promueven la inflamación alérgica, en un cultivo de PBMC estimulado por alérgenos (abedul) de cuatro pacientes alérgicos al abedul (A, B, C, D) con rinitis alérgica. Como control negativo se utilizó monosacárido acetilado trivalente codificado como CM-C4-2011. La estructura química de CM-C4-2011 se muestra en la Figura 7c. Las PBMC se aislaron y cultivaron como se ha descrito anteriormente. Se utilizó extracto de alérgeno completo de abedul a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y CM-C8-2010 a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. Los cultivos se incubaron durante 72 horas. Tras la estimulación, se midió la producción de IL-5 con kits LINCoplex™ utilizando instrumental Luminex100™. En los cultivos de todos los pacientes con rinitis, CM-C8-2010 suprimió eficazmente la respuesta de IL-5 inducida por alérgenos de abedul, mientras que no se observó supresión con CM-C4-2011 (Fig. 6).

Ejemplo 3 Comparación de compuestos manooligosacárido con conexión β -1,2 sintéticos con coadyuvantes de la técnica anterior en la supresión de la respuesta inmunitaria inducida por alérgenos

El efecto de la molécula sintética de acuerdo con el compuesto de fórmula (IV) de la invención codificado como CM-C8-2010 sobre la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, las principales citoquinas de tipo Th2 que promueven la inflamación alérgica, fue estudiado en un cultivo de PBMC estimulado con alérgeno (abedul) de 26 pacientes alérgicos al abedul con rinitis alérgica. El efecto se comparó con el del monofosforil lípido A 3-desacilado (MPL), el derivado no tóxico del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* (LPS), y la secuencia de ADN bacteriano inmunoestimuladora (CpG-ODN-1). Estas moléculas han sido sometidas a ensayo clínicamente de manera satisfactoria como coadyuvantes en la inmunoterapia con alérgenos. Se utilizó otra secuencia de ADN bacteriano (CpG-ODN-2) sin actividad inmunoestimuladora como control negativo. Las PBMC se recogieron durante una estación con gran cantidad de polen de abedul, se aislaron y se cultivaron como se ha descrito anteriormente. Se utilizó extracto de alérgeno completo de abedul a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y CM-C8-2010 a concentraciones de 200 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizaron CpG-ODN-1 y CpG-ODN-2 a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ y MPL a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ basándose en experimentos publicados anteriormente. Los cultivos se incubaron durante 24 horas. Tras la estimulación, se midieron las producciones de IL-4, IL-5 e IL-13 con kits LINCoplex™ utilizando instrumental Luminex100™. Para el análisis sólo se incluyeron los cultivos con fuertes respuestas de citoquinas inducidas. CM-C8-2010 suprimió las respuestas de IL-4, IL-5 e IL-13 inducidas por alérgenos de abedul de manera más eficaz que CpG-ODN-1 o MPL (Tabla 1). El efecto supresor se observó en mayor número de sujetos que con CpG-ODN-1 o MPL.

Tabla 1: Porcentaje medio (DT) de respuesta de citoquinas inducida por Abedul

	IL-4	IL-5	IL-13
Número de sujetos	19	15	17
CM-C8-2010; 200 $\mu\text{g/mL}$	78,6 (24,3)	70,6 (22,6)	58,5 (48,0)
CM-C8-2010; 20 $\mu\text{g/mL}$	90,8 (22,7)	86,0 (25,9)	85,9 (97,5)
CpG-ODN-1; 5 $\mu\text{g/mL}$	139,8 (71,8)	75,4 (29,7)	73,3 (80,3)
CpG-ODN-2; 5 $\mu\text{g/mL}$	99,5 (35,6)	105,8 (38,8)	92,7 (108,5)
MPL; 10 $\mu\text{g/mL}$	88,0 (23,8)	91,3 (20,6)	61,6 (68,3)

Los resultados muestran que el compuesto de acuerdo con la presente invención proporciona una mejor supresión en comparación con los coadyuvantes de la técnica anterior. En este experimento los resultados mostraron adicionalmente una menor variación entre pacientes para el compuesto de acuerdo con la presente invención que para los compuestos de la técnica anterior. Las reacciones alérgicas dependen de varias respuestas y se ven afectadas por numerosos factores reguladores. Por lo tanto, cuando CpG-ODN-1 proporciona una respuesta leve con respecto a IL-5 e IL-13, la respuesta a IL-4 es deficiente. En comparación con esto, el resultado obtenido con un compuesto de la invención es muy prometedor, ya que tales características pronostican una mejor expectativa de terapia y adecuación a la mayor parte de los pacientes.

Ejemplo 4 Inducción de citoquinas por oligosacárido sintético

Se sometió a ensayo el oligosacárido sintético codificado como RP-I-82 para determinar la producción de citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF e IFN- γ en las muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres sujetos. Las PBMC se estimularon añadiendo oligosacárido solubilizado en suspensión de cultivo celular. El oligosacárido oligovalente sintético con conexión β -1,2 utilizado en este ejemplo era una molécula de acuerdo con el compuesto de fórmula (IV) de la invención (codificado como RP-I-82). El esquema de síntesis y la estructura química del RP-I-82 se muestran en la Figura 4 (compuesto 9). Un control positivo fue manano de *Candida albicans* (CAM) hidrolizado con ácido. Las respuestas de citoquinas de las PBMC se detectaron 24 horas después del comienzo de la estimulación midiendo la secreción de citoquinas con kits LINCoplex™ de citoquina humana de alta sensibilidad (LINCO Research, St. Charles, MO, EE.UU.) utilizando instrumental Luminex¹⁰⁰™. Los análisis se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante empleando la tecnología Luminex. El oligosacárido sometido a ensayo era un fuerte inductor de IL-10 y TNF y un inductor moderado de IFN- γ (Tabla 2). No se observó producción de IL-4, IL-5 e IL-13 en absoluto.

Tabla 2. Producción de citoquinas (pg/mL), media (DT).

	IL-4	IL-5	IL-13	IL-10	IFN- γ	TNF
Sin estímulo	2,0 (0,6)	0,0 (0,0)	0,5 (0,0)	7,7 (4,4)	1,3 (0,4)	18 (14)
RP-I-82; 20 μ g/mL	2,6 (0,8)	0,1 (0,2)	0,6 (0,2)	110(109)	10 (15)	52 (26)
RP-I-82; 200 μ g/mL	2,7 (0,2)	0,2 (0,2)	0,5 (0,0)	843 (253)	18 (25)	295 (146)
CAM; 200 μ g/mL	61 (36)	20 (2,2)	48 (8,4)	193 (11)	727 (901)	156 (158)

A partir de estos resultados, se puede concluir que el compuesto de acuerdo con la presente invención (RP-I-82) proporciona una inducción específica de citoquinas de la producción de IL-10, IFN- γ y TNF en suspensión de cultivo celular. Para IL-10 y TNF ésta fue considerablemente mayor que para el control, manano de *Candida albicans* (CAM). También es digno de mención que dicho control, CAM indujo todas las citoquinas en comparación con la muestra del blanco (sin estimulación), mientras que el compuesto de acuerdo con la presente invención (RP-I-82) proporcionó una inducción selectiva, un papel importante en la regulación a la baja de las respuestas de tipo Th2 hacia los alérgenos.

Referencias

Alpe M, Oscarson S, Svahnberg P (2003) Synthesis of cryptococcus neoformans capsular polysaccharide structures. IV. Construction of thioglycoside donor blocks and their subsequent assembly. J Carbohydr Chem 22:565-577.

Ballell L, van Scherpenzeel M, Buchalova K, Liskamp RMJ, Pieters RJ (2006) A new chemical probe for the detection of the cancer-linked lectin-3. Org Biomol Chem 4:4387-4394.

Bentz EL, Gibson H, Hudson C, Moloney MG, Seldon, DA, Wearmouth ES (2006) Aryldiazirine-modified pyroglutamates: Photoaffinity labels for glutamate. Synlett 247-250.

Bocks K, Pedersen C (1974) A study of ¹³CH coupling constants in hexopyranoses. J Chem Soc Perkin Trans 2, 293-297.

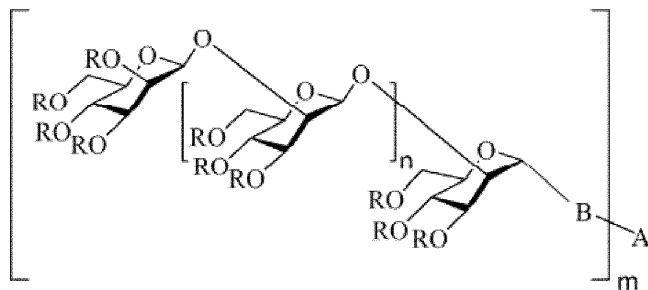
Codée JDC, Hossain LH, Seeberger PH (2005) Efficient installation of β -manosides using a dehydrative coupling strategy. Org Lett 7:3251-3254.

Crich D, Li H (2000) Direct stereoselective synthesis of β -thiomanosides. J Org Chem 65:801-805.

- Crich D, Smith MJ (2001) 1-Benzenesulfinyl piperidine/trifluoromethanesulfonic anhydride: A potent combination of shelf-stable reagents for the low-temperature conversion of thioglycosides to glycosyl triflates and for the formation of diverse glycosidic linkages. *J Am Chem Soc* 123:9015-9020.
- 5 Crich D, Li H (2002) Synthesis of the Salmonella Type E1 core trisaccharide as a probe for the generality of 1-(benzenesulfinyl)piperidine/triflic anhydride combination for glycosidic bond formation from thioglycosides. *J Org Chem* 67:4640-4646.
- Crich D, Jayalath P, Hutton KT (2006) Enhanced diastereoselectivity in β -manopyranosylation through the use of sterically minimal propargyl ether protecting groups. *J Org Chem* 71:3064-3070.
- 10 de Paz JL, Martín-Lomas M (2005) Synthesis and biological evaluation of a heparin-like hexasaccharide with the structural motifs for binding to FGF and FGFR. *Eur J Org Chem* 9:1849-1858.
- The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee (1998) Worldwide variations in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema. *Lancet* 351:1225-32.
- 15 Maezaki N, Kojima N, Sakamoto A, Tominaga H, Iwata C, Tanaka T, Monden M, Damdinsuren B, Nakamori S (2003) Total Synthesis of the antitumor acetogenin Mosin B: Desymmetrization approach to the stereodivergent synthesis of threo/trans/erythro-type Acetogenins. *Chem Eur J* 9:389-399.
- Matsuda H, Zhang S, Holmes AE, Krane S, Itagaki Y, Nakanishi K, Nesnas N (2006) Synthesis of an 11-cis-locked biotinylated retinoid for sequestering 11-cis-retinoid binding proteins. *Can J Chem* 84:1363-1370.
- 20 Mourer M, Hapiot F, Tilloy S, Monflier E, Menuel S (2008) Easily accessible mono- and polytopic β -cyclodextrin hosts by click chemistry. *Eur J Org Chem* 5723-5730.
- Ohlsson J, Magnusson G (2000) Galabiosyl donors; efficient synthesis from 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- β -D-galactopyranose. *Carbohydr Res* 329:49.
- Pfaendler HR, Weimar V (1996) Synthesis of racemic ethanolamine plasmalogen. *Synthesis* 1345-1349.
- 25 Pérez-Balderas F, Hernández-Mateo F, Santoyo-González F (2005) Synthesis of multivalent neoglycoconjugates by 1,3 dipolar cycloaddition of nitrile oxides and alkynes and evaluation of their lectin-binding affinities. *Tetrahedron* 61:9338-9348.
- Soderquist JA, Brown HC (1980) Hydroboration. 56. Convenient and regiospecific route to functionalized organosilanes through the hydroboration of alkenylsilanes. *J Org Chem* 45:3571-3578.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto manooligosacárido con conexión β -1,2 oligo- o multivalente inmunoestimulador de fórmula (I)



(I)

5 en donde

- n es de 0 a 6, m es de 3 a 5 y en donde cada R se selecciona independientemente entre acetilo (COCH_3) e hidrógeno (H), y en donde los manooligosacáridos con conexión β -1,2 están con un grupo conector (B) conectado a una unidad núcleo central o portador (A),

- los manooligosacáridos con conexión β -1,2 están conectados mediante alfa al grupo conector (B);

10 - el grupo conector (B) consiste en una estructura



en donde

15 X es cero o representa el grupo $-\text{CH}_2-$, o un átomo de O, S o N;

Y' representa un radical triazol, que está unido a X a partir del nitrógeno 1 de dicho triazol con el grupo $-(\text{CH}_2)_p-$, en donde p es de 1 a 6, y que está unido a Z a partir del carbono 4 de dicho grupo triazol con el grupo $-(\text{CH}_2)_q-$, en donde q es de 1 a 6, y los manooligosacáridos con conexión β -1,2 están conectados mediante alfa al grupo conector (B);

20 Z es cero o representa un átomo seleccionado entre O, S o N; y

- la unidad núcleo o portador (A) es un radical alifático o aromático no sustituido o sustituido.

2. El compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

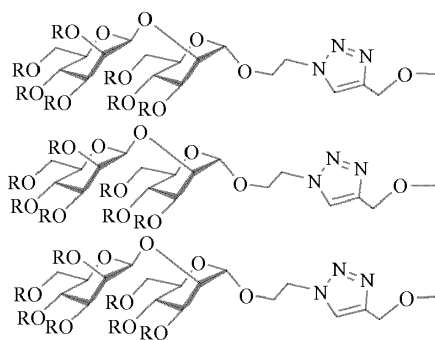
X es O,

Y' representa un radical triazol, que está unido a X a partir del nitrógeno 1 de dicho triazol con el grupo

25 $-(\text{CH}_2)_p-$, en donde p es de 1 a 3; y que está unido a Z a partir del carbono 4 con el grupo $-(\text{CH}_2)_q-$, en donde q es 1 ó 2, y

Z es O.

3. El compuesto inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el compuesto está de acuerdo con la fórmula (II)



(II)

en donde cada R se selecciona independientemente entre un grupo acetilo (COCH_3), hidrógeno (H), trifluoroacetilo (COCF_3) o sulfonato u otro grupo éster.

4. El compuesto inmunoestimulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cada R es acetilo (COCH_3).
5. El compuesto inmunoestimulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como medicamento.
6. El compuesto inmunoestimulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como coadyuvante de una vacuna.
7. El compuesto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o cualquier combinación de las mismas, para su uso en el tratamiento de una afección que se puede prevenir o tratar induciendo una respuesta inmunitaria de tipo Treg y/o Th1, y/o inhibiendo una de tipo Th2.
8. El compuesto inmunoestimulador para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la afección es la alergia atópica inmediata de tipo I.
9. El compuesto inmunoestimulador para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde la afección se selecciona del grupo que consiste en
 - a) síndrome de eccema atópico/dermatitis (AEDS),
 - b) asma alérgica,
 - c) rinitis alérgica
 - d) urticaria alérgica,
 - e) alergia alimentaria,
 - f) alergia al veneno, y
 - g) rinoconjuntivitis alérgica.
10. El compuesto inmunoestimulador para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la afección es una enfermedad infecciosa.
11. La composición inmunoestimuladora que comprende al menos uno de los compuestos inmunoestimuladores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores o sus mezclas, y un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en portadores transdérmicos, portadores transmucosales, portadores orales, portadores parenterales, portadores para formulaciones de depósito, y portadores para formulaciones de liberación prolongada.
12. La composición inmunoestimuladora de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el portador es un portador transmucosal para administración sublingual y/o bucal.
13. La composición inmunoestimuladora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde ésta comprende adicionalmente una preparación alérgica para inmunoterapia con alérgenos específicos; y/o un medicamento adicional para la alergia o el asma.
14. La composición inmunoestimuladora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 anteriores, en donde ésta comprende adicionalmente un antígeno específico de microbios para la vacunación contra enfermedades

infecciosas; y/o un agente antimicrobiano.

15. El compuesto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o cualquier combinación de las mismas, para su uso como un aditivo alimentario o una preparación nutricional.

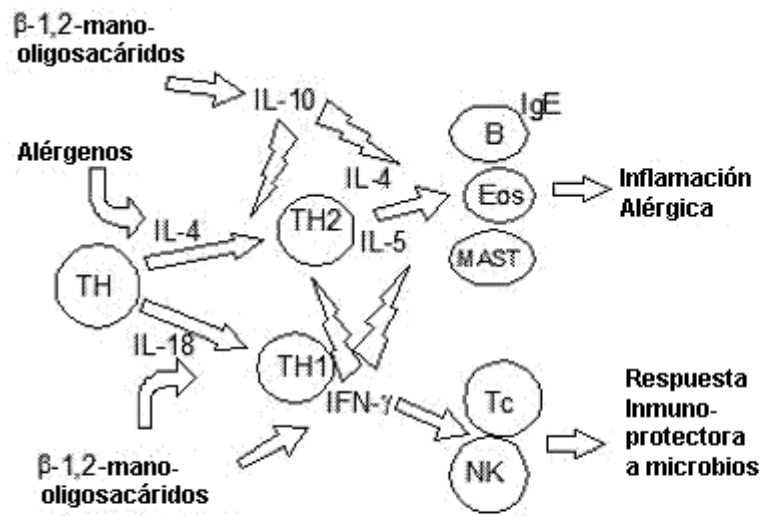


Fig. 1

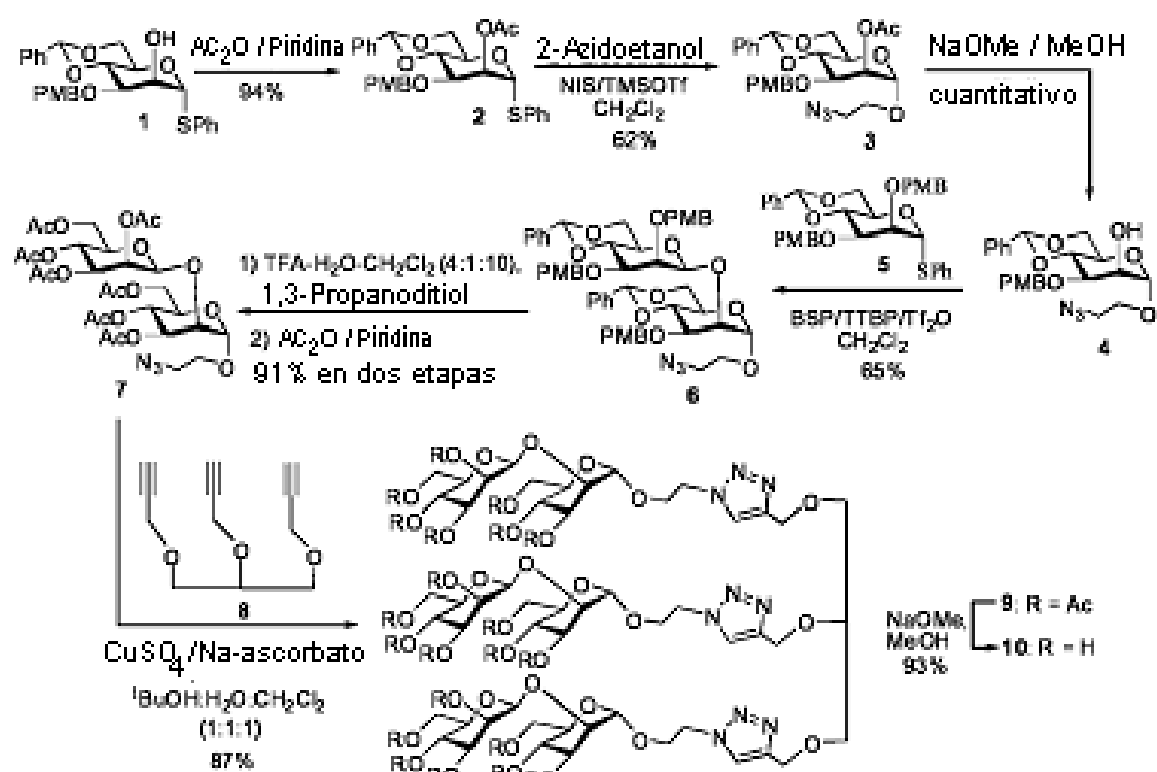


Fig.2

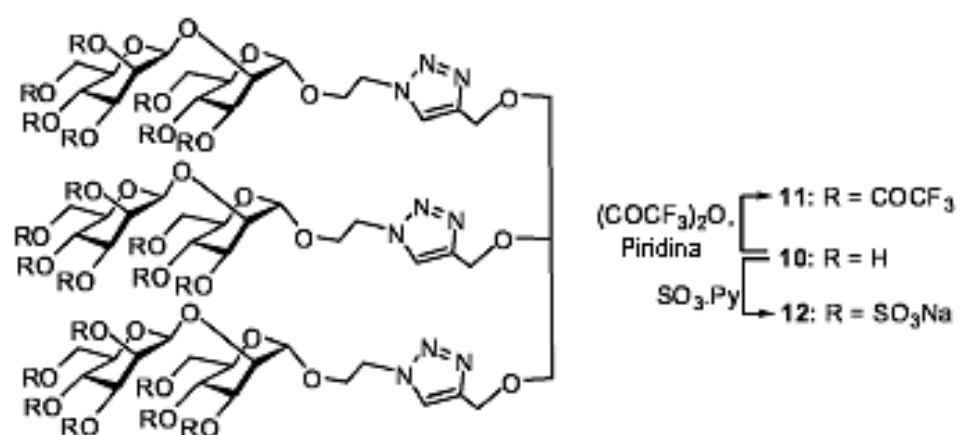


Fig. 3

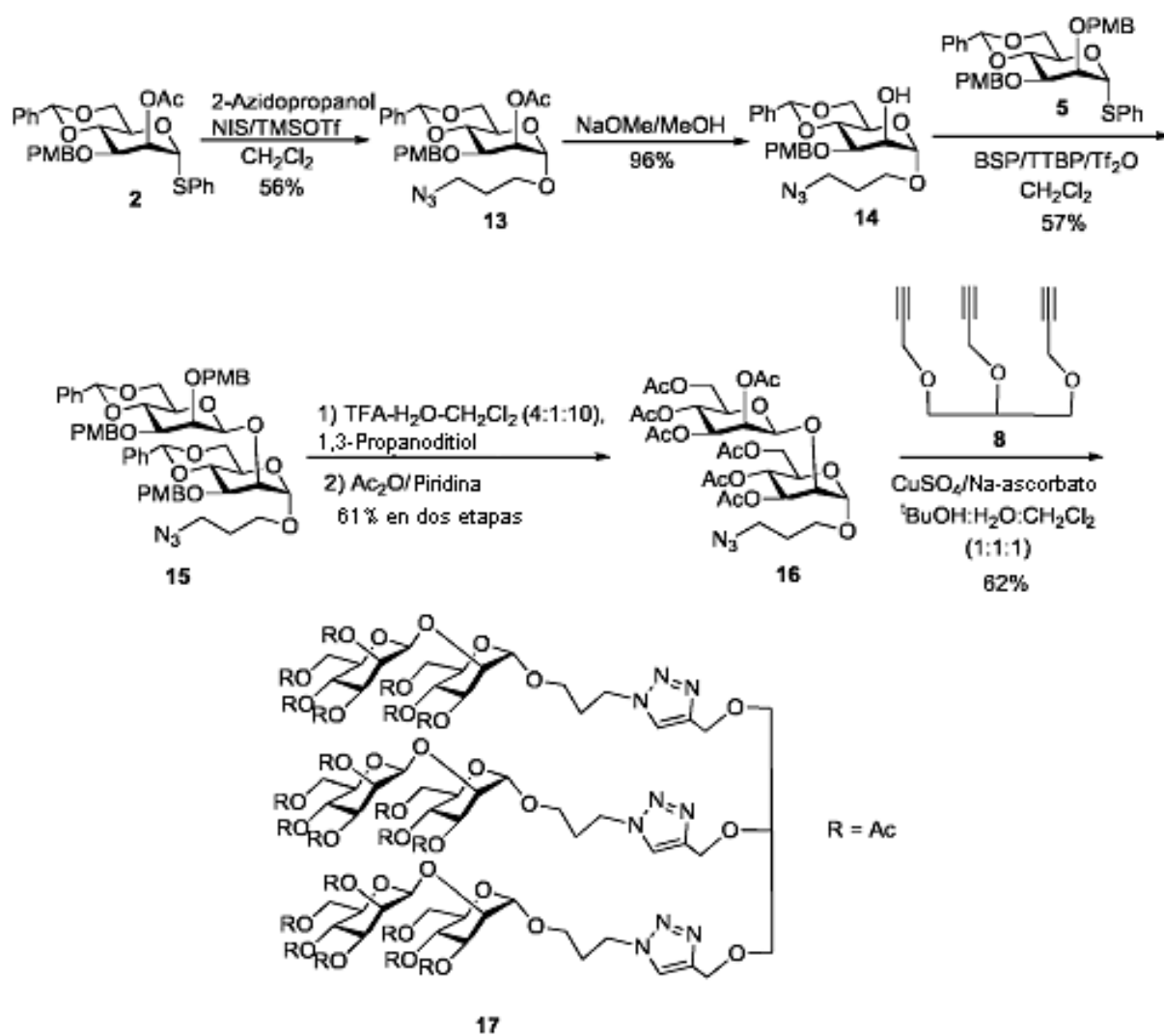


Fig. 4.

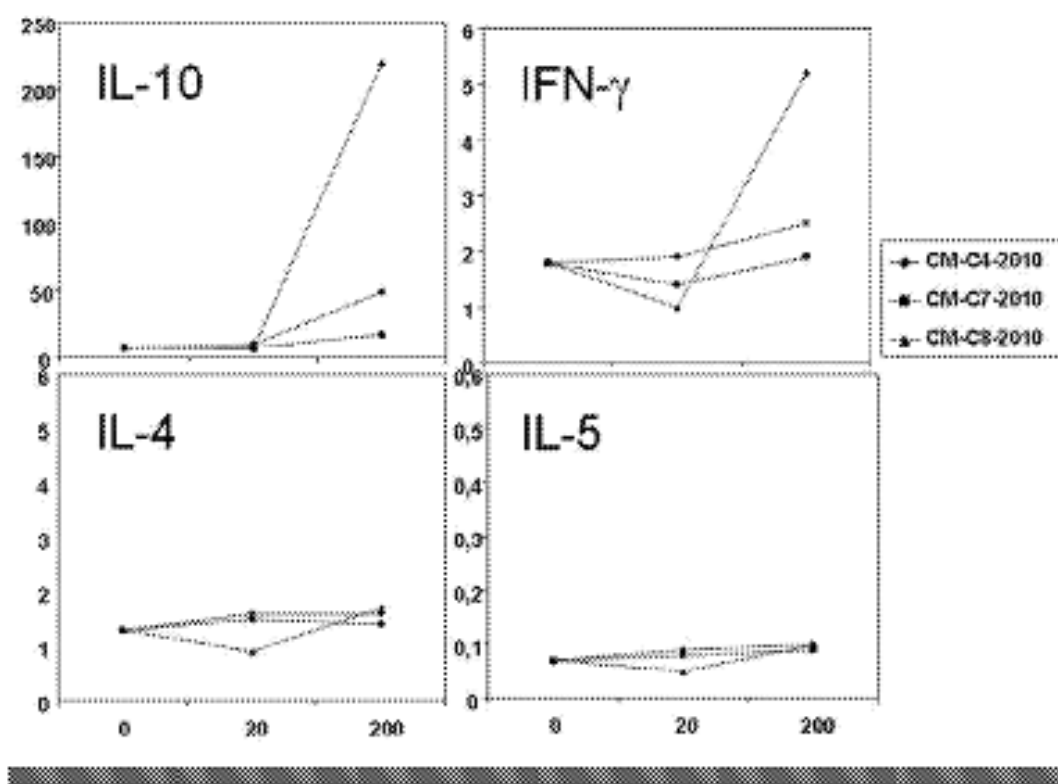


Fig. 5

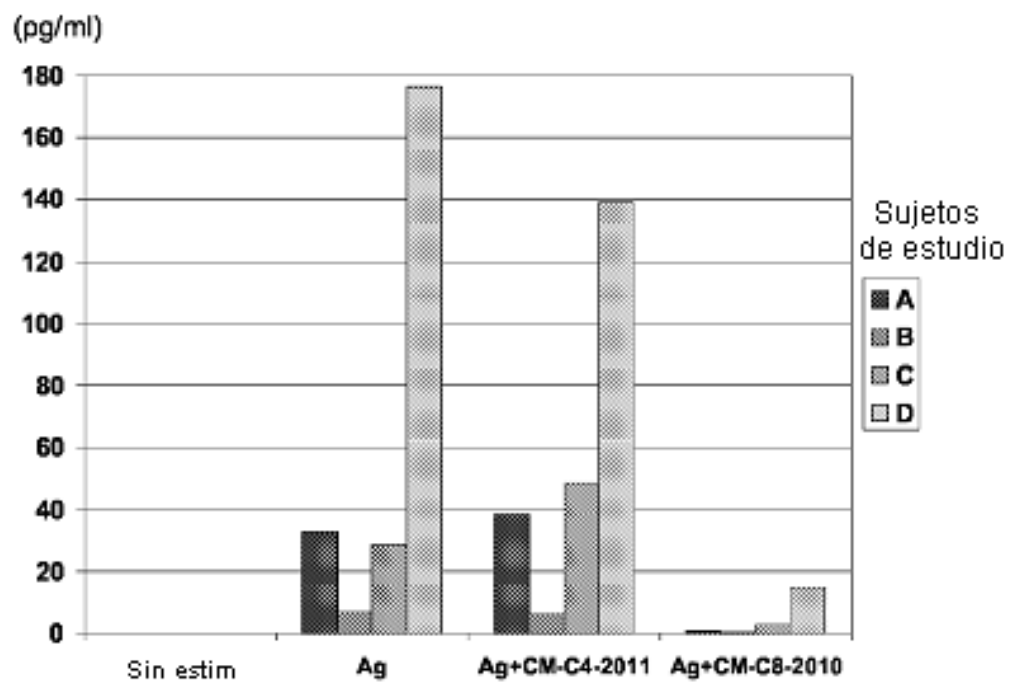
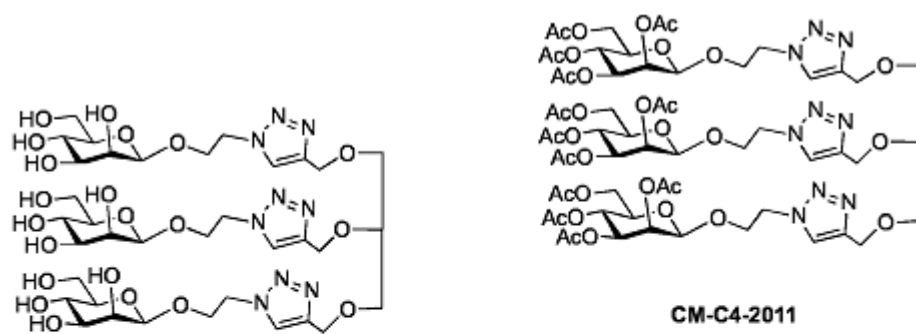


Fig. 6

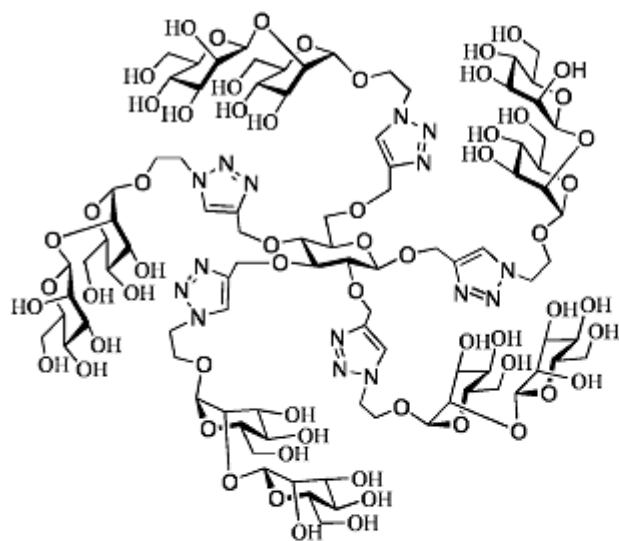


CM-C4-2010

CM-C4-2011

Fig. 7c

Fig. 7a



CM-C7-2010

Fig. 7b