

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 454**

51 Int. Cl.:

**C07H 3/06** (2006.01)

**C07H 5/06** (2006.01)

**C07H 13/04** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/AU2009/001314**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10037180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09817108 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2421878**

54 Título: **Conjugados de oligosacárido aniónico**

30 Prioridad:

**03.10.2008 AU 2008905160**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.09.2017**

73 Titular/es:

**GLYCAN BIOSCIENCES LLC (100.0%)  
2005 Market Street, Suite 2030  
Philadelphia, PA 19103, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 634 454 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

Conjugados de oligosacárido aniónico

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere a conjugados de oligosacárido aniónico que se pueden usar para imitar la estructura y/o actividad de las moléculas bioactivas aniónicas conocidas como glucosaminogluanos (GAG). La invención también se refiere al uso de conjugados de oligosacárido aniónico para sondear las propiedades de unión de los GAG y desarrollar nuevos agentes biológicamente activos mejorados. La invención también se refiere a métodos para la preparación de los conjugados de oligosacárido aniónico. Los conjugados de oligosacárido aniónico de este tipo son útiles en la profilaxis y/o tratamiento de patologías y en particular trastornos respiratorios inflamatorios.

## 15 Antecedentes de la invención

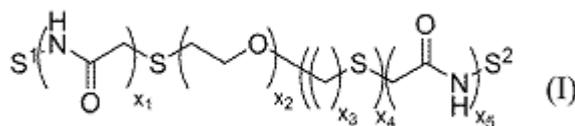
Se continúan usando, y desarrollando, compuestos a base de sacáridos aniónicos naturales y sintéticos, para su uso como agentes terapéuticos. Los ejemplos de los compuestos de este tipo se desvelan, por ejemplo, en el documento WO 2006/017726 A2 o en el documento EP 0 771 815 A1. Un ejemplo bien conocido de un compuesto de este tipo es el producto natural heparina que se ha usado clínicamente durante más de 80 años como un anticoagulante. La heparina ha experimentado dos generaciones de mejoras dando como resultado productos con una selectividad y/o especificidad más elevada para la diana. El primero fue un método semisintético que generaba una heparina de bajo peso molecular que presentaba una especificidad de acción más elevada. El segundo enfoque implicaba a un pentasacárido sintético que era selectivo para la proteína diana. El enfoque sintético, sin embargo, consistía en aproximadamente 40 etapas químicas, resaltando la dificultad técnica asociada con la síntesis de los compuestos de este tipo.

Un enfoque para superar los desafíos planteados por la síntesis de heparina, y los GAG más ampliamente, ha sido el direccionamiento hacia *miméticos* de GAG. Una clase de miméticos de este tipo son los homo-oligosacáridos naturales sulfatados semisintéticos. Sin embargo, existe una desigualdad entre el tamaño pequeño de los oligosacáridos a los que se puede acceder fácilmente a partir de fuentes naturales y los oligo- y polisacáridos de mayor tamaño grandes que producen actividad en muchos sistemas biológicos. En particular, el acceso a los oligosacáridos que comprenden 6 o más monosacáridos, a la vez que se mantienen los objetivos de diversidad estructural y bajo coste, es especialmente difícil.

Existe una necesidad continua de producir miméticos de GAG que presenten un alto grado de selectividad y/o especificidad, y que se puedan producir mediante métodos rentables, sencillos.

Sumario de la invención

40 En un aspecto la invención proporciona un conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):



en la que:

- 45 S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;  
 x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;  
 x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;  
 x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;  
 50 x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y  
 x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4.

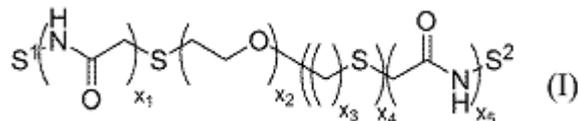
Los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención tienen una diversidad estructural sustancial y se pueden producir de forma sencilla y eficaz. La longitud del conector generalmente flexible entre los oligosacáridos aniónicos se puede adaptar para imitar y/o determinar relaciones espaciales entre partes de los GAG que interactúan con una diana molecular dada, en consecuencia a su vez conduce a la producción de miméticos de GAG que poseen un alto grado de selectividad y/o especificidad.

En algunas realizaciones x<sub>1</sub> y/o x<sub>5</sub> son 1 o 2, preferentemente 2. En algunas realizaciones x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 4. En algunas realizaciones x<sub>3</sub> es un número entero de 2 a 6, preferentemente 2. En algunas realizaciones x<sub>4</sub> es 1. En algunas realizaciones S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> se seleccionan independientemente entre maltotriosa,

maltotetraosa, maltopentaosa, xilotetraosa, xilopentaosa, quitotetraosa y quitopentaosa cada uno de los cuales comprende al menos un sustituyente aniónico tal como un sustituyente sulfato o fosfato.

En otro aspecto la invención proporciona un método para preparar un oligosacárido aniónico de fórmula (I):

5



en la que:

- 10 S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;  
 x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;  
 x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;  
 x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;  
 x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y  
 15 x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4,

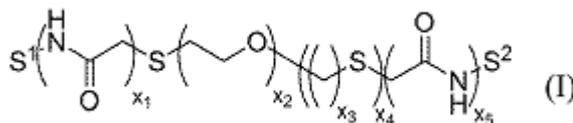
método que comprende las etapas de:

- 20 a) transformar cada uno de los oligosacáridos en oligosacáridos aniónicos; y  
 b) conjugar los oligosacáridos;

en el que las etapas a) y b) se pueden realizar en cualquier orden.

En otro aspecto la invención proporciona el uso de un oligosacárido aniónico de fórmula (I):

25



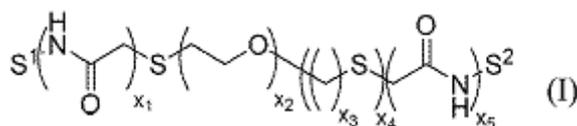
en la que:

- 30 S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;  
 x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;  
 x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;  
 x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;  
 x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y  
 35 x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4,

en la profilaxis y/o tratamiento de patologías, en particular trastornos respiratorios inflamatorios.

En otro aspecto la invención proporciona el uso de un oligosacárido aniónico de fórmula (I):

40



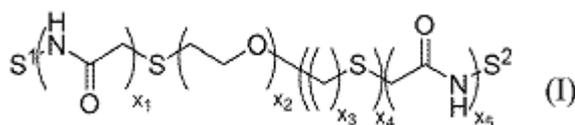
en la que:

- 45 S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;  
 x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;  
 x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;  
 x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;  
 x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y  
 50 x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4,

en un ensayo o identificación sistemática.

En otro aspecto la invención proporciona un ensayo o identificación sistemática para determinar el efecto biológico de uno o más conjugados de oligosacárido aniónico, ensayo que comprende las etapas de:

- 5 a) poner en contacto un ligando, célula o animal con uno o más conjugados de oligosacárido aniónico teniendo cada uno independientemente la siguiente fórmula (I):



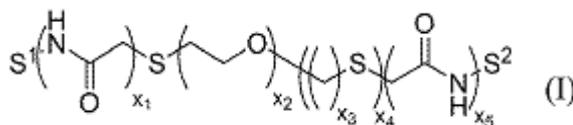
en la que:

- 10 S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;  
 x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;  
 x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;  
 x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;  
 15 x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y  
 x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4;

y

- 20 b) cuantificar un efecto del uno o más conjugados de oligosacárido aniónico en el ligando, célula o animal.

En otro aspecto la invención proporciona un método para modular la actividad de un ligando que comprende poner en contacto el ligando con un conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):



en la que:

- 25 S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;  
 x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;  
 30 x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;  
 x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;  
 x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y  
 x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4.

35 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el espectro de MALDI-MS del polisulfato de N'-Fmoc-1-N-glicinamidomaltotriósido usando la técnica de formación de complejos con el péptido (RG)<sub>19</sub>R. La masa del pico principal corresponde al complejo (5810.51) menos el ion peptídico (4227.57) da 1582.94 para el glucoconjugado sulfatado (calc. para 10 O-sulfatos es 1583.38).

La Figura 2 muestra el perfil de elución para preparación mediante HPLC preparativa de derivados de Fmoc de malto-oligosacáridos (preparados a partir de "jarabe Pentrup").

La Figura 3 muestra los efectos de 5 mg/kg de compuestos en leucocitos en fluido de lavado nasal recogido 8 horas después de estimulación en un modelo de rinitis alérgica en cobayas. Los compuestos son, C1: pentosano, C2: (Maltopentaosa)-(Et<sub>2</sub>)-(Maltopentaosa) y C3: (Maltopentaosa)-Et<sub>4</sub>-(Maltopentaosa).

La Figura 4 muestra los efectos de budesonida y el conjugado de oligosacárido aniónico a diferentes dosis en el contenido de proteína total aumentada por antígeno en fluido BAL (mg/ml) a partir de cobayas alérgicos/asmáticos.

50 Bud = Budesónida; D2 = Conjugado de oligosacárido aniónico ID 9; Concentraciones del fármaco 0,1 y 2,5 mg/kg.

\*\* significativamente diferente a P < 0,01 a partir del control positivo

\* significativamente diferente a P < 0,05 a partir del control positivo

++ significativamente diferente a partir del control negativo

La Figura 5 muestra los efectos de budesonida y el conjugado de oligosacárido aniónico a diferentes dosis en el influjo total de leucocitos aumentado por antígeno en fluido BAL ( $\times 10^7/\text{ml}$ ) a partir de cobayas alérgicos/asmáticos.

5 Bud = Budesonida; D2 = Conjugado de oligosacárido aniónico ID 9; Concentraciones del fármaco 0,1 y 2,5 mg/kg.  
 \* significativamente diferente a  $P < 0,01$  a partir del control positivo  
 \* significativamente diferente a  $P < 0,05$  a partir del control positivo  
 ++ significativamente diferente a partir del control negativo

10 La Figura 6 muestra los efectos de budesonida y el conjugado de oligosacárido aniónico a diferentes dosis en el influjo de eosinófilos y neutrófilos aumentado por antígeno en fluido BAL ( $\times 10^7/\text{ml}$ )

15 Bud = Budesonida; D2 = Conjugado de oligosacárido aniónico ID 9; Concentraciones del fármaco 0,1 y 2,5 mg/kg.  
 \*\*\* significativamente diferente a  $P < 0,001$  a partir del control positivo.  
 +++ Significativamente diferente a  $P < 0,001$ ; ++ Significativamente diferente a  $P < 0,01$  y + significativamente diferente a  $P < 0,05$  a partir del control negativo.

## 20 Descripción detallada de la invención

Debe de quedar claro que el alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En la presente descripción cualquier divulgación que se encuentre fuera del alcance de dichas reivindicaciones solamente tiene fines ilustrativos.

25 Como se usa en el presente documento, el término "aniónico" describe la carga negativa neta de un material. Se entenderá que un material dado con carga negativa puede tener uno o más contraiones o con carga positiva asociados con el mismo, o viceversa. En solución, un material con carga negativa se podría disociar a partir de uno o más contraiones con carga positiva que está asociado con el estado sólido. Como se usa en el presente documento, el término "aniónico" se usa para describir una propiedad de ese material y no el complejo global con uno o más contraiones que por lo general harán que el complejo sea neutro. Se entiende que ciertos grupos funcionales tienen carga negativa, neutra o tienen carga positiva a valores de pH variables. Si un material es aniónico se determinará basándose en la suma de estas cargas. Por consiguiente, a un pH dado, si un material tiene un grupo funcional con carga positiva y dos grupos funcionales con carga negativa, entonces el material tiene una carga negativa neta y es aniónico en el sentido en el que el término se usa en el contexto de la presente invención. En realizaciones preferentes, los conjugados de la presente invención tienen una carga negativa neta en solución acuosa a un pH de 5. En realizaciones preferentes, las sales formadas entre los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención y el uno o más contraiones son sales farmacéuticamente aceptables.

40 Los ejemplos de grupos funcionales que transmiten un carácter aniónico en los conjugados de la presente invención son: grupos basados en azufre tales como  $-\text{SO}_2\text{OH}$ ,  $-\text{OSO}_2\text{OH}$ ,  $-\text{OSO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_2\text{H}$  y  $-\text{OSO}_2^-$ ; y grupos basados en fósforo tales como:  $-\text{OPO}_2\text{OH}$ ,  $-\text{OP}(\text{S})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR})_2$ ,  $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR})_2$ ,  $-\text{OP}(\text{O})\text{OHR}$ ,  $-\text{OP}(\text{S})\text{OHR}$ ,  $-\text{OP}(\text{O})\text{OR}_1\text{R}_2$ ,  $-\text{OP}(\text{S})\text{OR}_1\text{R}_2$ ,  $-\text{OP}(\text{S})(\text{OH})(\text{SH})$  y fosfato cíclico. Se entenderá que un número de los grupos funcionales mencionados anteriormente se pueden desprotonar fácilmente y que llegarán a ser aniónicos en solución acuosa a, por ejemplo, un pH de 5. Otros grupos funcionales mostrados anteriormente son neutros (por ejemplo,  $-\text{OSO}_2^-$  y  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR})_2$ ) y en consecuencia se pueden usar en combinación con grupos funcionales aniónicos para controlar el grado de carácter aniónico presente dentro del conjugado.

50 Los derivados aniónicos preferentes de grupos hidroxilo incluyen grupos sulfato y fosfato. En particular, se entenderá que en solución acuosa a pH 5, los grupos sulfato y fosfato son grupos aniónicos como se define en el presente documento.

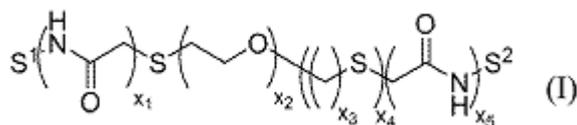
55 Como se usa en el presente documento el término oligosacárido se refiere a un carbohidrato que puede contener cualquier número de unidades de monosacárido, tal como de 2 a 10 unidades de monosacárido, conectadas mediante enlaces alfa- y/o beta-glucosídicos. Por ejemplo el oligosacárido puede comprender entre 2 y 6 unidades de monosacárido.

Los ejemplos de monosacáridos son eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa.

60 Los ejemplos de oligosacáridos que comprenden 2 o más monosacáridos son lactosa, sacarosa, amilosa, los celo-oligosacáridos, los malto-oligosacáridos [tales como maltosa, maltotriosa ( $\text{O}-\alpha\text{-D-glucopiranosil}-(1\rightarrow4)\text{-O}-\alpha\text{-D-glucopiranosil}-(1\rightarrow4)\text{-D-glucopiranosil}$ ), maltotetraosa ( $\text{O}-\alpha\text{-D-glucopiranosil}-\{(1\rightarrow4)\text{-O}-\alpha\text{-D-glucopiranosil}\}_2\text{-(1}\rightarrow4)\text{-D-glucopiranosil}$ ) y maltopentaosa ( $\text{O}-\alpha\text{-D-glucopiranosil}-(1\rightarrow4)\text{-O}-\alpha\text{-D-glucopiranosil}\}_3\text{-(1}\rightarrow4)\text{-D-glucopiranosil}$ )], los dextro-oligosacáridos, los quito-oligosacáridos, los xilo-oligosacáridos, mano-oligosacáridos (tal como los producidos por la hidrólisis de mananos, incluyendo mananos de levadura) y los  $\beta$ 1,3-gluco-oligosacáridos.

Los oligosacáridos preferentes para su uso en la presente invención son los malto-oligosacáridos (tales como maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa), los quito-oligosacáridos (tales como quitotetraosa y quitopentaosa) y los xilo-oligosacáridos (tales como xilotetraosa y xilopentaosa).

5 En un aspecto la invención proporciona un conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):

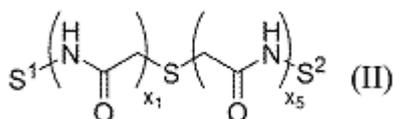


en la que:

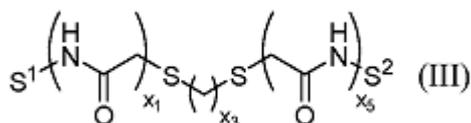
- 10  $S^1$  y  $S^2$  cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;  
 $x_1$  representa un número entero de 1 a 4;  
 $x_2$  representa un número entero de 0 a 11;  
 $x_3$  representa un número entero de 0 a 10;  
15  $x_4$  representa 0 o 1; y  
 $x_5$  representa un número entero de 1 a 4.

Los oligosacáridos aniónicos ( $S^1$  y  $S^2$ ) de fórmula (I) se conjugan de forma covalente entre sí a través de al menos un átomo de azufre que forma parte de esa porción del conjugado que está entre los oligosacáridos aniónicos que en el presente documento se denomina "conector". En los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención, el resto de conector también se puede denominar porción de aglucona. El conector puede influir en el tamaño, flexibilidad o rigidez, hidrofilia e hidrofobia del conjugado de oligosacárido aniónico. Por consiguiente, el conector se elige preferentemente para maximizar un efecto biológico dado. El conocimiento de la relación de estructura-actividad entre el GAG (o los GAG) que se desea imitar y/o congéneres y/o información estructural con respecto a los complejos de ligando-receptor (por ejemplo, a partir de cristalografía de rayos X, RMN) puede influir en la elección del conector. Por lo general el conector no interactúa con el receptor de GAG.

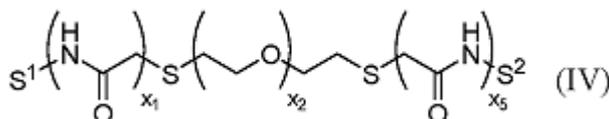
Los conjugados preferentes se pueden representar con las siguientes fórmulas:



30 en la que  $S^1$  y  $S^2$  cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos,  $x_1$  representa un número entero de 1 a 4, y  $x_5$  representa un número entero de 1 a 4;

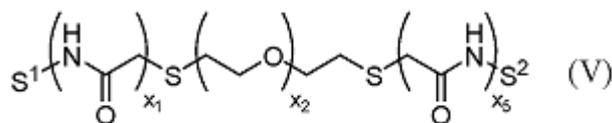


35 en la que  $S^1$  y  $S^2$  cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos,  $x_1$  representa un número entero de 1 a 4,  $x_3$  representa 0 o un número entero de 1 a 10, y  $x_5$  representa un número entero de 1 a 4; y



40 en la que  $S^1$  y  $S^2$  cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos,  $x_1$  representa un número entero de 1 a 4,  $x_2$  representa 0 o un número entero de 1 a 11, y  $x_5$  representa un número entero de 1 a 4.

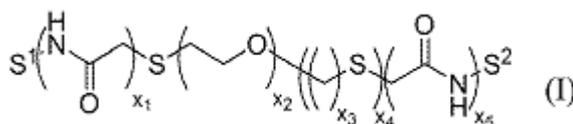
45 Los conjugados aniónicos especialmente preferentes de la presente invención se pueden representar con la siguiente fórmula:



en la que  $S^1$  y  $S^2$  cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos,  $x_1$  y  $x_5$  igual a 2 y  $x_2$  representa 0 o un número entero de 1 a 4.

5

En un aspecto la presente invención proporciona un método para preparar un oligosacárido aniónico de fórmula (I):



10 en la que:

$S^1$  y  $S^2$  cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;

$x_1$  representa un número entero de 1 a 4;

$x_2$  representa un número entero de 0 a 11;

15  $x_3$  representa un número entero de 0 a 10;

$x_4$  representa 0 o 1; y

$x_5$  representa un número entero de 1 a 4,

método que comprende las etapas de:

20

a) transformar cada uno de los oligosacáridos en oligosacáridos aniónicos; y

b) conjugar los oligosacáridos;

en el que las etapas a) y b) se pueden realizar en cualquier orden.

25

En la técnica se conocen métodos para la transformación de un oligosacárido en un oligosacárido aniónico a través de la sulfatación y/o fosforilación de uno o más grupos hidroxilo, incluyendo métodos para la sulfatación selectiva de cualquiera de grupos hidroxilos primarios o hidroxilos secundarios o amino o combinaciones de los mismos. Tal sulfatación y/o fosforilación puede ser de todos los grupos hidroxilo libre o puede ser sulfatación y/o fosforilación parcial de los grupos hidroxilo libre.

30

Aunque la invención contempla la transformación de cada uno de los oligosacáridos en oligosacáridos aniónicos antes y/o después de preparar el conjugado, es preferente hacerlo de este modo *antes* de la formación del conjugado. Una razón para una preferencia de este tipo es ayudar a controlar la homogeneidad del producto final.

35

Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que mediante el acoplamiento de moléculas aniónicas más pequeñas juntas para formar moléculas aniónicas de mayor tamaño, se consigue un control mayor sobre los productos y el grado de homogeneidad. Por ejemplo, la sulfatación de oligosacáridos pequeños (disacáridos a tetrasacáridos), que contienen 3 grupos "sulfatables" por resto, avanza hacia la finalización. Por otro lado, la sulfatación de oligosacáridos de mayor tamaño es un método más difícil, y por lo general se obtiene una mezcla heterogénea de especies subsulfatadas. Se cree que en los sistemas más grandes, el alcance de la heterogeneidad parece que está relacionado con el número, o densidad, de grupos sulfato - cuantos más grupos "sulfatables" están presentes, más heterogénea es la mezcla. Como un ejemplo, de los dos pentasacáridos, Arixtra® y sulfomaltopentaosa, el primero contiene 8 grupos sulfato y se obtiene fácilmente en forma pura, mientras que la maltopentaosa, que tiene 16 grupos sulfatables, se obtiene con una mezcla. Además, en la sulfatación del nonasacárido Trestatina A, el grado medio de sulfatación obtenida es 2,4 de un posible que 3 por sub-unidad (ignorando el extremo reducido), lo que representa igual aproximadamente 22 grupos sulfato/ molécula. Suponiendo que la sulfatación sea un suceso estocástico, y usando la distribución de Poisson para calcular la distribución de moléculas con el número de sulfatos designado, podría parecer que la mezcla contiene moléculas con entre 14 y 27 grupos sulfato. Además, excepto para la molécula per-sulfatada, existe un número muy grande de posibles isómeros para cada especie sulfatada - por ejemplo el número de isómeros para las especies que contienen 22 grupos sulfato es 81.000. Como se puede observar, la sulfatación de oligosacáridos de longitud incluso más discreta (nonasacárido) puede generar mezclas complejas.

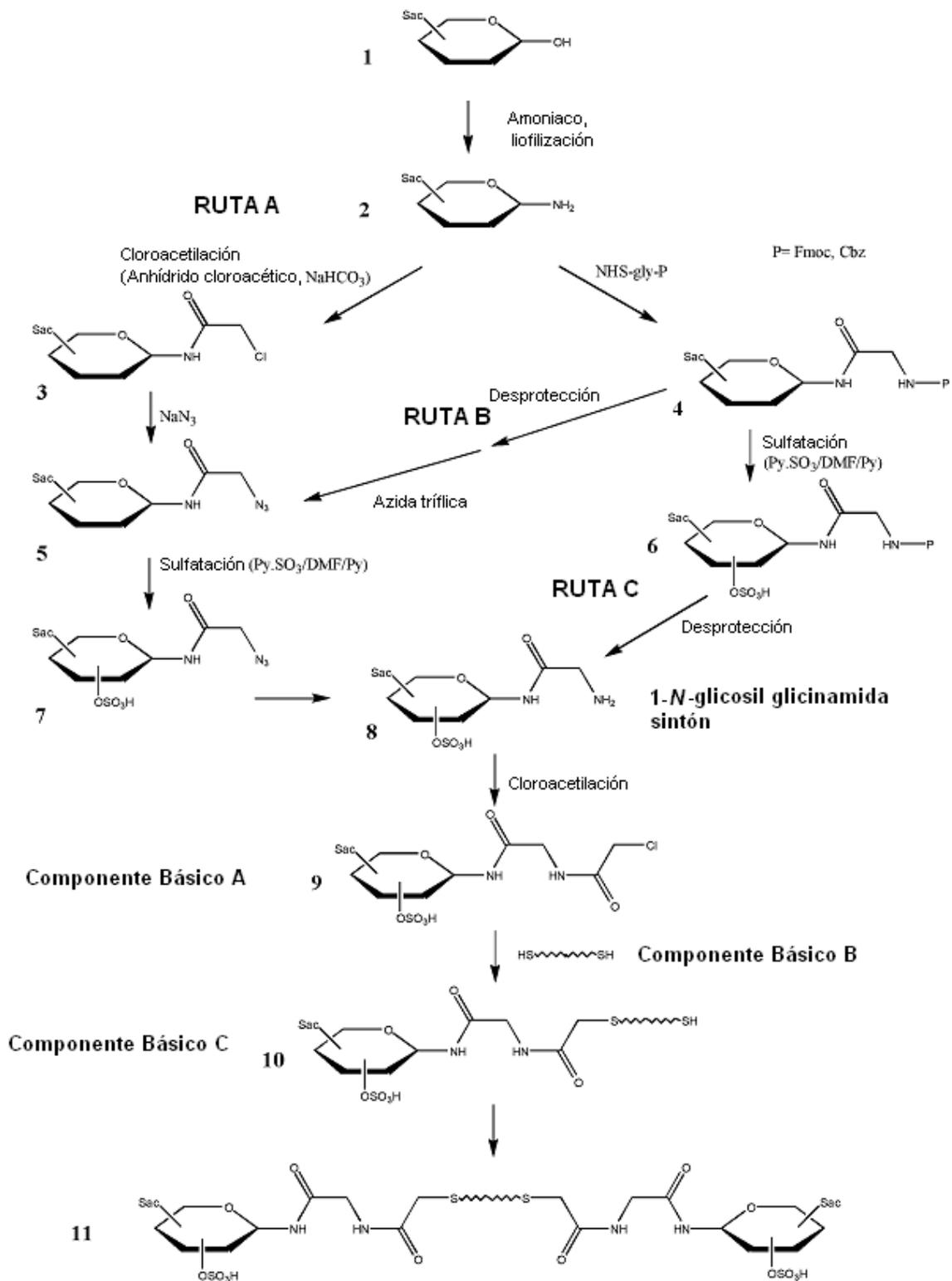
50

Por otro lado la sulfatación de un trisacárido, que puede contener un total de 9 grupos "sulfatables", produce una mezcla que tiene una pureza de un 98 % con respecto al trisacárido persulfatado. El acoplamiento de dos de tales disacáridos trisacáridos sulfatados en conjunto producen un neo-hexasacárido persulfatado (18 grupos sulfato) con

55

una pureza de un 96 %. Además, también se reduce el número de posibles isómeros para las especies subsulfatadas.

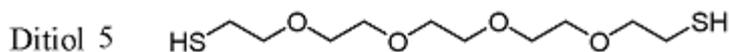
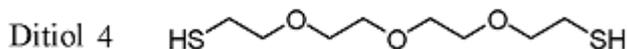
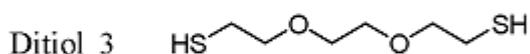
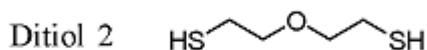
5 El Esquema 1 muestra ejemplos de diferentes rutas de síntesis (Rutas A, B y C) que se pueden tomar para sintetizar los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención. El patrón de sustitución en el anillo de hexosa representativo del oligosacárido que se representa se ha omitido con fines de claridad. El experto en la materia observará que los grupos sulfato protonados que se muestran en las estructuras 6 a 11 representan ejemplos de oligosacáridos aniónicos dado que la expresión se usa en el presente documento debido a la capacidad de los grupos funcionales para desprotonarse fácilmente, por ejemplo en agua a un pH de 5. Como se ha indicado  
10 anteriormente, la transformación de los oligosacáridos en oligosacáridos aniónicos se puede producir antes o después de la conjugación de los oligosacáridos. En este sentido, el Esquema 1 muestra ejemplos de estrategias de síntesis preferentes en las que la sulfatación de los oligosacáridos se produce antes de la conjugación.



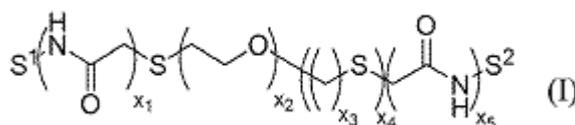
Esquema 1

La etapa de conjugación de los oligosacáridos se puede conseguir usando el enfoque mostrado en el Esquema 1. Por lo general se elegirán oligosacáridos que tengan un extremo reductor libre. La conjugación a través del extremo reductor de cada uno de los oligosacáridos se puede producir después de una aminación inicial del extremo reductor de cada uno de los oligosacáridos. A través de la reacción del grupo amino de las glucosamina producida de este modo con uno o más restos a base de glicina, es posible proporcionar un compuesto intermedio reactivo de

estructura 9, por ejemplo, para el acoplamiento a otro de los oligosacáridos funcionalizados de este tipo. Dos restos a base de glicina útiles son compuestos de glicina con N protegido (por ejemplo Fmoc) y 2-haloacetilo tales como cloruro de 2-cloroacetilo o cloruro de 2-bromoacetilo. El acoplamiento de los dos restos de oligosacárido derivatizado se produce a través de un conector que comprende al menos un átomo de azufre. En el Esquema 1, el Componente Básico B representa un compuesto de ditiol. Sin embargo se entiende que un conector de este tipo solamente es representativo y no excluye conjugados de fórmula (II) del alcance de la presente invención. Los ejemplos específicos del ditiol del Componente Básico B, que puede estar disponible en el mercado, se proporcionan a continuación junto con identificadores para su uso dentro de la memoria descriptiva:



Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" adquiere su significado convencional y de forma específica se refiere al acoplamiento covalente de dos oligosacáridos. Se entenderá que en las estructuras a las que se hace referencia en el presente documento (tal como la fórmula (I)) los oligosacáridos aniónicos  $S^1$  y  $S^2$  están unidos de forma covalente al resto del conjugado. Por consiguiente se observará que  $S^1$  y  $S^2$  son restos monovalentes de oligosacáridos aniónicos. El experto en la materia reconocerá que un acoplamiento de este tipo por lo general se produce como resultado de la pérdida de parte de cada uno de los oligosacáridos con dos se consideran en aislamiento. Por ejemplo, la reacción de aminación representada en el Esquema 1 que transforma el compuesto de oligosacárido 1 en el compuesto de amina 2 se produce con la pérdida del grupo hidroxilo del compuesto 1. Sin embargo, el experto en la materia de forma rutinaria a identificará las porciones del oligosacárido hexosa del conjugado de oligosacárido aniónico del compuesto 11 en el Esquema 1. De forma análoga el experto en la materia será capaz de identificar de forma rutinaria las porciones del oligosacárido aniónico indicadas con  $S^1$  y  $S^2$  en la fórmula (I):



En otras palabras,  $S^1$  y  $S^2$  pueden representar las porciones residuales de cada uno de los oligosacáridos aniónicos que no forman parte del conector.

Se ha encontrado que los conectores de la presente invención proporcionan un enfoque fácil para la síntesis de conjugados de oligosacárido aniónico complejos. En particular, los conectores proporcionan al experto en la materia un acceso rápido a una serie de conjugados de oligosacárido aniónico que tienen diferentes longitudes e hidrofiliías. Si el deseo de quedar ligado por la teoría, se cree que el uso del grupo funcional tio (tal como en los compuestos de ditiol representados anteriormente) permite la conjugación de conjugados de oligosacárido aniónico complejos sin que se produzcan reacciones secundarias no deseadas. La facilidad con la que se pueden sintetizar los conjugados permite al experto en la materia investigar el papel que las propiedades del conector pueden desempeñar en la imitación de los GAG con los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención.

La naturaleza generalmente convergente de la síntesis de los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención proporciona al experto en la materia la capacidad de crear bibliotecas de compuestos estructuralmente diversos con relativa facilidad. Se pueden introducir grados de diversidad estructural mediante la elección de cada uno de los oligosacáridos aniónicos  $S^1$  y  $S^2$  de fórmula (I) (que pueden ser iguales o diferentes), así como la longitud

y forma del resto conector. En algunas realizaciones, los precursores sintéticos de los componentes de este tipo se pueden preparar en aislamiento y se pueden introducir en un enfoque de combinación. Por ejemplo usando tan pocos como 3 oligosacáridos aniónicos y 3 restos conectores, experto en la materia es capaz de producir fácilmente tantos como 27 conjugados de oligosacárido aniónico diferentes.

La presente invención proporciona métodos para preparar grandes números de conjugados aniónicos estructuralmente diversos que pueden formar la base para bibliotecas de miméticos de GAG. Los conjugados aniónicos pueden tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades que implican la interacción entre los GAG y uno o más ligandos. Los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos respiratorios inflamatorios que incluyen anafilaxia, asma, enfermedad respiratoria alérgica, rinitis alérgica, fibrosis subepitelial en hiperreactividad de las vías respiratorias, sinusitis crónica, rinitis alérgica perenne, aspergilosis broncopulmonar alérgica en pacientes con fibrosis quística, EPOC, ARDS/ALI, bronquitis eosinofílica, bronquiectasia, broncoespasmo, constricción bronquial, hiperreactividad bronquial, hipertrofia bronquial e inflamación bronquial. Como se usa en el presente documento, la expresión "espasmo bronquial" se refiere a un espasmo involuntario de las vías respiratorias de un paciente. Constitución bronquial es tanto un término como una afección médica que se puede intercambiar con "espasmo bronquial" en su uso con respecto a los fines de la presente solicitud. Como se usa en el presente documento, la expresión "inflamación bronquial" se refiere a una inflamación de las vías respiratorias de un paciente. Además, los síndromes alérgicos, por ejemplo asma, pueden comenzar mediante virus del enfriamiento común, especialmente el rinovirus y los compuestos desvelados se pueden usar para el tratamiento de infecciones en los conductos respiratorios superiores, tales como enfriamiento y gripe y las producidas por rinovirus y coronavirus. La constricción bronquial también es un síntoma de anafilaxia y los compuestos desvelados se pueden usar para el tratamiento de la anafilaxia.

La anafilaxia es una reacción alérgica, de inicio rápido, grave que puede producir la muerte. La obstrucción de las vías respiratorias superiores potencialmente mortal, broncoespasmos e/o hipotensión caracteriza a la anafilaxia grave. En Estados Unidos existen aproximadamente 100.000 episodios cada año, de los cuales aproximadamente un 1 % da como resultado la muerte y aproximadamente un 66 % son nuevos casos. La mayoría de los casos se puede describir un desencadenamiento específico pero aproximadamente un 20 % de los casos se denominan idiopáticos. La epinefrina se ha aceptado como el tratamiento de elección durante muchos años, pero se ha descrito como subutilizado y no siempre eficaz (Golden, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 7: 331-336, 2007). La preferencia de los médicos es el tratamiento con corticosteroides y antihistamínicos a pesar de la poca evidencia de su eficacia durante la enfermedad aguda. Los antihistamínicos pueden ayudar con patologías mediadas por histamina, pero no con los efectos que surgen a partir de otros mediadores y puede tener una eficacia limitada en la prevención de la activación de mastocitos y basófilos en desarrollo. Al igual que los antihistamínicos, se ha sugerido que los corticosteroides desempeñan un papel en la gestión de la enfermedad a pesar de que existen pocas evidencias de su eficacia en ensayos clínicos, pero su uso sugerido se encuentran la base de que la administración inicial de corticosteroides en pacientes con asma aguda es beneficioso (E1-Shanawany *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 153: 1-9, 2008). Los corticosteroides no serán eficaces durante la enfermedad aguda ya que sus acciones requieren síntesis de proteínas y por lo tanto sus actividades se retrasan.

La anafilaxia implica la activación de mastocitos y/o basófilos. Más comúnmente se desencadena por la exposición a venenos de insecto, alimentos, medicamentos e inyecciones de inmunoterapia con alérgenos a través de un mecanismo que implica a la IgE y el receptor de afinidad elevada hacia IgE en mastocitos y basófilos. La IgE sintetizada como respuesta a la exposición a alérgenos se llega a fijar a receptores de IgE (FcεRI) en la superficie de mastocitos y basófilos. La agregación de receptor por IgE produce activación celular, liberación de mediador formado previamente (incluyendo histamina, triptasas (incluyendo β-triptasa), carboxipeptidasa A, TNF-α y quimasa) y desencadenamiento de la respuesta de hipersensibilidad inmediata. Los mediadores de gránulos formados previamente se liberan por exocitosis en minutos. Del mismo modo la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico incluyendo prostaglandinas y leucotrienos, y factor de activación de plaquetas (PAF) se produce en minutos, nieta de la síntesis y liberación de citoquinas y quimioquinas inflamatorias pueden necesitar horas y estos mediadores contribuyen a la fase tardía de una reacción anafiláctica bifásica. Las citoquinas y quimioquinas liberadas incluyen IL-5, IL-4, IL-13, factor estimulante de colonias (CSF) de granulocitos (G), macrófago (M)-CSF, GM-CSF, IL-1β, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, IL-18 e IL-22. Por lo general estos mediadores producen el reclutamiento y activación de células adicionales incluyendo basófilos, eosinófilos y células Th2 (Ogawa y Grant, Immunol. Allergy Clin. N. Am., 27: 249-260, 2007). En algunos pacientes de los que se describe que tienen anafilaxia idiopática, los receptores FcεRI se pueden agregar a través de mecanismos autoinmunes en ausencia de IgE (Simons, J. Allergy Clin. Immunol. 121: S402-7, 2008) y existe una cierta evidencia de una ruta alternativa que implica a IgG y al receptor de IgG. Esta última ruta no desencadena la liberación de histamina; en su lugar PAF es el mediador inicial principal (Peavy y Metcalfe, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 8: 310-314, 2008).

En la fase inicial de la anafilaxia, la histamina estimula la vasodilatación y aumenta la permeabilidad vascular, ritmo cardiaco, contracción cardiaca y secreción glandular. La prostaglandina D2 es un broncoconstrictor, vasoconstrictor pulmonar y coronario, y un vaso dilatado del periférico. Los leucotrienos también estimulan la broncoconstricción y aumentan la permeabilidad vascular, así como la estimulación de la remodelación de las vías respiratorias. Del mismo modo PAF produce broncoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular. El TNF-α activa los neutrófilos, recluta otras células efectoras, y aumenta la síntesis de quimioquinas, lo que conduce a un reclutamiento

adicional de células inflamatorias. Estos efectos de solapamiento y sinérgicos contribuyen a la patofisiología global de la anafilaxia que de forma variable se presenta con urticaria generalizada y angioedema, broncoespasmos, y otros síntomas respiratorios, hipotensión, síntomas cardiovasculares (incluyendo desmayos), y náuseas así como otros síntomas gastrointestinales (Peavy y Metcalfe, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 8: 310-314, 2008). La IL-4 es una citoquina fundamental en la fase tardía de la anafilaxia y también en la estimulación y mantenimiento de la proliferación de células Th2 e intercambio de linfocitos B hacia la síntesis de IgE, el efecto más rápido o radical de esta citoquina en la anafilaxia es aumentar de forma notable la capacidad de respuesta de las células dirigidas a mediadores vasoactivos incluyendo histamina, serotonina, PAF y cisteinil leucotrienos (Ogawa y Grant, *Immunol. Allergy Clin. N. Am.*, 27: 249-260, 2007). El asma se caracteriza por la inflamación de los conductos respiratorios dando como resultado el estrechamiento temporal de las vías respiratorias que transportan el aire desde la nariz y la boca a los pulmones. Los síntomas del asma pueden estar causados por agentes alérgenos o irritantes que se inhalan en los pulmones, dando como resultado vías respiratorias inflamadas, obstruidas y con estrangulamiento. Los síntomas incluyen dificultad respiratoria, estornudos, tos, opresión en el pecho. En los casos graves, el asma puede ser potencialmente mortal. El asma probablemente no es una sola enfermedad, sino que en su hogar es un complejo de múltiples síndromes separados que se superponen. La siguiente clasificación se basa en los informes de Wenzel. *Lancet*; 368: 804-813, 2006, y Green *et al.*, *Curr. Opin. Allergy Immunol.* 7: 43-50, 2007.

- Asma alérgica: este es el fenotipo de asma más grande. Es especialmente cierto en el asma infantil pero probablemente también en una proporción elevada de adultos con asma. Los individuos que presentan este fenotipo normalmente experimentan sus primeros síntomas en la infancia, pero se pueden presentar en cualquier edad. La historia familiar de asma y una exposición inicial a los alérgenos son importantes en el comienzo del asma alérgica. Además de las terapias convencionales, se han usado de forma satisfactoria algunas terapias dirigidas: inmunoterapia o anticuerpos monoclonales contra la IgE. Sin embargo, no todas las personas con asma alérgica responden a la terapia anti-IgE.
- Asma ocupacional: hasta un 15 % del asma de inicio en adultos entra en este grupo. Presenta los siguientes subfenotipos: (1) desarrollo de una respuesta mediada por vía inmunológica con respecto al agente causal, normalmente un agente de alto peso molecular - tiene similitudes con el asma alérgica a través de desarrollo de anticuerpos de IgE; (2) desarrollo de una respuesta mediada por vía inmunológica con respecto a desencadenantes de peso molecular alto o bajo y no se observa de manera coherente una respuesta a IgE; (3) desarrollo de una respuesta de inicio rápido no inmunológica después de la exposición a una concentración elevada de productos químicos irritantes.

La inflamación de las vías respiratorias es similar en ambos fenotipos inmunológicos y se parece a la del asma alérgica por ejemplo por la presencia de eosinófilos, linfocitos, mastocitos y el engrosamiento de la membrana basal reticular. A diferencia del asma causada por productos químicos irritantes es bastante diferente y se caracteriza por fibrosis de la pared bronquial y denudación epitelial y exudados fibrinohemorrágicos en la submucosa sin inflamación eosinofílica. Los tipos inmunológicos de esta asma pueden continuar en ausencia de exposición al agente causal.

- Asma inducida por aspirina: la aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos son los desencadenantes. Es común en la población de asma severa y se asocia con poca evidencia de atopia, leucotrienos elevados y un recuento elevado de eosinófilos tanto en tejidos como en sangre. Existe la rinosinusitis severa y pólipos nasales e inicio en estado adulto. Este fenotipo es poco sensible a los corticosteroides.
- Asma relacionada con la menstruación: esto no está bien caracterizado. Probablemente solamente se produce en una pequeña proporción de mujeres, pero puede ser grave.
- Asma inducida por el ejercicio: parece que los mecanismos que desencadenan este asma implican respuestas celulares inflamatorias agudas (normalmente mastocitos), epiteliales y vasoactivas, pero la patogénesis no está clara. Si el asma inducido por el ejercicio representa el desarrollo de broncoconstricción como respuesta al ejercicio en todos los asmáticos o si se produce solamente en algunos no está claro.

Aunque la inflamación es una evidencia distintiva del asma, no todos los fenotipos asma tienen inflamación predominantemente eosinofílica, aunque este es el más común y el mejor estudiado.

- Asma eosinofílica: los estudios han definido un fenotipo eosinofílico mediante exámenes de esputo o biopsia en pacientes con grados variables de gravedad asmática y han demostrado de manera coherente que aproximadamente un 50 % de los asmáticos tienen este fenotipo. Otros estudios han sugerido que la inflamación eosinofílica puede estar presente en una proporción más elevada de pacientes que la detectada usando un examen de esputo o de biopsia. En un estudio se cree que un 50 % de los pacientes con asma severa de la que se creía que no era eosinofílica tenía realmente inflamación eosinofílica, pero en el pulmón distal.
- Asma neutrofílica: se observa más comúnmente en pacientes con enfermedad grave. Muchos pacientes con inflamación neutrofílica pueden tener inflamación eosinofílica simultánea en biopsias de tejido mientras que la evaluación del esputo puede mostrar un claro predominio de neutrófilos. La asociación de neutrófilos con asma grave podría estar causada por el tratamiento con dosis elevadas de esteroides, que han demostrado que disminuyen la apoptosis de neutrófilos *in vitro*. El asma neutrofílica se asoció con aumentos de IL-8 y elastasa

de neutrófilos. Aproximadamente un 20 % de los pacientes presentaban asma neutrofilica y un 8 % adicional presentaba inflamación tanto eosinofílica como neutrofilica (a partir de un estudio de 93 pacientes).

- Asma paucigranulocítico: pacientes con recuentos de células en esputo en el intervalo normal (~30 % de los 93 pacientes presentaban este subfenotipo).

La rinitis alérgica es una enfermedad de las vías respiratorias superiores inducida por alérgenos, caracterizada por hiperreactividad de la mucosa de las vías respiratorias y episodios de cronicidad de los síntomas con periodos de exacerbación aguda. Los individuos alérgicos se sensibilizan y pueden desarrollar anticuerpos IgE contra alérgenos tales como polen, ácaros del polvo, caspa de animales y esporas de moho. La respuesta alérgica inmediata al antígeno se denomina respuesta de fase inicial. Los mediadores liberados durante esta fase son histamina, quininas, proteasas neutras y una diversidad de citoquinas. La activación de los mastocitos conduce a la producción de leucotrienos y prostaglandinas y juntos estos mediadores dan lugar a la rinorrea acuosa, estornudos y picazón a los minutos de exposición al alérgeno. Esto va 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 fase de respuesta inicial, pero predomina la congestión (Walls *et al.*, Med. J. Aust.; 182: 28-33, 2005). La rinitis alérgica se ha subdividido en enfermedad "intermitente" y "persistente". La enfermedad intermitente describe una afección por la cual los síntomas están presentes menos de 4 días a la semana, o menos de 4 semanas a la vez. La enfermedad persistente se refiere a que los síntomas están presentes durante más de 4 días a la semana y más de 4 semanas a la vez (Pawanker, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.; 4: 1-4, 2004.)

La rinitis alérgica y el asma alérgica son enfermedades que implican una respuesta inflamatoria. Tienen una etiología subyacente similar y las citoquinas fundamentales para cada enfermedad son el subconjunto Th2 de citoquinas de linfocitos T, IL-5, IL-4 e IL-13 y GM-CSF. Estas enfermedades se caracterizan por un marcado infiltrado de células inflamatorias que comprende eosinófilos, mastocitos, linfocitos T y células del linaje monocítico. Las moléculas de adhesión, P-selectina, MAC-1 y PECAM-1 desempeñan un papel importante en la extravasación de leucocitos y es probable que estén implicadas en el proceso inflamatorio. Además, la familia eotaxina de quimioquinas desempeña un papel fundamental en estas enfermedades ya que son los principales factores quimiotácticos que estimulan la infiltración de linfocitos T eosinófilos y CD4 +.

Recientemente se han descrito citoquinas de la familia IL-17 (en particular IL-25 (IL-17E)) como iniciadoras o amplificadoras de la inflamación alérgica. Son de particular interés IL-17 (IL-17A) e IL-25. Los estudios *in vivo* sugieren que IL-25 puede desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de la inflamación alérgica mediada por Th2. Se examinaron los estudios con ratones transgénicos en los que los efectos sobre las reacciones alérgicas de la expresión forzada de IL-25 en las vías aéreas indicaban que IL-25 aumentaba la inflamación alérgica mediada por células Th-2. Además, la administración de IL-25 por instilación intra-traqueal dio como resultado tanto en hiperreactividad de las vías respiratorias como hipersecreción de moco, e inflamación eosinofílica en el tejido pulmonar, procesos que requerían a IL-13 y la señalización de IL-13 respectivamente, e IL-5/eotaxina (Tamachi *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 118: 606-614, 2006; Sharkhuu *et al.*, Clin. Exp. Allergy 36: 1575-1583, 2006). Los datos obtenidos con un anticuerpo bloqueante de IL-25 indican que IL-25 es crítica para el desarrollo de hiperreactividad de las vías respiratorias. El bloqueo de la actividad de IL-25 redujo de forma significativa los niveles de secreción de IL-5, IL-13 e IgE, infiltración de eosinófilos e hiperplasia de células caliciformes en asma alérgica (Ballantyne, J. Allergy Clin. Immunol. 120: 1324-1331, 2007). En otro trabajo que usa un modelo de ratón de asma se encontró que IL-17 es producido principalmente por macrófagos alveolares, y la expresión se regulaba de forma positiva por mediadores liberados de mastocitos (Song *et al.*, J. Immunol. 181: 6117-6124, 2008). En pacientes con asma, la expresión de IL-17 aumentaba en los pulmones, esputo, BAL fluido o suero y la gravedad de la hiperreactividad de las vías respiratorias se correlacionaba con los niveles de IL-17 (Wang y Liu, Curr. Opin. Immunol. 20: 697-702, 2008). Sin embargo, parece que los efectos de IL-17 están principalmente en los niveles de neutrófilos, ya que la sobreexpresión de IL-17 o la administración de IL-17 en los pulmones da como resultado un influxo de neutrófilos asociado con niveles elevados de quimioquinas que actúan sobre los neutrófilos. Existe una buena evidencia de que los niveles de neutrófilos contribuyen a broncoconstricción, AHR no específica, hipersecreción de proteínas mucosas y daño al tejido pulmonar, en particular en asma severa (Linden *et al.*, Eur. Respir. J. 25: 159-172, 2005).

La estructura tridimensional de un solo miembro de la familia IL-17 se ha resuelto. Esto revelaba que IL-17F es un homólogo estructural de la familia de nódulos de cisteína de proteínas y se dimeriza de forma similar a los miembros de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF). El núcleo del monómero de IL-17F comprende dos pares de hebras  $\beta$  antiparalelas (pares 1: hebras 1 y 2; Par 2: hebras 3 y 4). Dos puentes disulfuro conectan las hebras 2 y 4 y un tercer disulfuro conecta el bucle entre las hebras 3 y 4 de un promotor con la extensión N-terminal del monómero adyacente. Basándose en un alineamiento de secuencias de aminoácidos, se cree que el plegamiento del nódulo de cisteína y la localización de las hebras  $\beta$  se conservan en todos los miembros de la familia IL-17. La IL-17, en particular, se debería parecer a la estructura de IL-17F, mientras que la IL-25 (IL-17E) puede tener sus extremos N-terminales en una conformación diferente (Hymowitz *et al.*, EMBO J. 20: 5332-5341, 2001). Un examen de la estructura de IL-17F, coloreada de acuerdo con el potencial de superficie electrostática, revela una proteína que presenta muchos restos de superficie básicos orientados de un modo tal que la unión a glucosaminoglucano es una posibilidad. Una comparación de las secuencias de aminoácidos de IL-17F, IL-17 e IL-25 indica la conservación global de restos básicos, pero con IL-25 siendo más básico que las otras dos proteínas. Por lo tanto, un conjugado de oligosacárido aniónico se une a estas citoquinas, con la unión de IL-25 con la afinidad más alta elevada La

5 localización de los sitios de unión a receptor en IL-17, IL-17F e IL-25 no se ha determinado. Sin embargo, una característica sorprendente de la estructura de IL-17F es una gran cavidad en el área de la superficie de contacto del dímero. Hymowitz *et al.*, EMBO J. 20: 5332-5341, 2001 creen que los aminoácidos que forman esta región presentan características esperadas de un bolsillo que se puede unir a otra proteína (posiblemente un dominio receptor) y a partir de un análisis de la secuencia de aminoácidos este bolsillo debería estar conservado en todos los miembros de la familia incluyendo IL-25. Este bolsillo de unión al receptor potencial es colindante sobre una línea de grupos de restos básicos que es indicativa de una región de unión a conjugado de oligosacárido aniónico. Dado que la unión del conjugado de oligosacárido aniónico interfiere con la unión de IL-17 e IL-25 a sus receptores, es probable que esta línea de restos básicos colindante con el bolsillo de unión al receptor sea el sitio en el que el conjugado aniónico se une a IL-17 e IL-25.

15 Existe una comprensión creciente de que el asma y la rinitis alérgica son componentes de una única enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias. Esta conclusión se apoya en datos epidemiológicos que demuestran que más de un 80 % de personas con asma alérgica tienen rinitis alérgica y que hasta un 50 % de los pacientes con rinitis alérgica tienen asma (Gelfand, J. Allergy Clin. Immunol, 114: S135-138, 2004; Passalacqua *et al fondo*, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 4: 177-183, 2004). Además, los estudios longitudinales y de seguimiento han demostrado que la rinitis suele preceder al asma y es un factor de riesgo para el asma. La rinitis alérgica aumenta el riesgo de desarrollar asma al menos en tres veces y el tratamiento correcto de la rinitis alérgica con esteroides intranasales tiene un efecto favorable en los síntomas bronquiales, reduciendo en forma significativa la tasa de admisión hospitalaria y las visitas al servicio de urgencias por 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 a las diversas citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión celular indicadas anteriormente.

25 Los mastocitos e histaminas desempeñan un papel importante durante la respuesta inicial de la rinitis alérgica. Sin embargo, a medida que la rinitis alérgica evoluciona el papel de las histaminas disminuye, haciendo que los antihistamínicos sean menos eficaces como terapia (Gelfand, J. Allergy Clin. Immunol 114: S135-138, 2004). Durante la respuesta inicial de la rinitis alérgica, los mastocitos sensibilizados se desgranulan a los minutos de exposición al alérgeno liberando mediadores formados previamente y recién sintetizados incluyendo histamina, proteasas, cisteinil leucotrienos, prostaglandinas y citoquinas. La evolución de la rinitis alérgica depende de los mediadores asociados con la infiltración de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células mononucleares y linfocitos T (Gelfand, J. Allergy Clin. Immunol, 114: S135-138, 2004; Passalacqua *et al*, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 4: 177-183, 2004). La asociación de eosinófilos e IL-5 con la rinitis alérgica se ha observado desde hace algún tiempo. Los estudios repetidos han encontrado un aumento de los niveles de citoquinas de tipo Th2 incluyendo IL-5 e IL-4, y un aumento de las cantidades de proteína eosinófila catiónica (ECP), un marcador de eosinófilos activados, después de provocación con alérgeno (Blaiss, Allergy Asthma Proc. 26: 35-40, 2005). El influjo de eosinófilos se correlaciona estrechamente con el desarrollo de los síntomas. Además la pérdida de integridad epitelial en la mucosa nasal de pacientes con rinitis se correlaciona con los recuentos de eosinófilos en lugar de los recuentos de mastocitos o neutrófilos (Borish, J. Allergy Clin Immunol. 112: 1021-1031, 2003). Parece que la rinitis alérgica evoluciona a partir de un proceso agudo, principalmente mediado por mastocitos que responde a antihistamínicos, a través de una enfermedad inflamatoria crónica que está principalmente mediada por eosinófilos y es mucho menos sensible a los antihistamínicos. Este es el caso de los pacientes con rinitis alérgica persistente. La evolución a un estado que es resistente a los antihistamínicos histaminas también se puede producir dentro de una estación de alergia, para sufrimientos estacionales. Para otros pacientes enfermedad intermitente leve los antihistamínicos siguen siendo una terapia eficaz, que refleja exposiciones a alérgenos intermitentes, que no tienen una duración suficiente como para conducir la evolución de la enfermedad en la fase de resistencia a antihistamínicos.

50 El tratamiento de primera línea para el asma son los corticosteroides inhalados (ICS), que normalmente se usan en combinación con agonistas  $\beta_2$  (Barnes, Br. J. Pharmacol. 147 Supl 1: 5297-303, 2006). Los agonistas  $\beta_2$  alivian los síntomas en lugar de tratar la inflamación subyacente y tienen el potencial de hacer que el asma empeore si se usan con frecuencia en ausencia de los ICS. Sin embargo, parece que ésta es la terapia preferente (a pesar de sus efectos secundarios) debido a su efecto inmediato. A la terapia con agonistas  $\beta_2$  en ausencia de ICS se le ha concedido un listado de "caja negra" en la FDA debido a los posibles problemas cardiacos asociados con esta terapia. Aunque los efectos secundarios son más bajos que con las formulaciones orales, los ICS no están exentos de efectos adversos locales y sistémicos. Un efecto secundario de los corticosteroides es la supresión del eje hipotálamico-pituitaria-adrenal (HPAA): se observan efectos adversos clínicamente relevantes y esto es más evidente con algunos medicamentos que otros. La densidad ósea y las fracturas también pueden ser un problema: se pueden detectar ciertos efectos de los ICS sobre el metabolismo óseo, pero la importancia clínica no está clara. Por último, el retraso del crecimiento en los niños es otra cuestión que puede preocupar a los pacientes (Allen, Adv Pediatr. 53: 101-110, 2006). En resumen, los efectos secundarios son aceptables dadas las complicaciones severas del asma sostenido/incontrolado.

Otras terapias para el asma incluyen:

65 (1) El omalizumab, un anticuerpo anti-IgE (Genetech) se considera no rentable para el tratamiento del asma convencional. Se usa principalmente como terapia complementaria a los ICS porque no mejora la capacidad de respuesta de las vías respiratorias y tiene una eficacia discreta. Las restricciones de las dosis y el mecanismo de

administración (inyección subcutánea) son una desventaja añadida. Por otra parte, una advertencia de la US Food and Drug Administration (FDA) ha relacionado la inyección de omalizumab con una anafilaxia potencialmente mortal y, de forma más preocupante, en algunos pacientes la aparición de esta anafilaxia se retrasa de más de 2 horas después de la inyección a más de 24 horas después de la inyección.

(2) Anti-leucotrienos (anti-LT), que pueden causar broncodilatación. Su efecto es aditivo al de los agonistas de receptores  $\beta_2$  de acción corta, aunque por sí solos tienen un efecto relativamente discreto. Los anti-LT afectan principalmente a la respuesta asmática inicial (EAR), mientras que los ICS muestran efectos pronunciados en las respuestas asmáticas tardías (Palmqvist *et al.*, *Allergy* 60: 65, 2005). Por estas razones los anti-LT se han sometido a ensayo en combinación con los 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 antihistamínicos o corticosteroides intranasales (Nielsen y Dahl, *Am. J. Respir. Med.* 2: 55-65, 2003; Yanez y Rodrigo, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89: 479-84, 2002). Los antagonistas de H1 de primera generación más antiguos (antihistamínicos) tienen una serie de efectos secundarios adversos, siendo los mejor reconocidos la somnolencia y los efectos anticolinérgicos. Los fármacos de segunda generación se desarrollaron 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 un caso claro (Golightly y Greos, *Drugs* 65: 341-84, 2005). Se urgió a poner etiquetas para la Cetirizina, el antihistamínico más potente aprobado por la FDA, incluyen una advertencia sobre el posible efecto adverso de somnolencia y precaución con la conducción y el uso de equipo pesado cuando se ingiere el fármaco. Además, se debería evitar el uso simultáneo de alcohol o de otros supresores del sistema nervioso central (SNC) debido a que se puede producir una reducción adicional en el estado de alerta y rendimiento del SNC. Por otra parte, los antihistamínicos no son eficaces contra la congestión asociada con la rinitis alérgica crónica. La rinitis alérgica evoluciona a una enfermedad que está principalmente mediada por eosinófilos y es resistente a la terapia con antihistamínicos. Cuando esto ocurre los corticosteroides intranasales (INCS) son la terapia principal. De hecho, para muchos profesionales clínicos los INCS son los fármacos de elección para el tratamiento de todas las rinitis alérgicas ya que el corticosteroide actúa para reducir la inflamación eosinofílica. Aunque por lo general se considera que los INCS son seguros, la recomendación es reducir la dosis del esteroide tanto como sea posible y optimizar las estrategias de ahorro de esteroides (Skoner, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2: 7-10, 2002).

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

Los macrófagos alveolares desempeñan un papel fundamental en la EPOC. Están localizados en sitios de destrucción alveolar, y sus recuentos están correlacionados de forma positiva con gravedad de la enfermedad, obstrucción de las vías respiratorias y grado de daño de la pared alveolar y enfisema. Los neutrófilos de los tejidos de las vías respiratorias aumentan en las vías respiratorias grandes y pequeñas de los pacientes con EPOC durante las exacerbaciones y en la EPOC severa, o durante las infecciones. Los pacientes con EPOC también presentan cualquiera de un aumento de la proporción de linfocitos T CD8+/CD4+, o un aumento en los recuentos totales de linfocitos T tanto CD8+ como CD4+ en la pared de las vías respiratorias (MacNee, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2: 258-266, 2005). Los bronquiolos están obstruidos por fibrosis e infiltrados con macrófagos y linfocitos T.

Existen tres formas morfológicas de EPOC: bronquitis crónica, bronquiolitis obstructiva y enfisema (Szilasi *et al.*, 2006. *Pathol. Oncol. Res.* 12: 52-60). La inflamación asociada con la bronquitis crónica se localiza en el epitelio de las vías respiratorias centrales. El proceso inflamatorio es asociado con un aumento de la producción de moco y eliminación mucociliar defectuosa. La inflamación se observa en la mucosa, en las capas de músculo liso y glándulas submucosales. En las vías respiratorias grandes, la implicación de células mononucleares, macrófagos, linfocitos T CD8+ y células plasmáticas es común en la EPOC estable y durante exacerbaciones de la bronquitis crónica. Los linfocitos T CD8+ liberan factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), un potente mediador proinflamatorio. El papel del neutrófilo no es claro. Los neutrófilos se observan en las vías respiratorias grandes sumamente durante exacerbaciones y en la EPOC severa. Sin embargo, se observan inicialmente en el lumen de las vías respiratorias y el esputo.

La bronquiolitis obstructiva o la obstrucción de las vías respiratorias pequeñas es una afección inflamatoria que afecta a las vías respiratorias pequeñas y periféricas. La característica habitual es el lumen colapsado con aumento

de moco. Los macrófagos y los linfocitos T CD8+ dominan la inflamación de las vías respiratorias pequeñas, aunque los cambios inflamatorios mostraban una correlación positiva con la obstrucción del flujo de aire en la EPOC. Por ejemplo, en la EPOC estable de leve a moderada, los macrófagos eran dominantes, mientras que en la enfermera severa los neutrófilos eran el componente inflamatorio predominante, mientras que durante las exacerbaciones leves se encuentran eosinófilos. El aumento del número de fibroblastos y miofibroblastos y la mejora de la matriz extracelular se encuentra en el subepitelio de las vías respiratorias pequeñas en la bronquiolitis obstructiva. Esta patología sugiere un mecanismo de lesión repetitiva y cicatrización que conduce a fibrosis y tejido cicatricial. El resultado neto es el estrechamiento de las vías respiratorias.

El enfisema se define mediante la ampliación permanente del espacio aéreo causada por la destrucción y agrandamiento del tejido pulmonar más allá del bronquiolo terminal. El mecanismo de la enfermedad implica una inflamación no regulada y la liberación de grandes cantidades de enzimas proteolíticas. El desequilibrio de proteasa/antiproteasa es la supuesta causa del enfisema pulmonar. Aunque la inflamación está dominada por los linfocitos T CD8+, los macrófagos y los neutrófilos producen cantidades excesivas de proteasas, incluyendo elastasa de leucocitos, catepsina G, proteinasa 3, metaloproteinasas de matriz (MMP), cisteína proteinasas y activador de plasminógeno. Estas enzimas destruyen la elastina y otros componentes de la pared alveolar con la elastasa siendo la enzima más implicada en este proceso.

Los mediadores pro inflamatorios de estas patologías incluyen leucotrieno-B<sub>4</sub>, IL-8 y otras quimioquinas (por ejemplo, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1), TNF- $\alpha$ , IL-13 e IL-4 (Barnes, Pharmacol. Rev. 56: 515-548, 2004). Se ha sugerido que los efectos inhibitorios de TNF- $\alpha$  e IL-4 en la producción de la citoquina reguladora TGF- $\beta$  por células epiteliales bronquiales pueden contribuir a la evolución de la respuesta inflamatoria. Además, el aumento de los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IL-8 se midió en esputo con aumentos adicionales durante las exacerbaciones.

La EPOC es una carga muy significativa para 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 causa importante de muerte en Estados Unidos en la que la morbilidad y la mortalidad están aumentando. Para 2020 se calcula que la EPOC será la tercera causa principal de muerte y la quinta causa principal de discapacidad en todo el mundo (Halpin y Miravittles, Proc. Am. Thorac. Soc. 3: 619-623, 2006). Las terapias existentes para la EPOC son extremadamente inadecuadas. Ninguno de la evolución lenta de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos es deficiente. La EPOC 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  $\beta_2$  de acción corta y larga, anticolinérgicos de acción corta y larga, corticosteroides inhalados, teofilina, N-acetil cisteína y otros mucolíticos y oxígeno (Anzueto, Am. J. Med. 119: S46-S53, 2006; Barnes y Stockley, Eur. Respir. J. 25: 1084-1106, 2005). Los agonistas  $\beta_2$  de acción corta y larga se introdujeron para mejorar la broncodilatación. A menudo se usan en combinación con anticolinérgicos porque producen broncodilatación a través de diferentes vías. Los corticosteroides inhalados se usan a menudo en combinación con el agonista  $\beta_2$  y las 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 N-acetil cisteína no está claro, pero puede actuar como un agente mucolítico o antioxidante para mejorar los síntomas de la tos y en algunos pacientes parece reducir la frecuencia de la exacerbación.

A pesar de estas terapias, la única intervención que claramente muestra que reduce la mortalidad en ensayos clínicos es dejar de fumar.

La lesión pulmonar aguda (ALI) y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) son afecciones respiratorias inflamatorias asociadas con altas tasas de mortalidad. La patogénesis de ALI y ARDS implican respuestas de defensa del hospedador no controladas que conducen a inflamación, daño endotelial, aumento de la coagulación, disminución de la fibrinólisis y fibroproliferación. El ARDS es un síndrome clínico resultante de una diversidad de etiologías. En 1994 se recomendó una definición de la enfermedad por la American-European Consensus Conference sobre el Comité de ARDS; Los criterios incluyen: (1) inicio agudo, (2) infiltrados bilaterales en la radiografía de tórax, (3) presión de cuña en la arteria pulmonar  $\leq$  18 mm de Hg o ausencia de evidencia clínica de hipertensión en la aurícula izquierda y (4) proporción de Pao<sub>2</sub>/Fio<sub>2</sub>  $\leq$  300 (que define ALI) o proporción de Pao<sub>2</sub>/Fio<sub>2</sub>  $\leq$  200 (que define al ADRS como una forma más severa de ALI) (Cepkova y Matthay, J. Intensive Care Med., 21: 119-143, 2006). El daño alveolar difuso es una característica del ARDS. Los sucesos iniciadores que conducen a daño alveolar difuso y posteriormente a ALI o ARDS incluyen neumonía, aspiración, embolia pulmonar, casi ahogamiento, lesión por inhalación, edema pulmonar por reperfusión, traumatismo, cirugía, quemadura, sobredosis de fármacos, pancreatitis aguda, derivación cardiopulmonar y transfusiones de sangre masivas, pero la sepsis general está asociada con el riesgo más elevado de desarrollar ALI o ARDS. Existen tres fases superpuestas de la enfermedad: Fase exudativa (en los primeros 4-7 días), fase proliferativa ( $\geq$  7-14 o 21 días) y fase fibrótica ( $\geq$  14 o 21 días) (MacLaren y Stringer, Pharmacotherapy, 27: 860-873, 2007).

La fase temprana inicial (fase exudativa) se caracteriza por una mayor permeabilidad de las barreras endoteliales y epiteliales del pulmón, con acumulación de fluido edematoso rico en proteínas y altamente celular en el intersticio pulmonar y alvéolos. El fluido del edema contiene membranas hialinas y una diversidad de células inflamatorias, pero con predominio de neutrófilos. Por lo tanto la expresión patológica relacionada denominada: daño alveolar difuso, consiste en membranas hialinas más al menos uno de los siguientes: necrosis alveolar de tipo I o de células

endoteliales, edema, fibrosis intersticial, proliferación prominente de células alveolares de tipo II. Algunos pacientes se recuperan durante la primera semana de la enfermedad, otros mueren durante esa fase, pero algunos evolucionan en una fase sub-aguda de ALI/ARDS que se desarrolla 7 o más días después del inicio. Durante esta fase sub-aguda el espacio alveolar se llena con células mesenquimales, sus productos y nuevos vasos sanguíneos. Existen evidencias de fibrosis intersticial y alveolar con proliferación de células tipo II y destrucción de porciones de microcirculación en los pulmones. En algunos pacientes la insuficiencia respiratoria continúa más allá de 14 días, y esta fase crónica se caracteriza por una fibrosis pulmonar extensa con pérdida de la arquitectura alveolar normal y el desarrollo progresivo de regiones enfisematosas en el pulmón (Cepkova y Matthay, J. Intensive Care Med., 21: 119-143, 2006).

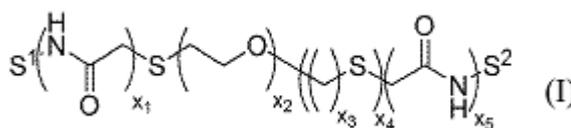
Durante la fase aguda hay una marcada acumulación de neutrófilos. Los neutrófilos predominan en el fluido del edema pulmonar y el fluido de lavado broncoalveolar obtenido de personas afectadas. Los macrófagos alveolares secretan citoquinas por ejemplo interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , que actúan localmente para estimular la quimiotaxis de neutrófilos y para activar neutrófilos. A continuación los neutrófilos liberan agentes oxidantes, proteasas (incluyendo elastasa de neutrófilos), leucotrienos y otros mediadores proinflamatorios (Ware y Matthay, New England J. Med. 342: 1334-1349). Estos mediadores interactúan en formas complejas para dañar e inflamar la superficie de contacto de los capilares alveolares. Esta heterogeneidad de mediadores puede explicar por qué las terapias anti-mediador que parecen prometedoras en modelos animales no se han traducido en un resultado clínico beneficioso cuando se administran en ensayos clínicos. El tratamiento del ARDS con corticosteroides, ibuprofeno, n-acetil cisteína, lisofilina, prostaglandina E, anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , antagonista del receptor de IL-1 y ketoconazol ha sido decepcionante con todos en grandes ensayos clínicos.

La identificación y tratamiento del trastorno clínico inductivo es un aspecto importante de la gestión de ALI/ARDS. En muchos pacientes el traumatismo que causó la lesión no se puede tratar excepto para prevenir la recurrencia y en estos pacientes los cuidados de apoyo óptimos son primordiales. El pilar del cuidado de apoyo es la ventilación mecánica y los ensayos recientes han mostrado que, en comparación con un enfoque tradicional con respecto a la ventilación mecánica, una estrategia dirigida a la administración volúmenes de corrientes menores y limitar la presión de la meseta daba como resultado una reducción de la mortalidad (Mortelliti y Manning, Am. Family Physician 65: 1823-1830, 2002).

En la actualidad se ha encontrado que los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención interactúan con una serie de ligandos que son responsables, en parte o totalmente, de las afecciones discutidas anteriormente. Preferentemente el ligando es un péptido, polipéptido o proteína aunque la presente invención se extiende al ligando que es un carbohidrato, lípido, glicoproteína o una molécula obtenida a partir de la identificación sistemática de producto natural o a partir de una biblioteca química. Las dianas de proteína adecuadas incluyen las que se han descrito como proteínas de unión a GAG (heparina, sulfato de heparina, condroitina e hialuronano). Los ejemplos de ligandos de proteína incluyen, pero no se limitan a: histamina, una citoquina incluyendo una interleuquina (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, y miembros de la familia IL-17 incluyendo IL-25), interferón (por ejemplo,  $\alpha$ -interferón,  $\beta$ -interferón,  $\gamma$ -interferón) o un factor de crecimiento que incluye, pero no se limita 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, FGF 19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, LIF, MCP 1, MCP2, MCP3, MCP4, MCP5, M-CSF, MIP1, MIP2, KC, NGF, NT 3, NT4, NT5, NT6, NT7, OSM, PBP, PBSF, PDGF, PECAM-1, PF4, RANTES, SCF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ <sub>1</sub>, TGF $\beta$ <sub>2</sub>, TGF $\beta$ <sub>3</sub>, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TPO, VEGF, GH, insulina y similares; una enzima (por ejemplo, superóxido dismutasa, proteína catiónica eosinofílica, triptasas (incluyendo  $\beta$ -triptasa), quimasas, elastasas, fosfolipasa A2 o prostaglandina endoperóxido); quimioquinas tales como eotaxina (eotaxina-1, -2 o -3); o un receptor soluble o unido a célula o virus (por ejemplo, receptor de trifosfato de inositol).

En un aspecto la invención proporciona un ensayo o identificación sistemática para determinar el efecto biológico de uno o más conjugados de oligosacárido aniónico, ensayo que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un ligando, célula o animal con uno o más conjugados de oligosacárido aniónico teniendo cada uno independientemente la siguiente fórmula (I):



en la que:

- S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente oligosacáridos aniónicos;
- x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;
- x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;

- x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;
- x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y
- x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4;

5 y  
b) cuantificar un efecto del uno o más conjugados de oligosacárido aniónico en el ligando, célula o animal.

10 La interacción con un ligando se puede detectar mediante cualquier medio conveniente tales como retraso en gel, retraso en filtro, co-electroforesis por afinidad, ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscente (BRET), ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), ensayos de polarización por fluorescencia (FP), ensayos de proximidad por centelleo o inmovilización en biochips u otras superficies incluyendo las acopladas con detección mediante espectrometría de masas.

15 Lo último se puede conseguir inmovilizando primero el conjugado de oligosacárido aniónico en un chip y a continuación añadiendo el ligando. Como alternativa, el ligando se puede inmovilizar en un chip y usar para identificar sistemáticamente la capacidad de un conjugado de oligosacárido aniónico para unirse al mismo.

20 Además otra alternativa es inmovilizar un GAG, tal como heparina, en un soporte sólido y a continuación identificar sistemáticamente la capacidad de un conjugado de oligosacárido aniónico para inhibir la unión de un ligando a la heparina inmovilizada.

25 Por consiguiente, un ensayo particularmente útil es mezclar el ligando y el conjugado de oligosacárido aniónico e identificar sistemáticamente la capacidad del conjugado de oligosacárido aniónico para inhibir la unión del ligando a un GAG (por ejemplo, heparina o sulfato de heparano) unido a un chip.

30 Otro aspecto de la presente invención contempla, por lo tanto, un método para producir un mimético de GAG que interactúe con un ligando tal como una proteína, comprendiendo dicho método la producción de una biblioteca de conjugados de oligosacárido aniónico y a continuación la identificación sistemática de cada miembro de dicha biblioteca para una capacidad para interactuar con dicho ligando o para inhibir la interacción entre el ligando y los GAG similares a Heparina (HLGAG) conocidos porque interactúan con dicho ligando.

En una realización preferente, el conjugado de oligosacárido aniónico se une a un producto celular secretado que puede ser una proteína, al hacerlo de este modo, inhibe la interacción entre el ligando y un GAG tal como heparina.

35 Por supuesto, existe una serie de otros ensayos, que se pueden usar para identificar sistemáticamente la interacción entre un conjugado de oligosacárido aniónico y un ligando o se pueden usar para identificar sistemáticamente la inhibición de la interacción entre un ligando y un GAG del que se sabe que se une al ligando. Otro ensayo es un ensayo de unión en filtro. En este ensayo, uno de un conjugado de oligosacárido aniónico, o un ligando se etiqueta con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal identificable tan como un colorante fluorescente y se permite que ambas moléculas interactúen en solución. A continuación la mezcla resultante se pasa a través de un filtro capaz de retrasar uno del conjugado de oligosacárido aniónico o molécula compuesta de conjugado de oligosacárido aniónico o el ligando o solamente un complejo de conjugado de oligosacárido aniónico-ligando o complejo de molécula compuesta de conjugado de oligosacárido aniónico-ligando.

45 En una realización, por ejemplo, el filtro es un filtro de nitrocelulosa que retrasa las proteínas. En este caso I, si el conjugado de oligosacárido aniónico, etiquetado con una molécula indicadora, fracasa al pasar a través del filtro, entonces la presencia de la señal indicadora en el filtro indica la unión del conjugado de oligosacárido aniónico a la proteína.

50 En otra realización, la heparina o el sulfato de heparano se etiqueta con la molécula indicadora y reacciona con la proteína en presencia de diferentes conjugados de oligosacárido aniónico. El paso de la heparina o el sulfato de heparano a través del filtro es indicativo de que un conjugado de oligosacárido aniónico ha inhibido la interacción entre la heparina/sulfato de heparano y la proteína.

55 Diferentes conjugados de oligosacárido aniónico interactuarán con diferentes ligandos, o diferentes ligandos interactuarán con diferentes conjugados de oligosacárido aniónico o ambos. Por consiguiente, otro ensayo implica el uso de columnas de afinidad que portan ligandos inmovilizados. A continuación los conjugados de oligosacárido aniónico se pasan a través de la columna y se determina la presencia de retraso de los conjugados de oligosacárido aniónico. De forma conveniente se usa un gradiente salino para eluir los conjugados de oligosacárido aniónico unidos. Una vez que se identifica una fracción que se une a un ligando en una columna, la fracción se puede analizar adicionalmente para obtener una indicación del número de diferentes entidades estructurales en la misma. Los análisis de este tipo pueden comprender, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico, espectrometría de masas o electroforesis.

65 Otros ejemplos de ensayos contemplados en la presente invención incluyen ensayos funcionales tales como ensayos de células completas para evaluar la proliferación celular (tal como se muestra en los Ejemplos 11 a 13),

ensayos de inhibición enzimática (tal como se muestra en el Ejemplo 14), ensayos de quimiotaxis (tal como se muestra en el Ejemplo 15) ensayos en animales (tal como se muestra en los Ejemplos 16 a 20). Los ensayos funcionales de este tipo pueden proporcionar una información más útil sobre el efecto del conjugado de oligosacárido aniónico(s) sometido a ensayo que los ensayos de unión pura.

Una vez que se han identificado los conjugados de oligosacárido aniónico que se unen a un ligando en particular, esta fracción por sí misma puede ser útil como un agente terapéutico para inhibir la interacción entre una proteína (u otro ligando) y un GAG de superficie celular (por ejemplo, heparina o sulfato de heparano). La proteína (u otro ligando) puede ser sin células puede estar asociada con una célula o virus tal como una superficie celular o superficie viral. El conjugado de oligosacárido aniónico mencionado también puede ser útil como un agente terapéutico para modular la interacción entre un producto celular secretado y componentes de la matriz extracelular o entre una proteína de la superficie celular o componentes de la matriz extracelular, o entre una proteína y su ligando, ambos o cualquiera de los cuales pueden estar asociados a la superficie celular o a célula. Como alternativa, el conjugado de oligosacárido aniónico se puede usar como una diana para identificar productos naturales o productos de una biblioteca química que imite al conjugado de oligosacárido aniónico en términos de unión a un ligando o que inhiba o estimule la interacción entre el GAG y el ligando. Estas moléculas pueden ser antagonistas o agonistas o análogos químicos del GAG. Por lo tanto, un "análogo" se extiende a, e incluye cualquier estructura que sea funcionalmente equivalente en la unión y/o modulación de un ligando de una manera análoga.

En el presente documento la referencia a "modular" o "población" se extiende a, e incluye inhibir y/o estimular una interacción.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar un medicamento para tratar una patología en un sujeto, comprendiendo dicho método la producción de una gama de conjugados de oligosacárido aniónico de acuerdo con el método de la invención, y la identificación sistemática de cada conjugado de oligosacárido aniónico para una capacidad para interactuar con o modular el ligando. El conjugado de oligosacárido aniónico interactúa con o que modula el ligando se identifica y el mismo o un análogo, agonista o antagonista del mismo se usa en la preparación de dicho medicamento.

En una realización preferente, la modulación es una inhibición.

Los tipos de ligandos contemplados en el presente documento incluyen los enumerados anteriormente tales como PECAM-1, Ciclofilina A, gp120 y citoquinas tales como interleuquina (IL)-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 17 (incluyendo IL-25), G-CSF, GM-CSF, LIF y M-CSF y quimioquinas tales como eotaxina-1, eotaxina-2 y eotaxina-3 y enzimas tales como elastasa y otros agentes quimioattractores tales como MCP-1 y MIP-1 $\alpha$ .

Los sujetos a tratar incluyen seres humanos, animales de ganado (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, asnos), animales de laboratorio de ensayo (por ejemplo, conejos, cobayas, ratones, ratas) y animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos).

Además otro aspecto de la presente invención contempla un método de profilaxis y/o tratamiento de una patología en un sujeto, resultando dicha patología de la interacción entre un GAG sobre una superficie de una célula en dicho hospedador y un ligando, o un GAG en la matriz extracelular en dicho hospedador y un ligando que puede estar o no asociado a células, o una interacción de proteína-ligando en dicho hospedador que se puede interrumpir con un GAG en la que la proteína puede estar asociada a células y el ligando soluble o tanto proteínas como ligandos pueden estar asociados a células, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de oligosacárido aniónico, producido e identificado de acuerdo con la invención, que interactúa con dicho ligando.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de oligosacárido aniónico como se definen en el presente documento y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (que son solubles en agua), polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles y formas inhalables. Tales formas son preferentemente estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dilución que comprende, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación del conjugado de oligosacárido aniónico y vehículo/diluyente en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado seguido de esterilización o al menos un método para reducir virus contaminantes, bacterias u otras entidades biológicas a niveles aceptables para

administración a un ser humano o sujeto animal. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación adecuados incluyen secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo de principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado.

5 Cuando el conjugado de oligosacárido aniónico está protegido de forma adecuada, éste se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede estar encerrado en cápsula de gelatina dura o blanda, o se pueden formar comprimidos mediante compresión. Para la administración terapéutica oral, el principio activo se puede incorporar con excipientes y se puede usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener preferentemente al menos un 1 % en peso de conjugado de oligosacárido aniónico activo. Por supuesto, el porcentaje de las composiciones y preparaciones se puede variar y de forma conveniente puede estar entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 80 % del peso de la unidad. La cantidad de conjugado de oligosacárido aniónico activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones preferentes de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que una forma unitaria de dosificación oral contenga entre 15 aproximadamente 0,1 µg y 200 mg de conjugado de oligosacárido aniónico 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 individuo o por kg de peso corporal. La administración puede ser por segundo, minuto, hora, día, semana, mes o año.

20 Los comprimidos, trociscos, píldoras y cápsulas y similares también pueden contener los componentes que se enumeran en lo sucesivo en el presente documento. Se puede añadir un aglutinante tal como goma, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; uno agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente 25 edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, ésta puede contener, además de materiales del tipo mencionado anteriormente, un vehículo líquido. Otros materiales diversos pueden estar presentes como revestimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden revestir con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material 30 usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debería ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades usadas. Además, el compuesto o compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

35 Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica y excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo su uso, se contempla en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también se pueden incorporar principios activos 40 suplementarios.

La composición también se puede formular para administración local o tópica. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton PA., 16ª edición, 1980, Ed. por Arthur Osol. Por lo tanto, para administración local o tópica, las composiciones objeto se 45 pueden formular de cualquier manera adecuada, que incluyen, pero no se limitan a, cremas, geles, aceites, pomadas, soluciones, suspensiones, polvos, nebulizaciones o aerosoles. Para administración transmucosal, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Los agentes penetrantes de este tipo por lo general se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, digitonina, dihidrocitocalasina B5 y ácido cáprico.

50 Las composiciones de la invención objeto en forma de lociones, cremas o geles pueden contener diluyentes o vehículos aceptables para impartir la textura, consistencia, viscosidad y aspecto deseados. Los diluyentes y vehículos aceptables son familiares para los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos etoxilados y no etoxilados, alcoholes grasos, ácidos grasos, aceites de hidrocarburos (tales como aceite de palma, aceite de coco y aceite mineral), ceras de manteca de cacao, aceites de silicio, agentes tamponantes, derivados de celulosa, agentes emulsionantes tales como bases orgánicas e inorgánicas no iónicas, agentes conservantes, ésteres de cera, alcoholes de esteroides, ésteres de triglicérido, fosfolípidos tales como lecitina y cefalina, ésteres de alcohol polihídrico, ésteres de alcohol graso, derivados hidrófilos de lanolina y derivados hidrófilos de cera de abejas.

60 En una realización particularmente preferente, la presente invención contempla una composición farmacéutica para su inhalación. Las composiciones que comprenden uno o más conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención se pueden administrar al tracto respiratorio como un aerosol de inhalación nasal o pulmonar o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino (preferentemente con partículas con un tamaño del orden de 1 a 10 micrómetros o inferior) para insuflación, solo o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa, o con otros 65 excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones de aerosol incluyen aquellas en las que el conjugado de oligosacárido aniónico se proporciona en un envase presurizado con un agente propulsor adecuado tal como un inhalador de dosis medida presurizado (pMDI). Si bien el propulsor puede ser un clorofluorocarbono (CFC) tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, el agente propulsor es más preferentemente un agente propulsor no clorofluorocarbonado tal como dióxido de carbono, hidrofluoroalcanos (tales como HFA-134a) u otro gas adecuado. De forma conveniente el aerosol también puede contener un tensioactivo tal como lecitina. La dosis del conjugado de oligosacárido aniónico se puede controlar mediante el suministro de una válvula de dosificación. Se ha encontrado que un tamaño de partícula de aproximadamente 2 a 3  $\mu\text{m}$  es preferente para el tratamiento de asma, ya que las partículas con un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$  por lo general se exhalan sin suministro al pulmón y las partículas con un tamaño superior a 10  $\mu\text{m}$  están atrapadas en su mayor parte por deposición orofaríngea y no alcanzan el pulmón. Los dispositivos impulsados por HFA-134a suministran gotitas más pequeñas que penetran más fácilmente en las vías respiratorias bronquiales. Preferentemente la administración de aproximadamente un 40 % de las gotitas inhaladas en el pulmón es deseable y se puede conseguir usando un pMDI como se ha indicado anteriormente. Para el tratamiento de rinitis alérgica el tamaño de partícula preferente para la administración del fármaco a través del conducto nasal es de 20-80  $\mu\text{m}$ , ya que las partículas más pequeñas (tamaño inferior a 10  $\mu\text{m}$ ) se transportan a la región traqueobraquial, mientras que las partículas más grandes (tamaño superior a 100  $\mu\text{m}$ ) se eliminan rápidamente del conducto nasal.

El conjugado de oligosacárido aniónico también se puede proporcionar en una formulación farmacéutica que forma un gel en la cavidad nasal. El conjugado de oligosacárido aniónico también se puede formular en una composición en polvo que se puede presentar en forma de dosis unitaria por ejemplo en cápsulas o cartuchos por ejemplo de gelatina, o envases de tipo blíster a partir de los cuales se puede administrar el polvo por medio de un inhalador.

Como se usa en el presente documento la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a la sal de un compuesto dado, en el que la sal es adecuada para administración como un producto farmacéutico. Por ejemplo, las sales de este tipo se pueden formar por la reacción de un ácido o una base con un grupo amino o un grupo carboxilo respectivamente.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales obtenidas a partir de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, y magnesio. Las sales obtenidas a partir de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de origen natural, y aminas cíclicas, incluyendo isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, N-alquilglucaminas, teobromo, purinas, piperazina, piperidina, y N-etilpiperidina. También se debería entender que otros derivados de ácido carboxílico podrían ser útiles en la práctica de la presente invención, por ejemplo amidas de ácido carboxílico, incluyendo carboxamidas, carboxamidas de alquilo inferior, carboxamidas de di(alquilo inferior), y similares.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales obtenidas a partir de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

La expresión "grupo protector" se refiere a cualquier grupo que cuando se une a uno o más grupos hidroxilo, tiol, amino o carboxilo de los compuestos evita que se produzcan reacciones en estos grupos y cuyo grupo protector se puede retirar mediante etapas químicas o enzimáticas convencionales para reestablecer el grupo hidroxilo, tio, amino o carboxilo. El grupo de bloqueo que se puede retirar en particular usado no es crítico y los grupos de bloqueo de hidroxilo que se pueden retirar preferentes incluyen sustituyentes convencionales tales como alilo, bencilo, acetilo, cloroacetilo, tiobencilo, bencilidina, fenacilo, t-butildifenilsililo y cualquier otro grupo que se pueda introducir por vía química sobre un grupo funcional hidroxilo y posteriormente se puede retirar de forma selectiva ya sea mediante métodos químicos o enzimáticos en condiciones suaves compatibles con la naturaleza del producto. Los grupos protectores se desvelan con más detalle en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis" 2. sup.nd Ed., 1991, John Wiley and Sons, N.Y.

Los grupos de bloqueo de amino que se pueden retirar preferentes incluyen sustituyentes convencionales tales como t-butoxicarbonilo (t-BOC), benciloxicarbonilo (CBZ), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), aliloxicarbonilo (ALOC) y similares, que se pueden retirar mediante condiciones convencionales compatibles con la naturaleza del producto.

"Selectividad" o "especificidad" en general es una medida de las preferencias de unión de un ligando con respecto a diferentes receptores y/o una medida de las preferencias de unión de diferentes ligandos con respecto a un receptor. La selectividad de un ligando con respecto a su receptor diana en relación con otro receptor viene dada por la proporción de los respectivos valores de  $K_d$  (es decir, las constantes de disociación para cada complejo de ligando-receptor), o en los casos en los que se observa un efecto biológico por debajo de la  $K_d$ , la selectividad se da por la

proporción de los valores de CE<sub>50</sub> respectivos (es decir, las concentraciones que producen un 50 % de la respuesta máxima para el ligando que interactúa con los dos receptores distintos).

5 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que es suficiente para efectuar el tratamiento, como se ha definido anteriormente, cuando se administra a un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano que necesita un tratamiento de ese tipo. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y la patología que se está tratando, la gravedad de la afección y la forma de administración, y alguien con una experiencia habitual en la materia lo puede determinar de forma rutinaria.

10 El término "tratamiento", como se usa en el presente documento abarca cualquier tratamiento de una afección o enfermedad en un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, e incluye: (i) evitar que la enfermedad o afección se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado que la padece; (ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir causar la regresión de la afección; o (iv) aliviar las afecciones causadas por la enfermedad, es decir síntomas de la enfermedad.

15 Se entiende que los compuestos de la presente invención pueden existir en una o más formas estereoisoméricas (por ejemplo enantiómeros, diastereómeros). La presente invención incluye dentro de su alcance todas estas formas estereoisoméricas ya sea aisladas (por ejemplo en aislamiento enantiomérico), o en combinación (incluyendo mezclas racémicas).

20 La invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos más limitantes.

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1

Síntesis de *N*-Fmoc-1-*N*-glicinamidomaltotriósido.

30 En la técnica anterior existen numerosos ejemplos para la formación de glicosilaminas, cuyos métodos se pueden aplicar a una gama diversa de conjugados de oligosacárido.

35 En resumen, se disolvieron maltotriosa (1 g, ~2 mmol) y NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (160 mg, 2 mmol) en amoniaco (10 ml). La solución se incubó durante 32 horas a 40 °C antes de evaporación a sequedad en un evaporador centrífugo. Para retirar el amoniaco residual, el residuo se disolvió en la cantidad mínima de agua y se liofilizó. Una porción del residuo (820 mg) se disolvió en una mezcla de DMSO (10 ml), DMF (6 ml) y DIPEA (0,6 ml). Se añadieron Fmoc-glicina (1,2 g), HOBT (0,5 g) y HBTU (3 g) y la solución se incubó durante al menos 4 h antes de la adición de un volumen igual de agua y se acidificó con ácido acético (0,6 ml) para interrumpir la reacción. Después de enfriar y filtrar, el producto deseado se puede purificar mediante RP-HPLC preparativa. Por ejemplo, se inyectaron hasta 2 ml en una columna Exsil C18 de 250 mm x 10 mm de ID. La columna se eluyó con una mezcla de gradiente binario de disolvente A (TFA al 0,1 % que contiene acetonitrilo al 15 %) y disolvente B (acetonitrilo al 85 %). El gradiente comprendía B al 10 % durante 3 minutos, aumentado a un 50 % a los 15 minutos (para eluir el producto deseado), y a continuación un 90 % a los 16 minutos que se mantuvo durante 5 minutos (para eluir Fmoc-glicinamida y el exceso de Fmoc-gly). El caudal era de 2,5 ml/min. El eluyente se controló a 290 nm y las fracciones se recogieron con un automuestreador. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se concentraron en un evaporador centrífugo para retirar la mayor parte del acetonitrilo y a continuación se liofilizaron para proporcionar a polvo de color blanco, esponjoso (-0,6 g).

45 Los derivados de *N*-Fmoc-1-*N*-glicinamida de otros oligosacáridos se prepararon de una manera similar.

### 50 Ejemplo 2

Síntesis de polisulfato de *N*-Fmoc-1-*N*-glicinamidomaltotriósido.

55 El *N*-Fmoc-1-*N*-glicinamidomaltotriósido (0,5 g, 0,64 mmol) se disolvió en DMF seca (10 ml) y se añadió complejo de piridina y trióxido de azufre (3 g, 19 mmol). La solución se incubó a temperatura ambiente durante 48 h y se interrumpió mediante la adición de agua. El análisis de la mezcla de reacción por RP-IP HPLC con UV doble y ELSD indicaba un solo pico ancho, lo que indica que no se producía desprotección. El producto deseado se puede purificar mediante RP-HPLC preparativa, RP-IP HPLC o cromatografía AEX. Por ejemplo, se inyectaron hasta 2 ml en una columna Exsil C18 de 250 mm x 10 mm de ID. La columna se eluyó con una mezcla de gradiente binario de disolvente A (TFA al 0,1 %) y disolvente B (acetonitrilo al 50 %). El gradiente comprendía B al 6 % durante 3 minutos, aumentado a un 50 % a los 15 minutos. El caudal era de 2,5 ml/min. El eluyente se controló a 290 nm y las fracciones se recogieron con un automuestreador. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron a sequedad en un evaporador centrífugo. El producto se analizó por MALDI MS usando la técnica de cristalización de par iónico ion que se muestra en la Figura 1. El espectro indica claramente que el producto está persulfatado.

Ejemplo 3

Síntesis del Componente Básico A de Cloroacetilo (Esquema 1) para serie de maltotriosa.

5 Se añadieron agua y NaHCO<sub>3</sub> (0,2 g) polisulfato de *N*-Fmoc-1-*N*-glicinamidomaltotriósido y el pH se ajustó a 12,5 mediante la adición de NaOH 10 M. El producto protegido con Fmoc se disolvía totalmente a medida que el pH aumentaba, tras lo cual se formó un precipitado. El análisis de la mezcla de reacción por RP-IP HPLC indicaba la desprotección completa en 20 minutos. El pH se ajustó a 8,5 mediante la adición de ácido acético y la solución acuosa se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3 x 10 ml) y hexano (1 x 10 ml). Se añadieron anhídrido cloroacético (0,5 g) y NaHCO<sub>3</sub> (1 g) a la solución acuosa y, de forma periódica, el pH se ajustaba a 8,25 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub>. Después de 1 h, el análisis de la mezcla de reacción por RP-IP HPLC indicaba la reacción completa. El producto se purificó por AEX después de acidificar primero la reacción a pH 6 mediante la adición de HCl 2 M y NaCl 5 M añadidos para proporcionar una concentración final de aproximadamente NaCl 0,3 M. La solución se aplicó a un cartucho Econo-Q de 5 ml (Biorad, Sydney, Australia) y se lavó con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/ NaCl 0,6 M a pH 7 y el producto se eluyó con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/ NaCl 3 M a pH 7 y se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior. La concentración del producto se sometió a ensayo por RP-IP HPLC usando octasulfato de sacarosa como un patrón cuantitativo.

Ejemplo 4

20 Síntesis del Componente Básico C (Esquema 1) para serie de maltotriosa.

Las alícuotas del Componente Básico A de cloroacetilo se ajustaron a pH 8,25 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub>, isopropanol añadido para generar una solución al 30 % y un exceso molar de 10 veces de un ditiol elegido entre los Ditiolos 1 a 5 mostrados anteriormente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El exceso de ditiol se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3 x 10 ml) y hexano (1 x 10 ml). En los casos en los que el análisis indicaba la formación de disulfuros éstos se reducían mediante la adición de TCEP (sólido) 1 h antes de su purificación por AEX como se ha descrito anteriormente. Los productos purificados se sometieron a ensayo por RP-IP HPLC usando octasulfato de sacarosa como un patrón cuantitativo y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior. De esta manera, cada uno de los 5 componentes básicos de ditiol, correspondientes al acoplamiento del Componente Básico A de maltotriosa con cada uno de los conectores, se sintetizaron en paralelo.

Ejemplo 5

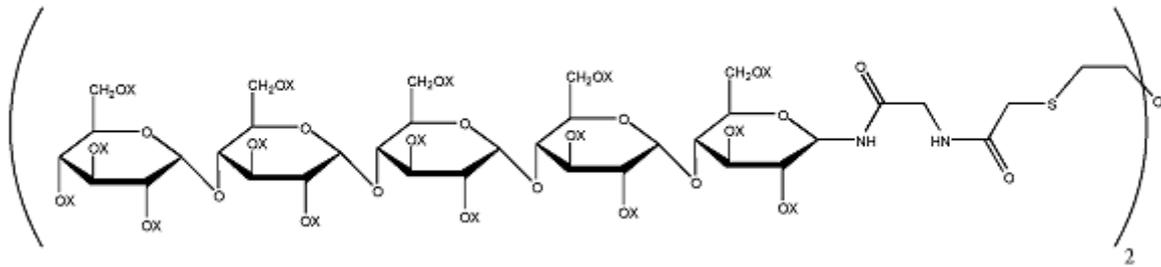
35 Síntesis de productos finales de polisulfato de *bis*maltotriosilo.

Un exceso de 1,5 molar del Componente Básico A de maltotriosa se mezcló con cada uno de los Componentes Básicos C de maltotriosa y el pH se ajustó a 9. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 2 días. En este momento no se detectaron productos ni de Componente Básico C de maltotriosa residual ni de disulfuro usando análisis por RP-IP con ELSD. Cuando los productos de disulfuro se detectaron después de unas pocas horas, éstos se podían reducir mediante la adición de TCEP. Si se desea, el TCEP se puede retirar por AEX como se ha descrito anteriormente. En cuyo caso, las fracciones recogidas se ajustan a pH 9 y se permite que la reacción evolucione adicionalmente, si era necesario, con una adición adicional de Componente Básico A.

45 Con el criterio de valoración deseado, las reacciones se diluyeron con un volumen igual de tributilacetato amónico 15 mM a pH 6 que contenía acetonitrilo al 15 % y los productos se purificaron por RP-IP HPLC usando una columna Exsil C18 de 250 mm x 10 mm de ID. La columna se eluyó con una mezcla de gradiente binario de disolvente A (tributilacetato amónico 15 mM a pH 6 que contenía acetonitrilo al 15 %) y disolvente B (acetonitrilo al 85 %). El gradiente comprendía B al 10 % durante 3 minutos, aumentado a un 50 % a los 20 minutos, y a continuación a un 90 % a los 22 minutos que se mantuvo durante 5 minutos. El caudal era de 2,5 ml/min. El eluyente se controló a 254 nm y las fracciones se recogieron con un automuestreador. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se concentraron en un evaporador centrífugo para retirar la mayor parte del acetonitrilo y a continuación se liofilizaron para proporcionar un polvo de color blanco, esponjoso.

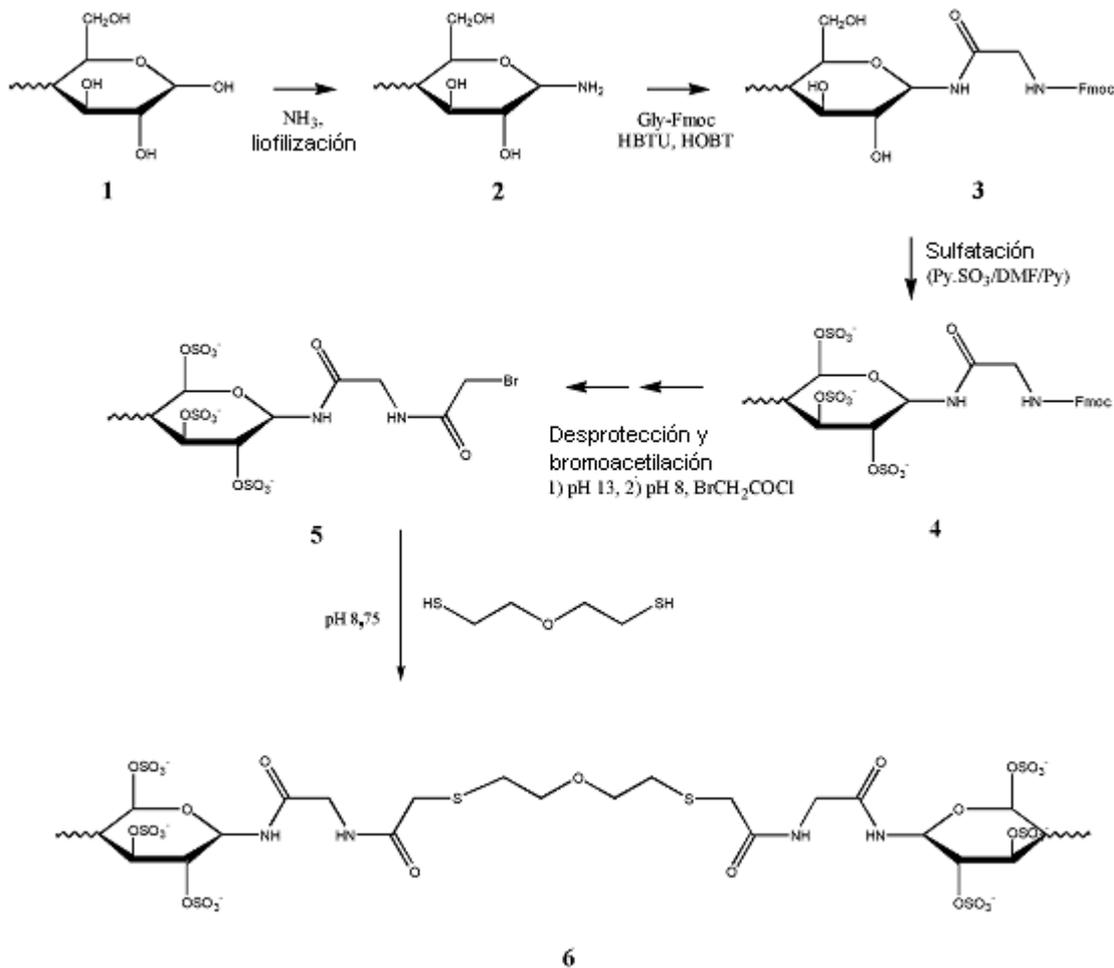
Ejemplo 6

55 Como materia prima se puede usar una mezcla de oligosacáridos de D.P. variable. El fraccionamiento de esta mezcla basándose en el tamaño se consigue por RP HPLC preparativa después de unir un grupo protector Fmoc hidrófobo. Con este modo, la retención disminuye a medida que el tamaño del oligosacárido aumenta. El grupo Fmoc se une a través de un compuesto intermedio de glicosilamina. La sulfatación del conjugado de oligosacárido-Fmoc se consigue con el complejo Py.SO<sub>3</sub> y el producto extraído de la mezcla de reacción usando RP-IP HPLC preparativa. La posterior desprotección y bromoacetilación de la amina se realiza en el mismo recipiente y proporciona un derivado de bromoacetilo. Esto se hace reaccionar (en exceso) con el Ditiol 2 para generar el producto final (X = H o SO<sub>3</sub>Na):



El agente de emparejamiento iónico usado durante las etapas de HPLC, tributilamina, es inerte durante estas manipulaciones. El producto deseado se purifica por RP-IP HPLC preparativa.

5 En el Esquema 2 se muestra un resumen de la ruta de síntesis para la preparación de sulfomaltopentaosa-tetraetilenglicol-sulfomaltopentaosa y se describe a continuación. Con fines de claridad, en el esquema se representa solamente una porción de cada una de las cadenas de maltopentaosa.



10

Método:

15

1. Se disolvieron jarabe de malto-oligosacárido (por ejemplo, jarabe pentrup de Hayashibara o jarabe de maíz, 50 g) y NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (6 g) en amoniaco al 25 % (375 ml) y se incubó a 40 °C durante 40 h. La mezcla se evaporó en evaporador rotatorio a sequedad, se disolvió en la cantidad mínima de agua y de nuevo se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en la cantidad mínima de agua y se añadieron 3 volúmenes de etanol con mezcla. Se permitió que la mezcla sedimentara durante una noche y el sobrenadante se decantó. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de agua y de nuevo se evaporó a sequedad para producir el compuesto 2 del Esquema 2 en forma de una goma.

20

2. Se disolvieron Fmoc-gly-OH (11 g), hidroxibenzotriazol (HOBT, 27,5 g), hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU, 4,9 g) y TEA (4,9 ml) en una mezcla de 120 ml de DMSO y 30 ml de DMF. La solución resultante se añadió al resto de oligosacárido y la mezcla se agitó durante una noche. La reacción se interrumpió mediante la adición de agua (500 ml) y ácido acético glacial (5 ml) y se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. El precipitado formado se retiró y se descartó. El agua madre se lavó con acetato de etilo (3 x 100 ml) y hexano (1 x 100 ml). El acetato de etilo residual y hexano en la fase acuosa se retiraron mediante concentración en un evaporador rotatorio y la solución se diluyó a 600 ml mediante la adición de agua.

3. La mezcla se fraccionó mediante HPLC en fase inversa preparativa mediante inyección repetida.

Condiciones del ejemplo -

Columna: Phenomenex Axia 100 x 21,2 mm Luna C18 (2) equipada con un cartucho protector de seguridad (o sustituto adecuado).

Eluyente A: ácido fórmico al 0,1 %.

Eluyente B: acetonitrilo al 80 %.

Flujo: 20 ml/min.

Detector: UV a 270 nm.

La fracción deseada se recogió y se concentró en un evaporador rotatorio y la solución resultante se liofilizó para producir aproximadamente 6 g de polvo de color blanco del derivado de Fmoc de maltopentaosa (M<sub>5</sub>gly-Fmoc) obtenido a partir de jarabe pentrup. El perfil de elución de HPLC se muestra en la Figura 2.

4. Se disolvió M<sub>5</sub>gly-Fmoc (6 g) en DMF (100 ml), se añadió complejo de Py.SO<sub>3</sub> (42 g) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se interrumpió mediante la adición de agua (500 ml) y el pH se ajustó a 6 mediante la adición de tributilamina. El M<sub>5</sub>gly-Fmoc sulfatado se extrajo usando HPLC de emparejamiento iónico en fase inversa preparativa mediante inyección repetida.

Condiciones del ejemplo -

Columna: Phenomenex Axia 100 x 21,2 mm Luna C18 (2) equipada con un cartucho protector de seguridad (o sustituto adecuado).

Eluyente A: tributilamina 8 mM en acetonitrilo al 20 % con el pH ajustado a 5,8 con ácido acético.

Eluyente B: acetonitrilo al 80 %.

Flujo: 20 ml/min.

Detector: UV a 270 nM.

La fracción o fracciones deseadas se concentran en un evaporador rotatorio para producir una solución del compuesto sulfatado 4 del Esquema 2 (SM<sub>5</sub>gly-Fmoc).

5. El SM<sub>5</sub>gly-Fmoc se desprotegió ajustando a > pH 13 con NaOH y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El ppt/aceite se extrajo con 2 x 50 ml hexano y se descartó. La amina resultante se bromoacetiló en el mismo recipiente después de ajustar el pH a 8,25. Se añadieron alícuotas de 3 x 1,2 g de cloruro de bromoacetilo a intervalos de 15 minutos a la solución con un control constante del pH y adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para mantener el pH en 8-8,25.

La evolución de esta reacción se controló por RP-IP HPLC analítica. Condiciones del ejemplo -

Columna: Phenomenex Luna 30 x 4,6 mm C18 (2) equipada con un cartucho protector de seguridad.

Eluyente A: tributilamina 8 mM en acetonitrilo al 20 % ajustado a pH 5,8 con ácido acético.

Eluyente B: acetonitrilo al 80 %.

Flujo: 1 ml/min.

Detector: UV a 270 nM y ELSD.

El derivado bromoacetilado deseado se precipitó mediante la adición de 3 volúmenes de etanol y la mezcla se enfrió a 4 °C. El precipitado se separó y se volvió a disolver en AcONa 0,4 M a pH 7 y se volvió a precipitar mediante la adición de 3 volúmenes de etanol y la mezcla se enfrió a 4 °C. El sólido, que corresponde al compuesto 5 del Esquema 2, se disolvió en la cantidad mínima de agua y se sometió al ensayo mediante SEC como se ha descrito anteriormente usando sulfato de β-ciclodextrina como patrón. A una solución que contenía aproximadamente 450 mg de compuesto 5 del Esquema 2 se añadió EDTA 0,2 M (200 µl), NaHCO<sub>3</sub> 1 M (2 ml) y se ajustó a pH 8,75. Se añadieron isopropanol (3 ml) y 2,2'-oxidietanotiol (17 µl) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añade una cantidad adicional de 17 µl de 2,2'-oxidietanotiol y la solución se agita durante una noche. La reacción se controló por RP-IP HPLC como se ha descrito anteriormente. La reacción se controló por RP-IP HPLC analítica como se ha descrito anteriormente. En esta técnica también se observa el compuesto intermedio transitorio resultante de la condensación de un conjugado de bromoacetilo con un solo tiol del tetraetilenglicol.

6. Un compuesto 7 del Esquema 2 se purificó por RP-IP HPLC preparativa como se ha descrito anteriormente. La fracción apropiada se concentra por evaporación rotatoria y se liofiliza para retirar el exceso de acetato de tributilamina.

7. El residuo se disolvió en agua y la solución resultante se ajustó a pH 5,5 con ácido acético. Esta solución se aplica a una columna de 4 x 2 cm de Dowex 50WX8 (forma de Na<sup>+</sup>) 2 x 4 cm y se lavó con 3 volúmenes de columna de agua. El flujo continuo y los lavados se recogen y se combinan.

8. Los lavados combinados se ajustaron a pH 7 y se dializaron mediante ultrafiltración repetida con una membrana de MWCO de 1 kDa.

9. La solución concentrada se liofilizó para producir un polvo de color blanco.

#### 5 Ejemplo 7

Los conjugados de maltooligosacáridos de D.P. diferente se preparan de una manera similar mediante selección de la fracción apropiada en la etapa 3 en el ejemplo 6 mencionado anteriormente.

#### 10 Ejemplo 8

Los conjugados de otros oligosacáridos se preparan de una manera similar seleccionando la fracción de oligosacárido puro apropiado de la mezcla de oligosacáridos en la etapa 1 en el ejemplo 6 y seleccionando posteriormente la fracción apropiada en la etapa 3.

#### 15 Ejemplo 9

Los conjugados de oligosacáridos con un conector diferente se preparan por sustitución de un compuesto de ditiol diferente en la etapa 5 en el ejemplo 6.

20 De una manera similar, el compuesto de ditiol se puede variar en los métodos de los ejemplos 7 y 8.

#### Ejemplo 10

#### 25 Ensayo de Identificación Sistemática con BIAcore

El fenómeno óptico de resonancia de plasmones superficiales se usa para controlar las interacciones físicas entre moléculas. El paso de una solución de un ligando de proteína potencial (por ejemplo, IL-4, IL-5, eotaxina-1, eotaxina-2, IL-8 o MCP-1) sobre una superficie de sensor a la que se acopla una diana (por ejemplo, heparina) controla la unión en tiempo real de ligandos de proteína a la diana inmovilizada. La detección se consiguen midiendo cambios de índice de refracción muy próximos a la superficie del sensor. Cuando el índice de refracción se altera, el ángulo en el que se produce la resonancia de plasmones cambia y este cambio se correlaciona directamente con la cantidad de proteína que interactúa con la superficie. De forma conveniente se usa un A BIAcore 2000. Es muy sensible y su microfluidez asegura que solamente se necesitan pequeñas cantidades de material.

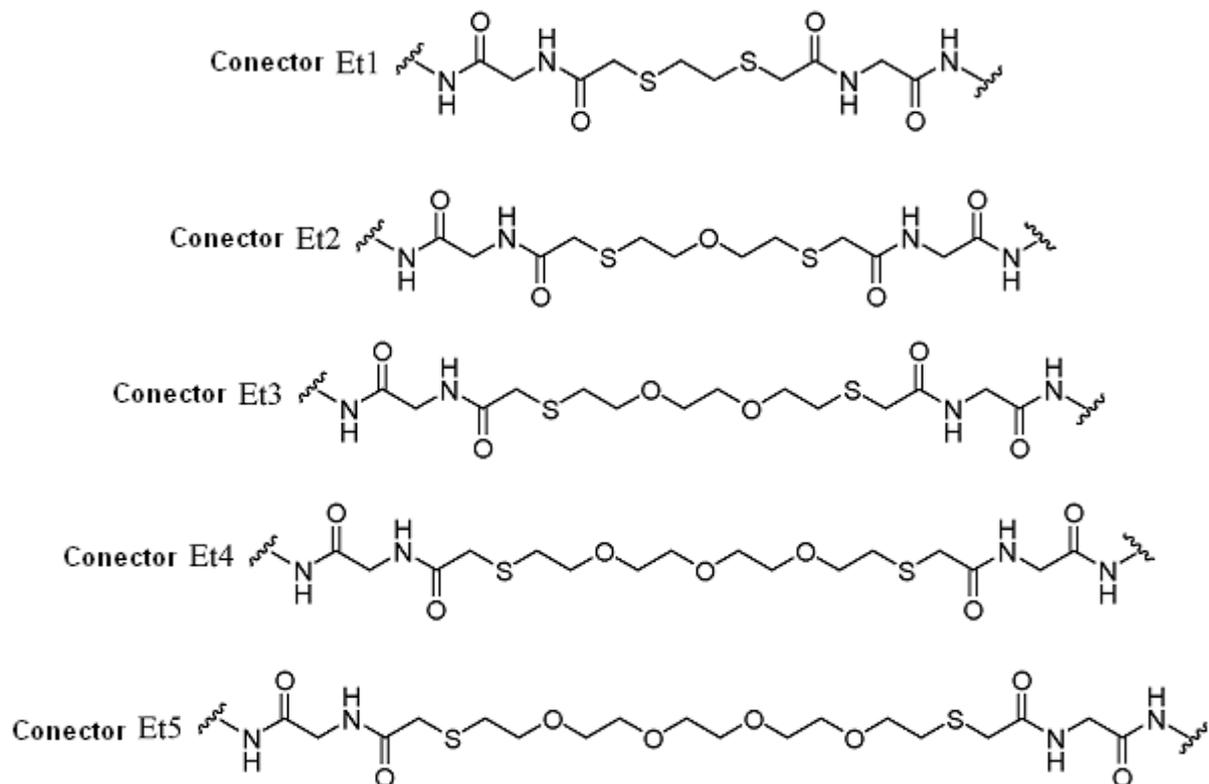
35 La heparina biotinilada se inmoviliza en el chip de biosensor. La biotinilación se produce *a través de* grupos amino, o extremos reductores modificados con amoniaco mediante aminación reductora, usando sulfo-NHS-biotina. Las soluciones que contienen ligandos de proteína potencial es de interés se inyectaron sobre la superficie del chip sensor, y la unión se mide en tiempo real (Fernig, En: Proteoglycan protocols, Ed. R.V. Iozzo, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2001). Con este método el baculovirus que expresa IL-4 humana recombinante (rhIL-4) y el baculovirus que expresa IL-5 humana recombinante (rhIL-5) se unen rápidamente a la heparina inmovilizada (véase el documento PCT/AU2005/000551). La unión específica, ya que hay poca interacción de cualquiera de IL-4 o IL-5 con chips sensores que carecen de heparina. De forma análoga, la eotaxina-1 humana recombinante (CCL11) expresada en *E. coli* se une rápidamente a la heparina inmovilizada y la unión específica ya que existe poca unión de la eotaxina a los chips sensores que carecen de heparina (véase el documento 30544601 PCT/gllcan151). De forma análoga la IL-8 recombinante humana (CXCL8), MCP-1 (CCL2) y eotaxina-2 (CCL24) expresadas en *E. coli* se unen rápidamente a la heparina inmovilizada y la unión es específica ya que existe poca unión a chips sensores que carecen de heparina.

50 Las preparaciones de los diversos conjugados de oligosacárido aniónico de oligosacáridos sulfatados inhiben la unión de IL-4, IL-5, eotaxina-1, eotaxina-2, IL-8 y MCP-1 a la heparina inmovilizada en el chip de BIAcore (Tabla 1 y Tabla 2).

55 Dentro de cada uno de los conjugados de oligosacárido aniónico que se muestran en las Tablas que siguen a continuación, los dos oligosacáridos son los mismos. Los compuestos de este tipo en modo alguno pretende limitar los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención a los conjugados que portan componentes idénticos de oligosacárido S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup>. En algunas realizaciones S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> son oligosacáridos diferentes. De forma análoga, el hecho de que los oligosacáridos mostrados en las tablas que siguen a continuación estén persulfatados no limita en modo alguno que los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención contengan esos oligosacáridos que están persulfatados. En algunas realizaciones los oligosacáridos están parcialmente sulfatados, y/o contienen grupo funcional fosfato, etc.

60 En las Tablas que siguen a continuación los conectores indicados por Et1, Et2, Et3, Et4 y Et5 son como se representan a continuación:

65



5 Se observara que el conector Et1 se puede formar usando el Ditiol 1, Et2 se puede formar usando el Ditiol 2, Et3 se puede formar usando el Ditiol 3, Et4 se puede formar usando el Ditiol 4 y Et5 se puede formar usando el Ditiol 5.

10 Algunos conjugados de oligosacárido aniónico tienen una actividad mucho mayor que otros. A partir de estos datos, los conjugados de oligosacárido aniónico con la actividad más elevada son los de la serie con maltosa sulfatada unida y en particular los conjugados de maltopentaosa sulfatada unida. Aunque dependiendo de la proteína sometida a ensayo también se observa una actividad de unión con maltotetraosas sulfatadas unidas, esta actividad de unión no es tan grande como la de la serie de conjugado de oligosacárido aniónico con maltopentaosa sulfatada.

15 Los conjugados de oligosacárido aniónico que comprenden las estructuras de maltopentaosa sulfatada se unen mucho mejor a IL-8 y de ese modo inhiben la unión de IL-8 a la heparina mejor que los conjugados de oligosacárido aniónico que comprenden las estructuras de tetraosa sulfatada. Los requisitos estructurales para la unión a MCP-1 son menos rigurosos ya que tanto la maltopentaosa como la maltotetraosa que contienen conjugados de oligosacárido aniónico unidos son aproximadamente las mismas. MCP-1 también se puede unir a conjugados basándose en una estructura principal de sacárido diferente, pero menos bien que la serie de maltopentaosa. MCP-1 se une a los xilanos sulfatados unidos ligeramente mejor de lo que se une a la heparina y parece que dentro de esta serie, los conjugados de oligosacárido aniónico con xilopentaosa sulfatada unidos por los mismos conectores, por ejemplo Et1 o Et3 son preferentes.

25 Las diferencias en la capacidad de Eotaxina-1 y Eotaxina-2 para unirse a los diversos conjugados de oligosacárido aniónico son notables. La Eotaxina-1 solamente se une a la serie de maltopentaosa sulfatada, uniéndose en aproximadamente la misma extensión que la heparina para conjugados de oligosacárido aniónico con el conector Et2 y el conector Et5, pero la unión es mejor que la heparina cuando el conjugado de oligosacárido aniónico contiene el conector Et4 (Compuesto ID 9). Por el contrario, la Eotaxina-2 se une a la serie de maltopentaosa sulfatada de una manera significativamente mejor que la heparina con el conector Et5 siendo ligeramente preferente.

30 La Eotaxina-2 también se une a la serie de la maltotetraosa sulfatada mejor que la heparina, pero dentro de esta serie la unión era mejor a un conjugado de oligosacárido aniónico con un conector corto (conector Et2, Compuesto ID 12) en lugar de con el conector largo (conector Et5, Compuesto ID 15). La Eotaxina-2 mostraba una cierta actividad de unión con la serie de xilano unido sulfatado pero ésta era más débil que la del alcance de la Eotaxina-2 unida a heparina.

35

La importancia de la longitud del conector para su unión varía de proteína. Para Eotaxina-2, MCP-1 y IL-8 es preferente una maltopentaosa sulfatada con un conector Et5 (Compuesto ID 10) para una unión más elevada, mientras que para la Eotaxina-1 es preferente una maltopentaosa sulfatada con un conector Et4 (Compuesto ID 9).

40 Los datos de unión a IL-4 sugieren que la longitud del conector tiene menos importancia siempre y cuando el conector no se haga demasiado largo, ya que había poca diferencia entre la maltopentaosa sulfatada con un

conector Et2 (Compuesto ID 7) y una maltopentaosa sulfatada con un conector Et4 (Compuesto ID 9), pero una maltopentaosa sulfatada con un conector Et5 presenta una reducción de la capacidad de unión. Por el contrario, parece que IL-5 necesita una maltopentaosa sulfatada con un conector Et4 (Compuesto ID 9) para una unión mejor. Por lo tanto, la eficacia de los compuestos varía de acuerdo con su estructura subyacente y de acuerdo con la proteína implicada en la unión a heparina y no es evidente antes de identificar de forma sistemática cuál de los conjugados de oligosacárido aniónico será más eficaz.

5

Estos datos también indican que los conjugados de oligosacárido aniónico se unen a IL-4 en el sitio en el que se une la heparina y que la unión de los conjugados de oligosacárido aniónico a esta región es más estable que la de la unión a heparina. Estos datos indican del mismo modo que los conjugados de oligosacárido aniónico se unen a IL-5 en el sitio en el que se une la heparina y que su unión a esta región es más estable que la de la unión a heparina.

10

Tabla 1: Capacidad de diversos conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la unión de quimioquinas a heparina inmovilizada sobre una superficie de biosensor de BIAcore

			% de inhibición de la unión de quimioquina a chip de heparina			
			Eotaxina-1	Eotaxina-2	IL-8	MCP-1
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector				
1	Maltotriosa	Et1				
2	Maltotriosa	Et2				
3	Maltotriosa	Et3				
4	Maltotriosa	Et4				
5	Maltotriosa	Et5		166,7		30,0
6	Maltopentaosa	Et1				
7	Maltopentaosa	Et2	108	16,7	19	5,6
8	Maltopentaosa	Et3				
9	Maltopentaosa	Et4	71,4	15	14,6	6,4
10	Maltopentaosa	Et5	107,1	9,2	7,3	2,4
11	Maltotetraosa	Et1				
12	Maltotetraosa	Et2	> 200	33,3	116,7	7,5
13	Maltotetraosa	Et3			187,5	
14	Maltotetraosa	Et4			125,0	
15	Maltotetraosa	Et5		66,7	> 200	15
66	Quitotetraosa	Et1				
67	Quitotetraosa	Et2	> 200	> 200	> 200	> 200
68	Quitotetraosa	Et3				
69	Quitotetraosa	Et5				
70	Quitopentaosa	Et1		> 200		
71	Quitopentaosa	Et2				
72	Quitopentaosa	Et3				
73	Quitopentaosa	Et4				
74	Quitopentaosa	Et5				
75	Xilotetraosa	Et1	> 200	83,3		82,5
76	Xilotetraosa	Et2				
77	Xilotetraosa	Et3		166,7		
78	Xilotetraosa	Et4				
79	Xilotetraosa	Et5		166,7		

ES 2 634 454 T3

			% de inhibición de la unión de quimioquina a chip de heparina			
			Eotaxina-1	Eotaxina-2	IL-8	MCP-1
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector				
80	Xilopentaosa	Et1	> 200	125	> 200	61,9
81	Xilopentaosa	Et2				
82	Xilopentaosa	Et3	> 200		> 200	75
83	Xilopentaosa	Et4				
84	Xilopentaosa	Et5		125	> 200	84,4
	Heparina		100	100	100	100

Los datos de conjugado de oligosacárido aniónico se expresan como un % con respecto a la concentración de heparina necesaria para inhibir la unión de quimioquina en un 50 %. El porcentaje se establece como un 100 % para la heparina. Los valores inferiores a un 100 % indican que los conjugados de oligosacárido aniónico son mejores que la heparina para la unión a la quimioquina y bloqueando su unión a la heparina en el chip. Por el contrario, los valores superiores a un 100 % indican que los inhibidores son peores que la heparina para bloquear las quimioquinas a partir de la unión a heparina en el chip.

Tabla 2: Capacidad de diversos conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la unión de IL-4 e IL-5 a heparina inmovilizada sobre una superficie de biosensor de BIAcore

			Unión de IL-4 a chip de heparina			Unión de IL-5 a chip de heparina		
			% de unión de IL-4*		CI <sub>50</sub> , nM	% de unión de IL-5*		CI <sub>50</sub> , nM
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	Criterio de valoración de heparina	Biotina-heparina	Criterio de valoración de heparina	Criterio de valoración de heparina	Biotina-heparina	Biotina-heparina
1	Maltotriosa	Et1		31 %				
2	Maltotriosa	Et2		33 %	12000			> 20000
3	Maltotriosa	Et3		39 %				
4	Maltotriosa	Et4		38 %				
5	Maltotriosa	Et5		37 %				
6	Maltopentaosa	Et1		0 %				
7	Maltopentaosa	Et2		0 %	33			350
8	Maltopentaosa	Et3		0 %				200
9	Maltopentaosa	Et4			25			50
10	Maltopentaosa	Et5		0 %	120			
11	Maltotetraosa	Et1		0 %				
12	Maltotetraosa	Et2		0 %				800
13	Maltotetraosa	Et3		5 %				
14	Maltotetraosa	Et4		23 %				
15	Maltotetraosa	Et5		0 %				
66	Quitotetraosa	Et1	62 %	30 %		95 %	89 %	
67	Quitotetraosa	Et2	13 %	4 %	1250	4 %	3 %	950
68	Quitotetraosa	Et3	99 %	68 %		99 %	98 %	
69	Quitotetraosa	Et5	83 %	54 %		92 %	89 %	
70	Quitopentaosa	Et1	100 %	60 %		97 %	95 %	
71	Quitopentaosa	Et2	88 %	48 %		95 %	90 %	

			Unión de IL-4 a chip de heparina			Unión de IL-5 a chip de heparina		
			% de unión de IL-4*		CI <sub>50</sub> , nM	% de unión de IL-5*		CI <sub>50</sub> , nM
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	Criterio de valoración de heparina	Biotina-heparina	Criterio de valoración de heparina	Criterio de valoración de heparina	Biotina-heparina	Biotina-heparina
72	Quitopentaosa	Et3	100 %	69 %		100 %	98 %	
73	Quitopentaosa	Et4	100 %	72 %		100 %	99 %	
74	Quitopentaosa	Et5	83 %	46 %		93 %	89 %	
75	Xilotetraosa	Et1	30 %	11 %	2500	73 %	60 %	
76	Xilotetraosa	Et2	54 %	27 %		95 %	90 %	
77	Xilotetraosa	Et3	50 %	23 %		94 %	87 %	
78	Xilotetraosa	Et4	57 %	30 %		92 %	87 %	
79	Xilotetraosa	Et5	56 %	30 %		94 %	90 %	
80	Xilopentaosa	Et1	25 %	8 %	1450	67 %	52 %	1000
81	Xilopentaosa	Et2	33 %	13 %		77 %	65 %	
82	Xilopentaosa	Et3	31 %	12 %	2000	79 %	67 %	
83	Xilopentaosa	Et4	32 %	13 %		83 %	72 %	
84	Xilopentaosa	Et5	26 %	10 %	2500	70 %	58 %	
	Heparina				3300			37

Se muestran los datos para dos métodos de inmovilización de heparina: Biotina-heparina = etiquetado con biotina de grupos amino; Criterio de valoración de heparina = biotinilación de extremos reductores. \*El % de unión de citoquina en presencia de los diversos conjugados de oligosacárido aniónico con respecto a nivel de unión obtenida en ausencia de conjugado de oligosacárido aniónico se calculó con una concentración de conjugado de oligosacárido aniónico de 5 µM para ID 1-15; 8 µM para ID 66-74 y 10 µM para ID 75-84.

#### Ejemplo 11

10 Análisis funcionales de conjugados de oligosacárido aniónico con respecto a la diana de proteína de asma y rinitis alérgica, IL-5

15 Los diversos conjugados de oligosacárido aniónico inhibían la proliferación de una línea celular sensible a IL-5 en grados diferentes. Esto se produce a dosis muy bajas y no se debe a un efecto tóxico del conjugado de oligosacárido aniónico, ya que otros polisacáridos sulfatados del mismo modo no tienen efecto en este ensayo. Estos experimentos se realizan con las células sensibles a IL-5, Ba/F-IL-5. Las células Ba/F-IL-5 se obtuvieron a partir de la línea celular Ba/F3.

20 La línea celular Ba/F3 se transformó para que fuera tanto dependiente de IL-5 como para expresar a luciferasa por cotransfección de las células con el vector de control pGL3 (Promega, USA) y pEE6hcmv-IL-5R $\alpha$ . El vector de control, pGL3, expresa una luciferasa modificada bajo el control directo del promotor y potenciador SV40, pero no contiene marcador seleccionable. Para preparar pEE6hcmv-hIL-5R $\alpha$ , se clonó una cadena  $\alpha$  de receptor de IL-5 humana de longitud completa (hIL-5R- $\alpha$ ) mediante RT PCR a partir de células HL60. La preparación de las células Ba/F-IL-5 ha sido descrita por Coombe *et al*, Journal of Immunological Methods 215: 145-150, 1998. Las células Ba/F-IL-5 se pueden modificar adicionalmente por cotransfección con PPGK-puromicina-luciferasa, un vector que contiene luciferasa bajo el control del promotor SV40 con el marcador seleccionable puromicina.

30 Después de la transfección, los transfectantes positivos se seleccionan en 3 µg/ml de puromicina. Los transfectantes positivos se clonan a continuación para producir una línea con expresión de luciferasa detectable. Los ensayos de proliferación se llevan a cabo en microplacas de 96 pocillos adecuadas para los ensayos de este tipo (Falcon). Los pocillos son de fondo plano, con lados blancos y un fondo transparente. Las células se lavan para retirar cualquier citoquina en el medio de crecimiento y a continuación se vuelven a suspender en RPMI/FCS al 5 % en p/v. El recuento de las células se realiza con un Analizador de Recuento y Tamaño de Partículas Coulter Z2 (Coulter Electronics, Inglaterra) y de forma rutinaria se añaden 1,6 x 10<sup>4</sup> células a pocillos de microplacas que no contienen ni IL-5 (control negativo) o diversas diluciones de IL-5. Cuando se va a medir el efecto de los conjugados de oligosacárido aniónico, o de otros polisacáridos sulfatados, los pocillos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas.

Las células proliferan durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada, tras lo cual la actividad de luciferasa se mide mediante la adición de 50 µl de tampón de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, MgSO<sub>4</sub> 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 Triton X-100 al 0,5 % en v/v). Inmediatamente después de la adición del tampón de luciferasa la placa se somete a ensayo para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un aparato de recuento de Múltiples etiquetas Víctor 1420 (Wallac, Turku, Finlandia). Usando este ensayo se ha demostrado que algunos de los conjugados de oligosacárido aniónico son inhibidores muy eficaces de la proliferación de células Ba/F-IL-5 dependiente de IL-5 mientras que otros son menos eficaces (Tabla 3).

Parece que el componente sacárido del conjugado de oligosacárido aniónico es importante para la actividad. Parece que es importante tanto el tamaño del oligosacárido como la composición subyacente. Los pentasacáridos unidos son inhibidores más eficaces que los tetrasacáridos unidos y de los pentasacáridos unidos la serie de maltosa sulfatada unida era la más eficaz pero los pentasacáridos de xilano sulfatados unidos también presentaban una actividad considerable, en particular a 10 µg/ml. En este ensayo no parece que la longitud del conector sea tan importante aunque posiblemente son preferentes los conectores Et4 y Et5. Por lo tanto, las mejores de la serie de maltopentaosa sulfatada unida eran las ID 7 - 10 y las mejores de la serie de xilopentaosa sulfatada unida eran ID 83 y 84, con la serie de quitosano sulfatado unido teniendo poca actividad.

Tabla 3: La capacidad de los conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la proliferación celular dependiente de IL-5

			% de Inhibición de la proliferación de células Ba/F-IL-5 estimulada por IL-5	
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	Conjugado de oligosacárido aniónico (1 µg/ml)	Conjugado de oligosacárido aniónico (10 µg/ml)
1	Maltotriosa	Et1	0	39,6 ± 7,6
2	Maltotriosa	Et2	0	45,2 ± 7,6
3	Maltotriosa	Et3	1 ± 0,2	31,1 ± 4,9
4	Maltotriosa	Et4	1,1 ± 0,2	30,7 ± 4,5
5	Maltotriosa	Et5	7,1 ± 1,3	26,4 ± 3,3
6	Maltopentaosa	Et1	52,3 ± 6,8	63,5 ± 7,1
7	Maltopentaosa	Et2	41,5 ± 3,7	59,5 ± 7,4
8	Maltopentaosa	Et3	49,9 ± 5	62,3 ± 9,5
9	Maltopentaosa	Et4	45,3 ± 6,5	62,7 ± 8,8
10	Maltopentaosa	Et5	51,2 ± 5,2	59,7 ± 4,4
11	Maltotetraosa	Et1	15,1 ± 1,8	53,8 ± 6,3
12	Maltotetraosa	Et2	8,4 ± 1,1	46,1 ± 4,4
13	Maltotetraosa	Et3	4,7 ± 0,4	40 ± 5,1
14	Maltotetraosa	Et4	9,0 ± 1	39,8 ± 2,9
15	Maltotetraosa	Et5	6,2 ± 1,1	46,3 ± 7,5
66	Quitotetraosa	Et1	8,6 ± 1	16,1 ± 2,1
67	Quitotetraosa	Et2	8,2 ± 1,1	28,8 ± 4,8
68	Quitotetraosa	Et3	0	23,7 ± 4,5
69	Quitotetraosa	Et5	15,9 ± 2,4	33,8 ± 5,0
70	Quitopentaosa	Et1	12,6 ± 1,4	31,5 ± 3,2
71	Quitopentaosa	Et2	13,4 ± 1,4	29,8 ± 4,9
72	Quitopentaosa	Et3	7,8 ± 0,9	22,0 ± 3,3
73	Quitopentaosa	Et4	17,3 ± 1,9	34,4 ± 5,3
74	Quitopentaosa	Et5	22,4 ± 4,4	34 ± 3,4

			% de Inhibición de la proliferación de células Ba/F-IL-5 estimulada por IL-5	
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	Conjugado de oligosacárido aniónico (1 µg/ml)	Conjugado de oligosacárido aniónico (10 µg/ml)
75	Xilotetraosa	Et1	0	27,9 ± 3,5
76	Xilotetraosa	Et2	5,2 ± 0,5	33,1 ± 3,4
77	Xilotetraosa	Et3	2,7 ± 0,2	37,2 ± 2,4
78	Xilotetraosa	Et4	6,4 ± 0,6	35,3 ± 2,0
79	Xilotetraosa	Et5	8,8 ± 0,8	30,3 ± 1,6
80	Xilopentaosa	Et1	16,9 ± 1,3	54,7 ± 4,7
81	Xilopentaosa	Et2	14,7 ± 1,2	57,1 ± 8,4
82	Xilopentaosa	Et3	14,4 ± 1,8	53,5 ± 5,9
83	Xilopentaosa	Et4	20,6 ± 1,9	57,1 ± 6,7
84	Xilopentaosa	Et5	21,1 ± 2	57,7 ± 6,2

### Ejemplo 12

Análisis funcionales de conjugados de oligosacárido aniónico con respecto a la proteína diana de asma, IL-4

5

Los diversos conjugados de oligosacárido aniónico inhibían la proliferación de una línea de células sensibles a IL-4 en grados diferentes. Esto se produce a dosis muy bajas y no se debe a un efecto tóxico del conjugado de oligosacárido aniónico porque otros, polisacáridos sulfatados del mismo modo, en las mismas concentraciones de IL-4 y polisacárido no tienen 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 su crecimiento en IL-4 o IL-5. Las células TF-1 se establecieron originalmente a partir de una muestra de médula ósea de un macho con pantocitopenia severa. Estas células son dependientes de IL-3 o GM-CSF para crecimiento a largo plazo y son sensibles a una diversidad de citoquinas incluyendo IL-4.

10

15

Las células TF-1.8 se transfectaron con el gen de luciferasa de luciérnaga contenido en el vector de expresión, pPGK-puromicina-luciferasa (Coombe *et al*, 1998, *mencionado anteriormente*). Los transfectantes positivos se clonan para producir una línea con buena expresión de luciferasa. Los ensayos de proliferación se llevan a cabo en microplacas de 96 pocillos adecuadas para los ensayos de este tipo (Falcon). Los pocillos son de fondo plano, con lados blancos y un fondo transparente. Las células se lavan para retirar cualquier citoquina en el medio de crecimiento y a continuación se vuelven a suspender en RPMI/FCS al 5 % en p/v. El recuento de las células se realiza con un Analizador de Recuento y Tamaño de Partículas Coulter Z2 (Coulter Electronics, Inglaterra) y de forma rutinaria se añaden  $2,5 \times 10^4$  células a pocillos de microplacas que no contienen ni IL-4 (control negativo) o diversas diluciones de IL-4. Cuando se va a medir el efecto de los conjugados de oligosacárido aniónico, o de otros polisacáridos sulfatados, los pocillos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas.

20

25

Las células proliferan durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada, tras lo cual la actividad de luciferasa se mide mediante la adición de 50 µl de tampón de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, MgSO<sub>4</sub> 15 mM, DTT 33,3 mM, EDTA 0,1 mM, Na-luciferina 0,5 mM, ATP 0,5 mM, 0,25 mM litio Co A y Triton X-100 al 0,5 % en v/v). Inmediatamente después de la adición del tampón de luciferasa la placa se somete a ensayo para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un aparato de recuento de Múltiples etiquetas Víctor 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

30

35

Usando este ensayo, los inventores demostraron que algunos conjugados de oligosacárido aniónico inhibían de forma muy notable la proliferación de células TF-1.8 dependiente de IL-4 mientras que otros eran menos activos (Tabla 4).

40

Parece que el componente sacárido del conjugado de oligosacárido aniónico es importante para la actividad. Parece que es importante tanto el tamaño del oligosacárido como la composición subyacente. Los pentasacáridos unidos son inhibidores más eficaces que los tetrasacáridos unidos y de los pentasacáridos unidos la serie de maltosa sulfatada unida era la más eficaz pero los pentasacáridos de xilano sulfatados unidos también presentaban una actividad considerable. De forma interesante algunos de los conectores de conjugados de oligosacárido aniónico de maltotetraosa sulfatada unida con conectores pequeños (Et1 y Et2) presentaban una actividad similar a la de las maltopentaosas sulfatadas unidas, pero las maltotetraosas sulfatadas unidas con conectores más largos

5 presentaban una reducción de la actividad. Por lo tanto, parece que es preferente una presentación continua de restos sulfatados en una estructura principal de maltosa en lugar de grupos de restos sulfatados presentados en una estructura principal de maltosa separada por una región no sacárida, sulfatada. Los conjugados de oligosacárido aniónico con la mejor actividad fueron los que presentan las ID del Compuesto 6-10. De la serie de xilano unido sulfatado, las estructuras de pentasacárido unido eran más activas que los tetrasacáridos unidos y en el equilibrio de estos pentasacáridos sulfatados unidos eran preferentes las que presentaban un conector de tamaño Et2 y Et3.

Tabla 4: La capacidad de los conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la proliferación celular dependiente de IL-4

			% de Inhibición de la proliferación de células TF1.8 estimulada por IL-4		
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	Conjugado de oligosacárido aniónico (2,5 µg/ml)	Conjugado de oligosacárido aniónico (5 µg/ml)	Conjugado de oligosacárido aniónico (10 µg/ml)
1	Maltotriosa	Et1	0	34,4 ± 1,2	
2	Maltotriosa	Et2	24,9 ± 1,7	27,1 ± 3,4	
3	Maltotriosa	Et3	0	22,6 ± 1,8	
4	Maltotriosa	Et4	0	12 ± 0,7	
5	Maltotriosa	Et5	22,8 ± 7,2	10,3 ± 12,7	
6	Maltopentaosa	Et1	59 ± 6,6	74,5 ± 8,5	82,8 ± 0,8
7	Maltopentaosa	Et2	37,8 ± 4,1	92,9 ± 16,7	90,5 ± 1,6
8	Maltopentaosa	Et3	44,9 ± 7,7	58,7 ± 11,8	
9	Maltopentaosa	Et4	45,2 ± 3,4	59,3 ± 1,1	84,1 ± 0,8
10	Maltopentaosa	Et5	46,5 ± 2,4	57,9 ± 8,9	81,9 ± 1,9
11	Maltotetraosa	Et1	40,3 ± 7,4	65,6 ± 3,3	
12	Maltotetraosa	Et2	38,1 ± 3,3	63,3 ± 3,2	67,5 ± 0,6
13	Maltotetraosa	Et3	23,4 ± 3,7	44,4 ± 3	
14	Maltotetraosa	Et4	18,2 ± 6,4	42,0 ± 5,1	
15	Maltotetraosa	Et5	32,7 ± 3,9	41,4 ± 5,4	
66	Quitotetraosa	Et1	5,7 ± 11,9		23,2 ± 3
67	Quitotetraosa	Et2	0		34,4 ± 2,4
68	Quitotetraosa	Et3	0		27,1 ± 6,6
69	Quitotetraosa	Et5	13,9 ± 4,8		29 ± 4,8
70	Quitopentaosa	Et1	23 ± 11,2		25,1 ± 2,1
71	Quitopentaosa	Et2	21,5 ± 2,8		30,1 ± 4,8
72	Quitopentaosa	Et3	9,1 ± 3,8		29,2 ± 2,7
73	Quitopentaosa	Et4	11,8 ± 7,2		28,5 ± 4,1
74	Quitopentaosa	Et5	4,4 ± 1,1		34,2 ± 2,3
75	Xilotetraosa	Et1	24,9 ± 5,1		41,3 ± 1
76	Xilotetraosa	Et2	19,1 ± 1,6		43,4 ± 5,1
77	Xilotetraosa	Et3	25,7 ± 8,2		50,4 ± 3,1
78	Xilotetraosa	Et4	26,7 ± 5,6		36,3 ± 3,6
79	Xilotetraosa	Et5	21,3 ± 2,7		39,6 ± 4,1
80	Xilopentaosa	Et1	32,7 ± 2,8		56,6 ± 3,2

			% de Inhibición de la proliferación de células TF1.8 estimulada por IL-4		
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	Conjugado de oligosacárido aniónico (2,5 µg/ml)	Conjugado de oligosacárido aniónico (5 µg/ml)	Conjugado de oligosacárido aniónico (10 µg/ml)
81	Xilopentaosa	Et2	32,3 ± 4,8		59,2 ± 3,1
82	Xilopentaosa	Et3	29,2 ± 4	40,3 ± 3	58,4 ± 2,4
83	Xilopentaosa	Et4	38,2 ± 7,3	42,5 ± 4	53,6 ± 4,3
84	Xilopentaosa	Et5	30,9 ± 3,1	32,6 ± 4,8	52,8 ± 3,5

### Ejemplo 13

5 Análisis funcionales de conjugados de oligosacárido aniónico con respecto a dianas de proliferación celular GM-CSF e IL-2

10 Las células TF-1.8 se obtuvieron a partir de las células TF-1 que responden al GM-CSF humano (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos). Las células TF-1.8 mantenían su capacidad de respuesta a GM-CSF. De forma rutinaria, se añaden  $2,5 \times 10^4$  células a pocillos de microplacas que no contienen ni GM-CSF (control negativo) o diversas diluciones de GM-CSF. Las células se cultivan durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada, tras lo cual la actividad de luciferasa se mide mediante la adición de 50 µl de tampón de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, MgSO<sub>4</sub> 15 mM, DTT 33,3 mM, EDTA 0,1 mM, Na-luciferina 0,5 mM, ATP 0,5 mM, 0,25 mM litio Co A y Triton X-100 al 0,5 % en v/v). Inmediatamente después de la adición del tampón de luciferasa la placa se somete a ensayo para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un aparato de recuento de Múltiples etiquetas Victor 1420 (Wallac, Turku, Finlandia). Cuando se va a medir el efecto de los conjugados de oligosacárido aniónico, o de otros polisacáridos sulfatados, los pocillos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas así como del GM-CSF. Estos experimentos indicaban que las concentraciones de 10 µg/ml y 1 µg/ml de los conjugados de oligosacárido aniónico de forma reproducible no tienen efecto en la proliferación de las células TF-1.8 obtenidas con 0,025 ng/ml de GM-CSF (Tabla 5).

20 La línea de linfocitos T citotóxicos de murino (CTLL) es un subclón de linfocitos T obtenidos a partir de un ratón C57b1/6. Las células necesitan interleuquina-2 (IL-2) para su crecimiento y se usan para someter a ensayo su presencia en medios acondicionados. Las células son sensibles a IL-2 tanto de murino como humana. Las células CTLL se transfectaron con el gen de luciferasa de luciérnaga contenido en el vector de expresión, pPGK-puromicina-luciferasa (Coombe *et al*, 1998, *mencionado anteriormente*). 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 llevan a cabo en microplacas de 96 pocillos adecuadas para los ensayos de este tipo (Falcon). Los pocillos son de fondo plano, con lados blancos y un fondo transparente. Las células se lavan para retirar cualquier citoquina en el medio de crecimiento y a continuación se vuelven a suspender en RPMI/FCS al 5 % en p/v. El recuento de las células se realiza con un Analizador de Recuento y Tamaño de Partículas Coulter Z2 (Coulter Electronics, Inglaterra) y de forma rutinaria se añaden  $1,6 \times 10^4$  células a pocillos de microplacas que no contienen ni IL-2 humana recombinante (rhIL-2) (control negativo) o diversas diluciones de rhIL-2. Cuando se va a medir el efecto de los conjugados de oligosacárido aniónico, o de otros polisacáridos sulfatados, los pocillos también contienen diversas concentraciones de estas moléculas.

35 Las células CTL-Luc proliferan durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada, tras lo cual la actividad de luciferasa se mide mediante la adición de 50 µl de tampón de sustrato de luciferasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, MgSO<sub>4</sub> 15 mM, DTT 33,3 mM, EDTA 0,1 mM, Na-luciferina 0,5 mM, ATP 0,5 mM, 0,25 mM litio Co A y Triton X-100 al 0,5 % en v/v). Inmediatamente después de la adición del tampón de luciferasa la placa se somete a ensayo para determinar la actividad de luciferasa. Las emisiones de luz se detectan en un aparato de recuento de Múltiples etiquetas Victor 1420 (Wallac, Turku, Finlandia). Los experimentos en los que las células CTL-Luc se cultivan en presencia de cualquiera de 10 µg/ml o 1 µg/ml de conjugados de oligosacárido aniónico de forma reproducible no tienen efecto en la proliferación de las células CTL-Luc obtenidas con 1,25 ng/ml de rhIL-2. (Tabla 5). Los resultados de estos experimentos con las líneas celulares sensibles a IL-2 y GM-CSF sugieren que ninguno de los conjugados de oligosacárido aniónico sometidos a ensayo interactúan con estas citoquina de una manera que influya en su actividad proliferativa. Los resultados de estos experimentos también sugieren que los conjugados de oligosacárido aniónico sometidos a ensayo no son tóxicos para las líneas de células linfocíticas dependientes de citoquina. Estos ejemplos muestran que aunque los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención sometidos a ensayo se unen a citoquinas, esto no invoca necesariamente ningún potencial terapéutico para los conjugados de oligosacárido aniónico sometidos a ensayo. Por el contrario, la unión a las proteínas diana que se describen en los otros ejemplos significa que los conjugados de oligosacárido aniónico de la presente invención tienen un potencial terapéutico.

Tabla 5: La capacidad de los diversos conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la proliferación celular dependiente de GM-CSF humano o IL-2 humano

ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	% de Inhibición de la proliferación de células estimulada por citoquinas	
			10 µg/ml de GM-CSF (células TF1.8)	10 µg/ml de IL-2 (células CTL-luc)
5	Maltotriosa	Et5		
6	Maltopentaosa	Et1	-5,7 ± 1,4	-0,1 ± 4,2
7	Maltopentaosa	Et2	-6,7 ± 6	-0,2 ± 6,4
8	Maltopentaosa	Et3	8,7 ± 3,5	-1,7 ± 4,4
9	Maltopentaosa	Et4	3,6 ± 1,7	1,3 ± 2,5
10	Maltopentaosa	Et5	-1,9 ± 2	0,4 ± 5,8
15	Maltotetraosa	Et5		
69	Quitotetraosa	Et5		
70	Quitopentaosa	Et1	-10,9 ± 7,5	
71	Quitopentaosa	Et2	-2,4 ± 6,1	
72	Quitopentaosa	Et3	-2 ± 5,5	
73	Quitopentaosa	Et4	-11,8 ± 5,8	
74	Quitopentaosa	Et5	-9,1 ± 1,1	
75	Xilotetraosa	Et1		
79	Xilotetraosa	Et5		
80	Xilopentaosa	Et1	5,2 ± 6,8	
81	Xilopentaosa	Et2	7,4 ± 10,3	
82	Xilopentaosa	Et3	-0,4 ± 0,1	
83	Xilopentaosa	Et4	-2,2 ± 2,6	
84	Xilopentaosa	Et5	0,3 ± 5,2	

La estimulación ligera aparente de la proliferación celular se indica con un valor negativo.

Ejemplo 14

5 Análisis funcionales de conjugados de oligosacárido aniónico con respecto a la proteína diana de EPOC, elastasa leucocitaria humana.

10 La elastasa es una proteína que es una diana potencial para el tratamiento de la EPOC. Los ensayos de elastasa se realizaron en microplacas de plástico de 96 pocillos para una fácil cuantificación con el lector de placas fluorescente. La elastasa leucocitaria humana (5 nM/pocillo) se incubó en presencia o ausencia de polisacáridos sulfatados, con el sustrato fluorogénico MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-amido-metilcumarina (20 µM/pocillo) en un tampón de fosfato sódico, pH 7,4. La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 minutos antes de detener la reacción mediante la adición de 10 µl/pocillo de ácido acético 250 nM y la mezcla se transfirió a una microplacas de 96 pocillos midiendo la fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Se usaron diversas concentraciones de inhibidores para permitir el cálculo de la concentración de conjugado de oligosacárido aniónico necesaria para inhibir la actividad enzimática en un 50 % (CI<sub>50</sub>). Estos datos indicaban que los diferentes conjugados de oligosacárido aniónico inhibían la actividad de elastasa en grados diferentes, pero la estructura que comprendía la quitopentaosa sulfatada unida por los conectores Et de diversos tamaños era la más eficaz con una CI<sub>50</sub> en este ensayo de aproximadamente entre 32 - 70 nM, con las estructuras que comprenden los conectores Et1 y Et2 más pequeños teniendo la mejor actividad. Por lo tanto, la quitopentaosa sulfatada unida a Et1 la quitopentaosa sulfatada unida a Et2 presentaban una CI<sub>50</sub> de 32 y 34 nM. La mejor de las maltopentaosas sulfatadas unidas era la ID 10 con una CI<sub>50</sub> de 48 nM. Las series de xilopentaosa unida no eran inhibidores muy

eficaces de la actividad de elastasa. En este ensayo la heparina tiene una  $CI_{50}$  de aproximadamente 200 nM (Tabla 6).

5

Tabla 6: La capacidad de los diversos conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la actividad de la elastasa leucocitaria humana

			Inhibición de la actividad de Elastasa
			$CI_{50}$ nM
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector	
1	Maltotriosa	Et1	2200
2	Maltotriosa	Et2	
3	Maltotriosa	Et3	667
4	Maltotriosa	Et4	
5	Maltotriosa	Et5	
6	Maltopentaosa	Et1	
7	Maltopentaosa	Et2	100
8	Maltopentaosa	Et3	222
9	Maltopentaosa	Et4	223
10	Maltopentaosa	Et5	48
11	Maltotetraosa	Et1	480
12	Maltotetraosa	Et2	500
13	Maltotetraosa	Et3	520
14	Maltotetraosa	Et4	1100
15	Maltotetraosa	Et5	1250
66	Quitotetraosa	Et1	140
67	Quitotetraosa	Et2	
68	Quitotetraosa	Et3	240
69	Quitotetraosa	Et5	180
70	Quitopentaosa	Et1	32
71	Quitopentaosa	Et2	34
72	Quitopentaosa	Et3	70
73	Quitopentaosa	Et4	55
74	Quitopentaosa	Et5	70
75	Xilotetraosa	Et1	290
76	Xilotetraosa	Et2	460
77	Xilotetraosa	Et3	540
78	Xilotetraosa	Et4	450
79	Xilotetraosa	Et5	280
80	Xilopentaosa	Et1	480
81	Xilopentaosa	Et2	470
82	Xilopentaosa	Et3	410
83	Xilopentaosa	Et4	420
84	Xilopentaosa	Et5	300

Ejemplo 15

Análisis funcionales de conjugados de oligosacárido aniónico con respecto a quimioquinas implicadas en inflamación asociada con EPOC.

5 Las quimioquinas conocidas por desempeñar un papel importante en la mediación de la inflamación asociada con EPOC incluyen IL-8, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$  (Barnes 2004, *mencionado anteriormente*). Se mostró que diversos conjugados de oligosacárido aniónico bloqueaban la migración celular desencadenada por IL-8. Estos experimentos se realizaron usando HL-60 promielocíticas humanas tratadas con DMSO. Estas células se obtuvieron a partir de un paciente con leucemia promielocítica aguda. Las células se trataron con DMSO (1,2 %) durante 4 días antes de su uso en los experimentos. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas para quimiotaxis Costar de 96 pocillos que constaban de una cámara inferior a la que se añadió la IL-8 humana (+/- inhibidor) y a continuación las células en RPMI y FCS al 1 % en v/v se añadieron a una cámara superior y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora para permitir que las células se movieran desde la cámara superior en la parte inferior. El número de células que migran en la cámara inferior se cuantificó mediante etiquetado con AQUEOUS ONE (20  $\mu$ l/pocillo) durante 1,75 horas antes de leer la absorbancia a 490 nm. La IL-8 se usó a una concentración final de 20 ng/ml y los diversos inhibidores de conjugado de oligosacárido aniónico se usaron a cualquiera de 10 o 50  $\mu$ g/ml, los datos de % de inhibición se muestran para 50  $\mu$ g/ml (Tabla 7).

20 Para examinar si los diversos conjugados de oligosacárido aniónico eran inhibidores eficaces de la quimioquina MCP-1, se usó la línea de células monocíticas humanas THP-1. Estas células se obtuvieron originalmente a partir de la sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda. El ensayo era muy similar al que se ha descrito anteriormente, excepto porque las células se colocaron en suero bovino fetal al 1 % durante 20 horas antes de comenzar el ensayo. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas para quimiotaxis Costar de 96 pocillos y MCP-1 humano (+/- inhibidor) se añadió a la cámara inferior y las células THP-1 en RPMI/FCS al 1 % se añadieron a la cámara superior y la placa se incubó a 37 °C durante 2,5 horas para permitir que las células se movieran desde la cámara superior en la parte inferior. El número de células que migran en la cámara inferior se cuantificó mediante etiquetado con AQUEOUS ONE (30  $\mu$ l/pocillo) durante 3,5 horas antes de leer la absorbancia a 490 nm. MCP-1 se usó a una concentración final de 10 ng/ml y los diversos inhibidores de conjugado de oligosacárido aniónico se usaron a cualquiera de 10 o 50  $\mu$ g/ml; los datos de % de inhibición se muestran para 50  $\mu$ g/ml (Tabla 7).

35 Las células U937 tratadas con DMSO se usaron para examinar la migración celular como respuesta a MIP-1 $\alpha$ . Las células U937 son una línea de células humanas promonocíticas obtenidas a partir de la efusión pleural de un paciente con linfoma histiocítico. Estas células se trataron con DMSO (1,2 %) durante 4 días antes de su uso en los experimentos de quimiotaxis. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas para quimiotaxis Costar de 96 pocillos y MIP-1 $\alpha$  humano (+/- inhibidor) se añadió a la cámara inferior y las células U937 tratadas con DMSO en RPMI/HEPES se añadieron a la cámara superior y la placa se incubó a 37 °C durante 1,5 horas para permitir que las células se movieran desde la cámara superior en la parte inferior. El número de células que migran en la cámara inferior se cuantificó mediante etiquetado con AQUEOUS ONE (30  $\mu$ l/pocillo) durante 1 hora antes de leer la absorbancia a 490 nm. MIP-1 $\alpha$  se usó a una concentración final de 40 ng/ml y los diversos inhibidores de conjugado de oligosacárido aniónico se usaron a 10 y 50  $\mu$ g/ml; los datos de % de inhibición se muestran para 50  $\mu$ g/ml (Tabla 7). Los datos indican que una serie diferente de conjugados de oligosacárido aniónico inhibe cada una de las quimioquinas sometidas a ensayo y *a priori* no era evidente qué conjugados de oligosacárido aniónico podrían bloquear la función de quimioquina. MCP-1 es la quimioquina cuya función se bloquea de la mejor manera por los conjugados de oligosacárido aniónico y las series de maltopentaosa sulfatada unida son particularmente eficaces en este sentido. Parece que el tamaño del conector es menos importante que la longitud del oligosacárido en el conjugado, ya que tanto una maltotriosa sulfatada unida como diversas maltotetraosas sulfatadas unidas son inhibidores menos eficaces que el conjugado de oligosacárido aniónico equivalente para el que el oligosacárido es una maltopentaosa sulfatada. Otros conjugados de oligosacárido aniónico que muestran una buena actividad inhibitoria son los xilanos sulfatados unidos están formados por un conector corto (Et1). Aquí parece que lo que se necesita para la actividad es una presentación continua de sulfatos en la estructura principal de xilano sin una falta de estiramiento en el sulfato, por lo tanto el tamaño de cada oligosacárido individual en el conjugado es de menor importancia.

55 A diferencia de la situación con MCP-1, IL-8 no se inhibe en grado alguno por la serie de maltosa sulfatada unida, pero se bloquea con conjugados de oligosacárido aniónico de la serie de xilano sulfatado unido (Tabla 7). Al igual que con la situación para MCP-1, esos xilanos sulfatados unidos formados por un conector corto (Et1) son los inhibidores más eficaces de la actividad de IL-8. Por lo tanto, una presentación continua de sulfatos en la estructura principal de xilano sin una falta de estiramiento en el sulfato es lo que se necesita para la actividad y el tamaño de cada oligosacárido individual en el conjugado es de menor importancia.

65 Muy pocos de los conjugados de oligosacárido aniónico inhibían la actividad funcional de MIP-1 $\alpha$  y los que la inhibían lo hacían de forma muy débil. Los conjugados de oligosacárido aniónico que eran los más eficaces comprendían las maltopentaosas sulfatadas unidas. Parece que la longitud del conector es de menor importancia que la longitud del oligosacárido (Tabla 7).

Tabla 7: La capacidad de los diversos conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la migración celular inducida por quimioquinas con un papel en EPOC

			% de Inhibición de la migración celular estimulada por quimioquinas con 50 µg/ml de conjugados de oligosacárido aniónico		
			MCP-1	IL-8	MIP-1α
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector			
5	Maltotriosa	Et5	72,6 ± 1	52,3 ± 3,5	-10 ± 0,5
6	Maltopentaosa	Et1			
7	Maltopentaosa	Et2	105 ± 3,4	32,9 ± 2,3	23,5 ± 7,1
8	Maltopentaosa	Et3			
9	Maltopentaosa	Et4	107,9 ± 2,8	26,6 ± 4,7	26,5 ± 6,6
10	Maltopentaosa	Et5	92,6 ± 0,3	26,6 ± 4,7	26,1 ± 2,5
11	Maltotetraosa	Et1			
12	Maltotetraosa	Et2			
13	Maltotetraosa	Et3	77,6 ± 1	36,7 ± 6	-33 ± 6,7
14	Maltotetraosa	Et4	71,7 ± 4,2	23,9 ± 1,3	-6,8 ± 0,8
15	Maltotetraosa	Et5	85,7 ± 1,7		30,2 ± 10,3
66	Quitotetraosa	Et1			
67	Quitotetraosa	Et2	19,4 ± 0,4	26,2 ± 6,1	-8,5 ± 11,1
68	Quitotetraosa	Et3			
69	Quitotetraosa	Et5			
70	Quitopentaosa	Et1	14,1 ± 1,8	31 ± 1,3	5,9 ± 5,1
74	Quitopentaosa	Et5			
75	Xilotetraosa	Et1	66,6 ± 1,6	89,6 ± 9,5	1,3 ± 2,2
79	Xilotetraosa	Et5			
80	Xilopentaosa	Et1	62,4 ± 1,1	94,5 ± 11,8	-11,4 ± 6
81	Xilopentaosa	Et2			
82	Xilopentaosa	Et3	57 ± 0,2	30,5 ± 2,7	-31,2 ± 4,9
83	Xilopentaosa	Et4			
84	Xilopentaosa	Et5	57,5 ± 1,7	52,2 ± 3,7	-38,2 ± 1,1

La estimulación ligera aparente de la migración celular se indica con un valor negativo.

Ejemplo 16

5 Análisis funcionales de dos conjugados de oligosacárido aniónico con respecto a la inhibición de infiltración leucocitaria en un modelo animal de rinitis alérgica

10 Se usó un modelo de rinitis alérgica en cobayas. Los cobayas se sensibilizan a la ovalbúmina (OVA) dos veces (los días 0 y 7) con una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de solución salina que contiene 100 mg de Al(OH)<sub>3</sub> y 2 µg de OVA. Tres semanas después de la última sensibilización, los animales se anestesian y la exposición de la cavidad nasal al alérgeno se realiza mediante goteo de la solución de OVA a 20 mg/ml en cavidades nasales bilaterales. Para el control negativo los animales reciben sensibilización y estimulación con solución salina. Los animales se tratan previamente con cualquiera de vehículo o fármaco (conjugados de oligosacárido aniónico o budesonida) 30 min antes de la instilación intranasal de OVA. El vehículo o los fármacos se administran a 25 µl - 50 µl/fosa nasal. Se incluye una comparación de los conjugados de oligosacárido aniónico con budesonida, como el compuesto de referencia. Los animales se sacrifican y todos los parámetros se miden ocho horas después de la provocación.

La permeabilidad de la barrera de la mucosa nasal se evalúa midiendo la filtración de plasma rico en proteína y no tamizado en las cavidades nasales. La cantidad de plasma extravasado se indica como niveles de lavado nasal de proteína o albúmina total. El fluido de lavado nasal se recoge aclarando suavemente las cavidades nasales con solución salina tamponada con fosfato. Las células en este fluido se centrifugan y se vuelven a suspender en solución salina tamponada con fosfato y el recuento se hace usando un analizador de hematología semiautomatizado. La composición celular del lavado nasal se determina después de citocentrifugación y tinción con May Grynwald Giemsa.

Los datos indican que los niveles de exudado de plasma a la cavidad nasal aumentaban de forma significativa 8 horas después de la estimulación intranasal con OVA. Los dos conjugados de oligosacárido aniónicos reducían de forma significativa el contenido de proteína del fluido de lavado nasal lo que indica una reducción del exudado de plasma con este fármaco. La maltopentaosa sulfatada unida a Et2 (ID 7) y la maltopentaosa sulfatada unida a Et4 (ID 9) se sometieron a ensayo y de estas la primera era la más eficaz; los % de inhibiciones obtenidas fueron respectivamente de un 91,4 % y un 51,5 % cuando se usaron a una concentración de 5 mg/kg. Una evaluación de la infiltración de leucocitos en el fluido de lavado nasal indicó un aumento del recuento de leucocitos con respecto al observado en animales sensibilizados con solución salina, sin embargo los dos conjugados de oligosacárido aniónico inhibían la infiltración de leucocitos a la concentración sometida a ensayo siendo uno más eficaz que el otro (Figura 3). Los leucocitos más marcados en el lavado nasal son eosinófilos con alguna evidencia de infiltración de neutrófilos, los niveles de otros tipos celulares: 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 reciben el corticosteroide budesonida presentaban una marcada disminución de la exudación plasmática en el lavado nasal y también una marcada disminución en los recuentos totales total de glóbulos blancos en el fluido de lavado nasal, siendo la disminución más pronunciada en los recuentos de eosinófilos. Del mismo modo los conjugados de oligosacárido aniónico reducción de forma notable el infiltrado celular en el fluido de lavado nasal. En particular uno de los conjugados de oligosacárido aniónico, ID 9 (maltopentaosa unida a Et4) era particularmente eficaz para bloquear no solo la infiltración de eosinófilos, sino también la infiltración de neutrófilos, mientras que el otro conjugado de oligosacárido aniónico con un conector más corto (maltopentaosa unida a Et2, ID 7) se comportaba del mismo modo que el corticosteroide y solamente los eosinófilos bloqueados (Figura 3).

### 30 Ejemplo 17

Análisis funcional de un conjugado de oligosacárido aniónico en un modelo animal de asma

Se usó un modelo de asma en cobayas. En este modelo los cobayas (9-10 por grupo) se sensibilizaron a la OVA mediante dos inyecciones intraperitoneales de 0,5 ml de solución salina que contenía 20 mg de  $Al(OH)_3$  y 20  $\mu g$  de OVA. Las sensibilizaciones se realizan los días 0 y 7. Tres semanas después de la última sensibilización, los animales se trataron previamente con cualquiera de vehículo o fármacos 30 min antes de la inhalación de OVA (a 10 mg/ml) durante 6 min (estimulación con alérgeno). Para el control negativo, los animales recibieron cualquiera de sensibilización y estimulación con solución salina o sensibilización con solución salina y estimulación con OVA. Los animales se sacrificaron y todos los parámetros se midieron 8 horas después de la provocación. El vehículo o fármacos se administraron por vía intratraqueal, 1 ml/kg de peso corporal, 30 min antes de la estimulación intratraqueal con OVA. El vehículo para los fármacos (conjugados de oligosacárido aniónico y budesonida) era 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 el cumplimiento pulmonar ( $C_{din}$ ) se evocó broncoconstricción con metacolina aerosolizada (3 mg/ml, 10 mg/ml y 30 mg/ml). La diferencia entre las lecturas de referencia y la obtenida después de la metacolina se usaron para calcular  $C_{din}$  y  $R_L$ . El lavado broncoalveolar (BAL) se realizó inmediatamente después de las mediciones de la función pulmonar. El BAL se analizó para contenido de proteína (como medida de filtración) y recuento de leucocitos, y se realizaron recuentos celulares diferenciales para indicar a qué subconjuntos de leucocitos afectaban mejor los fármacos.

Las mediciones de la función pulmonar (Tabla 8) indican claramente que el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 (maltopentaosa sulfatada unida a Et4) inhibía el desarrollo tanto de  $C_{din}$  como de  $R_L$ . El conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 a la concentración más elevada restablecía  $C_{din}$  y  $R_L$  cerca de la observada con el control negativo, y hay evidencia de una respuesta a la dosis para el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9. La eficacia del conjugado de oligosacárido aniónico era al menos la del compuesto de referencia, el corticosteroide budesonida (ignorando la budesonida 2,5 mg/kg 10 MCh, ya que un animal de este grupo dio una lectura de 10 veces, lo que sesgaba la media). Por lo tanto, el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 mostraba eficacia en las mediciones de la función pulmonar en este modelo de cobayas incluso cuando se usaba a concentraciones bajas.

60 Tabla 8: Sumario de Hiperreactividad de las Vías Respiratorias (AHR) - Datos de AHR expresados como % de inhibición a partir de los del control positivo para  $R_L$  y % de aumento a partir de los del control positivo para  $C_{din}$

Compuesto	$R_L$		$C_{din}$	
	MCh (10 mg/ml)	MCh (30 mg/ml)	MCh (10 mg/ml)	MCh (30 mg/ml)
Budesonida 0,1	86,5 %**	105 %**	97,2 %**	116,2 %**

Compuesto	R <sub>L</sub>		C <sub>din</sub>	
	MCh (10 mg/ml)	MCh (30 mg/ml)	MCh (10 mg/ml)	MCh (30 mg/ml)
mg/kg				
Budesonida 2,5 mg/kg	-89,4 %	98,9 %**	19,7 %	70,9 %**
ID9 0,1 mg/kg	75,3 %*	84,4 %**	76,6 %**	90 %**
ID9 2,5 mg/kg	80,5 %**	99,5 %**	68,7 %*	128,4 %**

Los datos se muestran para dos concentraciones de metacolina diferentes, 10 mg/kg y 30 mg/kg. Los datos obtenidos con metacolina a 3 mg/kg no eran significativamente diferentes a los niveles de la medida inicial en ninguno de los grupos sometidos a ensayo incluyendo el control positivo. La R<sub>L</sub> aumenta con una reacción alérgica mientras que la elasticidad o C<sub>din</sub> disminuye, por lo tanto los valores dados en la tabla son % de disminución a partir del control positivo para R<sub>L</sub> pero % de aumento a partir del control positivo para C<sub>din</sub>.

\* significativamente diferente a P < 0,01  
\* significativamente diferente a P < 0,05

El conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 inhibe de forma muy eficaz el contenido elevado de proteína de BAL como resultado de filtración de proteína inducida por antígeno, incluso a 0,1 mg/kg (Figura 4). La eficacia del conjugado de oligosacárido aniónico era comparable con la observada con budesonida. De forma análoga, el tratamiento previo con el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 o budesonida a 0,1 mg/kg inhibían de forma significativa el influjo de leucocitos inducido por OVA (inhibición de un 62 % y un 76 % respectivamente). El tratamiento previo con el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 a 2,5 mg/kg era más eficaz para inhibir el influjo de leucocitos (inhibición de un 85 %), mientras que la budesonida a 2,5 mg/kg no inhibía de forma significativa el influjo de leucocitos (Figura 5). Un recuento celular diferencial de los leucocitos en el BAL revelaba que el recuento de eosinófilos era significativamente más elevado en animales sensibilizados y estimulados con OVA en comparación con los animales de control negativo y que los eosinófilos eran principalmente el tipo celular que se inhibía (Figura 6). Tanto la budesonida como el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 inhibían de forma significativa el influjo de eosinófilos, con efectos inhibitorio dos entre un 80 % y un 90 %. No se observaban diferencias significativas en el recuento de neutrófilos entre los controles positivo y negativo y no se observaba diferencia cuando se trataban previamente con cualquiera de los fármacos. De forma análoga, no se observaban diferencias significativas en el recuento de basófilos entre los controles positivo y negativo y no se observa diferencia cuando se trataban previamente con cualquiera de los fármacos (los datos no se muestran). El recuento de macrófagos en el fluido de BAL era significativamente más elevado en animales sensibilizados y estimulados con OVA en comparación con los animales de control negativo. El tratamiento previo con los fármacos no reducía de forma significativa el nivel de macrófagos aunque algunos de los tratamientos tendían a producir una reducción de los niveles (los datos no se muestran).

En conclusión, a las concentraciones sometidas a ensayo, el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 era la menos eficaz para inhibir (1) el contenido de proteína del BAL, (2) hiperreactividad de las vías respiratorias, y (3) los leucocitos, y en particular el influjo de eosinófilos en el BAL, como el corticosteroide de referencia, budesonida, en este modelo de asma alérgica en cobayas.

#### Ejemplo 18

30 Análisis funcional de un conjugado de oligosacárido aniónico en un modelo animal de EPOC

Se usó un modelo de enfisema en ratón. La exposición aguda o crónica de los ratones al humo de cigarrillo conduce a respuestas pulmonares que imitan en parte los cambios inflamatorios y estructurales observados en la EPOC. En este modelo, los ratones C57B1/6J machos se someten a exposición al humo aguda o crónica, con el aire de la habitación normal siendo la situación de control. En el estudio agudo, los ratones se expusieron a cualquiera de aire normal 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 se expusieron a cualquiera de aire normal o al humo de tres cigarrillos/día durante 5 días/semana durante 6 meses. Los 4 grupos de ratones a continuación se dividieron adicionalmente de modo que los ratones dentro de cada grupo también recibieron diversos conjugados de oligosacárido aniónico a través de una vía inhalada.

En los grupos de ratones de exposición aguda, los conjugados de oligosacárido aniónico se administraron 30 minutos antes de la exposición al humo del cigarrillo. La evaluación de la eficacia del fármaco para ratones en los grupos de exposición aguda implicaban una evaluación de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) al final de la exposición al humo. El BALF se examinó para citoquinas y quimioquinas 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 al humo del cigarrillo. Se midió una gama de citoquinas y quimioquinas. Estas incluían: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, RANTES,

MIP-1 $\alpha$ , quimioattractor de neutrófilos inducido por citoquina (KC), TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). También se determinó un recuento celular diferencial de las células en el BALF. Los resultados de este estudio indicaban que un conjugado de oligosacárido aniónico (ID 9) disminuía el infiltrado celular en BALF de animales expuestos al humo de cigarrillo, en particular los recuentos de neutrófilos se veían atenuados de forma significativa en esos animales expuestos al humo de cigarrillo y que también recibieron el conjugado de oligosacárido aniónico.

Los animales en el estudio crónico recibieron los conjugados de oligosacárido aniónico (incluyendo ID 9) una vez al día durante el periodo de duración del experimento. Al finalizar el experimento, los animales se sacrificaron y los pulmones se fijaron por vía intratraqueal con formalina (5 %) y el volumen pulmonar se midió mediante desplazamiento de agua. El tejido pulmonar se preparó para histoquímica e inmunohistoquímica, siendo los tejidos pulmonares teñidos con hematoxilina-eosina y/o ácido peryódico-Schiff o con anticuerpos con respecto al marcador de macrófagos Mac-3. También se determinó el nivel de desmosina en el tejido pulmonar. La desmosina es un imino ácido específico de la elastina; la evaluación de la desmosina en el pulmón se toma como un indicador del contenido de elastina pulmonar. Una disminución en el contenido de desmosina es una evidencia de que los cambios enfisematosos están asociados con la proteólisis y degradación de la matriz. De forma colectiva los resultados de este estudio indicaban que los conjugados de oligosacárido aniónico, y en particular ID 9, podían actuar como agentes antiinflamatorios en este modelo de EPOC.

### Ejemplo 19

Análisis funcional de un conjugado de oligosacárido aniónico en un modelo animal de ARDS

Se usó un modelo de lesión pulmonar aguda en rata y ARDS (Jansson, Lung 182: 1-9, 2004). El modelo se basa en la comprensión de que la endotoxina encontrada en agentes patógenos comunes (por ejemplo, bacterias) debe conducir al desarrollo de ARDS, shock séptico y síndrome de disfunción de múltiples órganos en la situación clínica. El lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa de bacterias gram-negativas es el ejemplo prototípico de que la endotoxina y la exposición del tracto respiratorio de ratas a LPS se pueden usar como un modelo de inflamación pulmonar aguda y ARDS. En este modelo de rata, el LPS causa un aumento de infiltración de células inflamatorias, producción de mediadores inflamatorios y edema tisular, todos los cuales son característicos de la inflamación pulmonar aguda y de ARDS.

En este modelo, se anestesiaron ratas Wister hembras y el LPS se disolvió en solución salina a un intervalo de concentraciones que incluía 5, 50 y 500  $\mu\text{g/ml}$  que se administró por vía intratraqueal a un volumen de 1 ml/kg de peso corporal usando una cánula modificada. Los animales recibieron el mismo volumen de solución salina y manipulaciones como controles. Los animales se sacrificaron a las 4 y 8 horas después de la administración de LPS. Los animales que recibieron los conjugados de oligosacárido aniónico se instigaron por vía intratraqueal con los conjugados de oligosacárido aniónico o con solución salina 30 minutos antes de la administración de LPS. Las concentraciones usadas fueron 0,5 mg/kg y 2,5 mg/kg.

El volumen de gas pulmonar extraído (ELGV) se mide con el principio de Arquímedes y se basa en la cantidad estable de aire atrapado dentro de los pulmones extirpados a una presión transpulmonar de 0 cm de H<sub>2</sub>O. Los animales para las mediciones de ELGV se inyectaron por vía intraperitoneal con 0,1-0,2 ml de pentobarbitona sódica (50 mg/kg). Después de abrir el pecho y extraer el corazón, la tráquea se expuso y se ligó con una sutura de 3-0. Los pulmones se extrajeron y el tejido pulmonar se recordó con cuidado. Se usaron un kit de determinación de la densidad (P3000, Mettler-Toledo GmbH, Suecia) y un software opcional de determinación de la densidad para el equilibrio basándose en el principio de que cada cuerpo sólido sumergido en líquido pierde peso, y se expresa como g/cm<sup>3</sup>. El sistema se ajustó a cero para excluir la densidad del líquido y para equilibrar los pesos del soporte, los pesos de los tejidos fuera del vaso de precipitados y la flotabilidad del tejido dentro del líquido. El ELGV se determina mediante la diferencia entre el peso del soporte y la flotabilidad pulmonar en el líquido. El edema del tejido pulmonar se indicó por el aumento del peso pulmonar. La indicación de edema del tejido pulmonar se calculó mediante la diferencia entre el peso del tejido pulmonar fuera del vaso de precipitados y el peso del soporte. La densidad del tejido pulmonar se determinó mediante la proporción del peso del pulmón (diferencia entre el peso del tejido pulmonar fuera del vaso de precipitados y el peso del soporte) y el volumen de aire dentro del pulmón (ELGV).

El fluido de BAL también se recogió. El pulmón izquierdo se lavó por vía intratraqueal con dos inyecciones de 3 ml de PBS después de la medición del ELGV. El fluido de BAL, recogido en tubos de plástico sobre hielo, se centrifugó a 1.000 rpm, 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta su análisis posterior. El sedimento celular se volvió a suspender en PBS para hacer el recuento del índice de leucocitos totales usando un analizador hematológico semiautomático de 15 parámetros (Sysmex F820, TOA Medical Electronics Co. Kobe, Japón). Se hizo el recuento de la diferenciación celular con preparaciones de citocentrifugación teñidas con May Grunwald Giemsa. Los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  IL-8 y MCP-1 en el fluido de BAL se determinaron usando kits de ensayo de inmunoadsorción unidos a enzimas (ELISA).

En este modelo, en los animales de control positivo había claras evidencias de aumento de pesos pulmonar con aumento de la concentración de LPS. También hay evidencia de un reclutamiento rápido de neutrófilos seguido de la producción y liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  IL-8 y MCP-1). En los

animales a los que se les administran los conjugados de oligosacárido aniónico, los pesos pulmonares se restablecieron con respecto a los de los controles negativos, el nivel de infiltración de neutrófilos disminuyó de forma notable, al igual que la concentración de los diversos mediadores inflamatorios. Aunque los niveles de los mediadores inflamatorios no se restablecieron totalmente con respecto a los del control negativo, la inhibición de una infiltración de neutrófilos por los conjugados de oligosacárido aniónico y en particular por el conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 era notable. Es probable que el LPS activara los macrófagos residentes en la mucosa pulmonar y los alvéolos haciendo que segregaran una proporción de estos mediadores inflamatorios. Sin embargo, ya que los datos anteriores de los inventores indicaban que los conjugados de oligosacárido aniónico son inhibidores efectivos de la actividad biológica de estos mediadores, es probable que el bloqueo de la actividad biológica de estas quimioquinas redujera la infiltración de neutrófilos y la liberación de mediadores adicionales por estas células. Además, los pesos de los pulmones cuando los animales se trataron con los conjugados de oligosacárido aniónico indican que estos compuestos eran inhibidores muy eficaces del edema.

#### Ejemplo 20

Análisis funcionales de conjugados de oligosacárido aniónico en un modelo de anafilaxia animal

Durante muchos años la anafilaxia de cobayas sea considerado el ejemplo clásico de anafilaxia, a diferencia de otras especies (por ejemplo, ratones) que carecen completamente de respuestas anafilácticas después de la inhalación de alergenos. Se cree que el shock anafiláctico se debe a la liberación de histamina con posterior contracción del músculo liso después de la inhalación del antígeno en las vías respiratorias y los pulmones. La contracción de la musculatura bronquial cierra completamente los alvéolos y evita la exhalación del aire, y los animales mueren por asfixia. En cobayas, las dosis de alergenos que son lo suficientemente elevadas como para producir respuestas significativas en fase tardía (es decir, eosinofilia celular, exudación de fase tardía) también dan lugar inevitablemente a fuertes reacciones agudas fuertes que son tan intensas que algunos animales pueden morir por una obstrucción aguda de vías respiratorias.

En este modelo los cobayas se sensibilizaron a la ovoalbúmina (OVA) dos veces (los días 0 y 7) mediante una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de solución salina que contenía 100 mg de  $Al(OH)_3$  y 2  $\mu g$  de OVA. Tres semanas después de la última sensibilización, los animales se anestesiaron y la exposición de la cavidad nasal al alergeno se realizó goteo de la solución de OVA a 2 mg/ml en cavidades nasales bilaterales (20  $\mu l$  por cavidad nasal). Para el control negativo, los animales recibieron sensibilización y estimulación con solución salina. Los animales se trataron previamente con cualquiera de vehículo o fármaco (conjugados de oligosacárido aniónico o budesonida) 30 min antes de la instilación intranasal de OVA. El vehículo o fármacos se administran, 25  $\mu l$  - 50  $\mu l$ /fosa nasal. Se incluye una comparación de los conjugados de oligosacárido aniónico con budesonida, como el compuesto de referencia. En este estudio la budesonida a 0,65 mg/kg no era eficaz para prevenir la anafilaxia ya que un 70 % de los animales en este grupo murieron por la obstrucción aguda de las vías respiratorias. Por el contrario, el conjugado de oligosacárido aniónico, ID 9, cuando se usaba a 5 mg/kg era dos veces tan eficaz como la budesonida (a 0,65 mg/kg) para inhibir la anafilaxia ya que murió solamente un 35 % de los animales (3/8); del mismo modo, el conjugado de oligosacárido aniónico, ID 7, cuando se usa a 5 mg/kg también inhibía a la anafilaxia ya que solamente murió un 27 % de los animales (3/11), mientras que con la budesonida murió un 70 % (7/10) de los animales.

También se usó un modelo de anafilaxia de ratón. Como antígeno se usó cacahuete entero recién molido. Los ratones se sensibilizaron por medio de sonda intragástrica con 5 mg (equivalente a 1 mg de proteína de cacahuete) o 25 mg (equivalente a 5 mg de proteína de cacahuete) por ratón de cacahuete entero molido junto con 10  $\mu g$  por ratón de toxina del cólera en el día 0 y de nuevo en el día 7. Tres semanas después de la sensibilización inicial, los ratones se mantuvieron en ayunas durante una noche y se estimularon con sonda intragástrica con extracto de cacahuete crudo de 10 mg por ratón en dos dosis a intervalos de 30 a 40 minutos. Los ratones que sobrevivieron a la primera estimulación se volvieron a estimular a la semana 5. Los fármacos (conjugados de oligosacárido aniónico) disueltos en PBS se administraron mediante inyección intravenosa en la vena de la cola 15 min antes de la segunda estimulación. Los ratones sensibilizados de forma simulada con toxina del cólera y los ratones sin estimulación previa se estimularon de la misma manera. Para controlar las respuestas de los anticuerpos IgE en suero, la sangre de la vena de la cola se extrajo a intervalos semanales después de la sensibilización inicial. Los niveles de IgE específica de cacahuete se midieron usando ELISA. Los síntomas anafilácticos se evaluaron de 30 a 40 minutos después de la segunda dosis de estimulación usando el siguiente sistema de puntuación: 0, sin síntomas; 1, rascado y frotamiento alrededor de la nariz y la cabeza; 2, hinchazón alrededor de los ojos y boca, diarrea, columna erecta, actividad reducida, y/o disminución de la actividad con aumento de la frecuencia respiratoria; 3, sibilancias, respiración dificultosa, y cianosis alrededor de la boca y la cola; 4, ninguna actividad después de estímulo o temblor y convulsión; 5, muerte. Para determinar los niveles de histamina en plasma, la sangre se extrajo 30 minutos después de la segunda estimulación mediante sonda intragástrica. Los niveles de histamina se determinaron usando un kit de inmunoensayo enzimático. La desgranulación de los mastocitos durante la anafilaxia sistémica se evaluó mediante el examen de muestras de oído recogidas inmediatamente después de la muerte anafiláctica o 40 minutos después de la estimulación de ratones supervivientes. Los tejidos se fijaron en formalina al 10 % tamponada neutra, y las secciones de parafina se tiñeron con azul de toluidina o tinción de Giemsa. Un mastocito desgranulado se definió como una célula positiva para azul de toluidina o Giemsa con 5 o más gránulos claramente teñidos completamente fuera de la célula. La gravedad de la respuesta anafiláctica se inhibía de forma significativa mediante la administración de los medicamentos conjugados de oligosacáridos aniónicos, evaluados por el sistema de

puntuación de los síntomas, a pesar de los niveles de IgE específica de cacahuete, lo que indica que los animales eran alérgicos al alérgeno del cacahuete. Además, los niveles de histamina eran menores en los animales que recibían los fármacos de conjugado de oligosacárido aniónico, lo que sugiere que estos fármacos neutralizan la histamina.

5 También se usó un modelo porcino de anafilaxia no alérgica (es decir, no media la por IgE y anteriormente denominada shock anafilactoide). La anafilaxia no alérgica se produce cuando los mastocitos y los basófilos se activan directamente mediante un método que no requiere reticulación de la membrana de FcεRI (El-Shanawany *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 153: 1-9, 2008). De forma experimental esto se puede inducir mediante el ionóforo de calcio intravenoso A23187 (Heflin *et al.*, Ann. Emergency Med. 48: 190-193, 2006). Este ionóforo de calcio se conoce porque desencadena la desgranulación rápida de mastocitos y basófilos *in vitro*. En este modelo, los cerdos recibieron una inyección intravenosa de A23187 (5 mg/kg). Los animales se sedaron y a continuación se anestesiaron y se colocaron líneas arteriales para permitir el control de la presión arterial media y para flebotomía. Inicialmente, antes de la inyección, se midieron la presión arterial basal y el pulso y se extrajo una muestra de sangre para obtener niveles basales de histamina y triptasa. La presencia de hipotensión y enrojecimiento cutáneo se tomaron como los determinantes clínicos del shock y esto se produjo aproximadamente 1 minuto después de la inyección. Al inicio del shock (> 20 % de disminución en la presión sanguínea arterial media) los animales recibieron cualquiera de solución salina oral intravenosa (40 ml/kg), difenhidramina intravenosa (1 mg/kg) más epinefrina (0,01 mg/kg), o los fármacos de conjugado de oligosacárido aniónico ID 9 o ID 7. La reversión del shock se supervisó y se determinó el tiempo necesario para volver a una medida basal. Los niveles de histamina y triptasa se determinaron usando un método de ELISA. Los datos indicaban que los niveles de histamina y triptasa aumentan de forma significativa después de la inyección de A23187 y la presión arterial media bajaba de forma notable. El tratamiento con los fármacos de conjugado de oligosacárido aniónico aumentaba la presión sanguínea arterial de una manera muy similar a la de la terapia convencional con difenhidramina y epinefrina y en todos estos grupos de tratamiento se mantuvo la reversión del shock anafiláctico.

#### Ejemplo 21

30 Análisis funcionales de conjugados de oligosacárido aniónico respecto a la proteína diana de asma, IL-13. Los diversos conjugados de oligosacárido aniónico inhibían la proliferación de una línea de células sensibles a IL-13 en grados diferentes. Esto se produce a dosis muy bajas y se cree que no se debe a un efecto tóxico del conjugado de oligosacárido aniónico porque otros, polisacáridos sulfatados del mismo modo, en las mismas concentraciones de IL-13 y polisacárido no tienen efecto. Estos experimentos utilizan las células TF-1 que se cultivan en GM-CSF. Las células TF-1 se establecieron originalmente a partir de una muestra de médula ósea de un macho con pantocitopenia severa. Estas células son dependientes de IL-3 o GM-CSF para crecimiento a largo plazo y son sensibles a una diversidad de citoquinas incluyendo IL-13.

40 En resumen, los ensayos de proliferación se realizaron en microplacas de 96 pocillos adecuadas para los ensayos de este tipo. Las células se lavaron para retirar cualquier citoquina en el medio de crecimiento y a continuación se volvieron a suspender en RPMI/FCS al 5 % en p/v y de forma rutinaria se añadieron  $2,5 \times 10^4$  células a los pocillos la microplaca que no contenían ni IL-13 (control negativo) o diversas diluciones de IL-13. Cuando se midió el efecto de los xilanos sulfatados con diferentes tamaños, los pocillos están en contenían diversas concentraciones de estas moléculas y la concentración de IL-13 se mantuvo constante a 2,5 ng/ml. Las células proliferaron durante 48 horas, tras lo cual el número de células presentes se cuantificó mediante tinción con 20 µl por pocillo del colorante AQUEOUS ONE durante 3 horas y a continuación la absorbancia se leyó a 490 nm.

50 Parece que el componente sacárido del conjugado de oligosacárido aniónico es importante para la actividad. Parece que es importante tanto el tamaño del oligosacárido como la composición subyacente. Los pentasacáridos unidos son inhibidores más eficaces que los tetrasacáridos unidos y, de los pentasacáridos unidos, la serie de maltosa sulfatada unida era la más eficaz pero los pentasacáridos de xilano sulfatados unidos también presentaban una cierta actividad. Todos los conjugados de la serie de quitosano presentaban una baja actividad lo que indica que esta estructura principal no es eficaz para la construcción de conjugados anímicos que inhiban a IL-13. De forma interesante, un conjugado de oligosacárido aniónico de maltotetraosa sulfatada unida con el conector más pequeño (Et1) presentaban una actividad similar a la de la maltopentaosa sulfatada unida con un conector Et1, pero las maltotetraosas sulfatadas unidas con conectores más largos presentaban una reducción de la actividad. Por lo tanto, parece que los tetrasacáridos sulfatados estrechamente relacionados de la serie de maltosa son suficientes para la actividad, pero los trisacáridos estrechamente relacionados presentaban poca actividad. El mejor conjugado de oligosacárido aniónico era el de la serie de maltosa con un conector Et4 lo que sugiere que son preferentes grupos de restos sulfatados presentados en una estructura principal de pentasacárido de maltosa separada por una región no sacárida, no sulfatada.

Tabla 9: La capacidad de los conjugados de oligosacárido aniónico para inhibir la proliferación celular dependiente de IL-13

			% de Inhibición de la proliferación de células TF1 estimulada por IL-13		
ID	Oligosacárido persulfatado	Conector		Conjugado de oligosacárido aniónico (2,5 µg/ml)	Conjugado de oligosacárido aniónico (10 µg/ml)
1	Maltotriosa	Et1		29 ± 2,2	43,8 ± 4,2
2	Maltotriosa	Et2			
3	Maltotriosa	Et3		26 ± 3,5	26,4 ± 9,5
4	Maltotriosa	Et4		31,5 ± 4,9	46 ± 1,9
5	Maltotriosa	Et5		25,5 ± 1,9	45,4 ± 6,2
6	Maltopentaosa	Et1		48,1 ± 8,7	105 ± 3,4
7	Maltopentaosa	Et2		39,8 ± 4,5	88,7 ± 1
8	Maltopentaosa	Et3		44,2 ± 4,6	89 ± 2,1
9	Maltopentaosa	Et4		49,6 ± 6,4	94,1 ± 3,7
10	Maltopentaosa	Et5		47,7 ± 0,9	83 ± 1,2
11	Maltotetraosa	Et1		52,5 ± 1,6	80,7 ± 3
12	Maltotetraosa	Et2		29,6 ± 5,8	63,1 ± 4,6
13	Maltotetraosa	Et3		39,5 ± 1,9	37,4 ± 9,5
14	Maltotetraosa	Et4		32 ± 7	52,9 ± 5,5
15	Maltotetraosa	Et5			
66	Quitotetraosa	Et1		11,9 ± 6,1	31,4 ± 0,8
67	Quitotetraosa	Et2		4,8 ± 1,8	29 ± 6,8
68	Quitotetraosa	Et3		-4,3 ± 4,8	83 ± 14,6
69	Quitotetraosa	Et5		4,3 ± 7,8	25,7 ± 9,9
70	Quitopentaosa	Et1		4,7 ± 7,2	34,7 ± 17,5
71	Quitopentaosa	Et2		4 ± 3,3	22 ± 2,2
72	Quitopentaosa	Et3		7 ± 4,4	20,6 ± 3,5
73	Quitopentaosa	Et4		83 ± 1,8	25 ± 7
74	Quitopentaosa	Et5		5,6 ± 3,2	20,5 ± 6,1
75	Xilotetraosa	Et1		35,8 ± 4,2	61,1 ± 2,2
76	Xilotetraosa	Et2		30,5 ± 2,7	56,5 ± 8,2
77	Xilotetraosa	Et3		83 ± 1,8	55 ± 2,5
78	Xilotetraosa	Et4		38,2 ± 2,3	53,2 ± 0,8
79	Xilotetraosa	Et5		22,9 ± 4,1	41,1 ± 5,8
80	Xilopentaosa	Et1		42,8 ± 3	61,3 ± 5
81	Xilopentaosa	Et2		89,6 ± 9,5	89,6 ± 9,5
82	Xilopentaosa	Et3		32,5 ± 4,2	65,7 ± 2,6
83	Xilopentaosa	Et4		37,2 ± 0,8	105 ± 3,4
84	Xilopentaosa	Et5		35,8 ± 7,7	69,8 ± 3,8

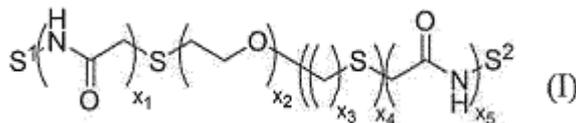
5 A través de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que el término "comprender", y variaciones tales como "comprende"

y "que comprende", implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

- 5 En la presente memoria descriptiva la referencia a cualquier publicación anterior (o información obtenida a partir de la misma), o a cualquier materia que se conozca, no se debe, y no se debería tomar como un conocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que la publicación anterior (o información obtenida a partir de la misma) o materia conocida forma parte del conocimiento general común en el campo del conocimiento al que se refiere la presente memoria descriptiva.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):



5

en la que:

S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> cada uno representa independientemente un resto de un oligosacárido persulfatado aniónico;

10

x<sub>1</sub> representa un número entero de 1 a 4;

x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 11;

x<sub>3</sub> representa un número entero de 0 a 10;

x<sub>4</sub> representa 0 o 1; y

x<sub>5</sub> representa un número entero de 1 a 4,

15

en el que dicho resto es la parte de dicho oligosacárido persulfatado aniónico que permanece en dicho conjugado cuando dicho oligosacárido persulfatado aniónico se une al resto de dicho conjugado y en el que S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> están unidos de forma covalente al resto del conjugado mediante la unión de cada uno de dichos oligosacáridos persulfatados aniónicos al resto del conjugado a través de sus extremos reductores.

20

2. El conjugado de oligosacárido aniónico de acuerdo con la reivindicación 1 en el que x<sub>1</sub> y/o x<sub>5</sub> son 1 o 2, y/o x<sub>5</sub> son 2, y/o en el que x<sub>2</sub> representa un número entero de 0 a 4, y/o en el que x<sub>3</sub> representa un número entero de 2 a 6, y/o en la que x<sub>4</sub> es 1.

25

3. El conjugado de oligosacárido aniónico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que x<sub>1</sub> y/o x<sub>5</sub> son 2.

4. El conjugado de oligosacárido aniónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que x<sub>3</sub> es 2.

30

5. El conjugado de oligosacárido aniónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que S<sup>1</sup> y S<sup>2</sup> se seleccionan independientemente entre un resto de maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, xilotetraosa, xilopentaosa, quitotetraosa y quitopentaosa persulfatadas.

35

6. El conjugado de oligosacárido aniónico de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicho conjugado se selecciona entre:

i) maltotriosa persulfatada unida a Et1, Et2, Et3, Et4 o Et5,

ii) maltopentaosa persulfatada unida a Et1, Et2, Et3, Et4 o Et5,

iii) maltotetraosa persulfatada unida a Et1, Et2, Et3, Et4 o Et5,

40

iv) quitotetraosa persulfatada unida a Et1, Et2, Et3, Et4 o Et5,

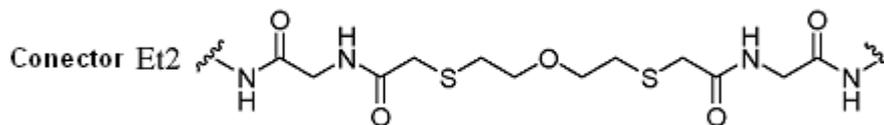
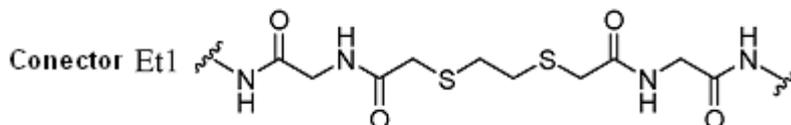
v) quitopentaosa persulfatada unida a Et1, Et2, Et3, Et4 o Et5,

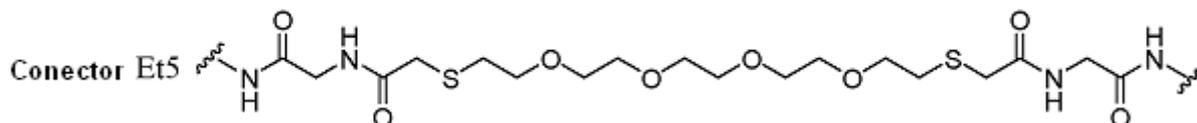
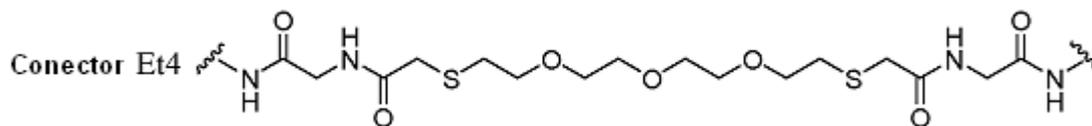
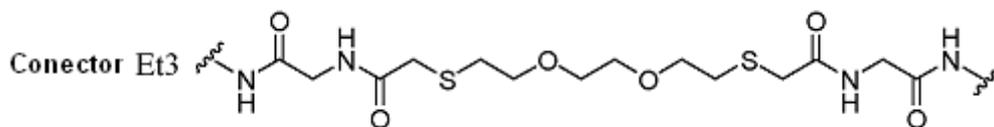
vi) xilotetraosa persulfatada unida a Et1, Et2, Et3, Et4 o Et5 y

vii) xilopentaosa persulfatada unida a Et1, Et2, Et3, Et4 o Et5,

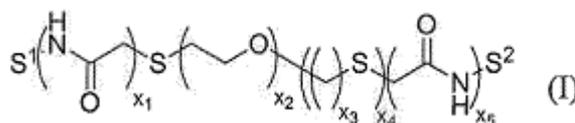
45

en el que los conectores Et1, Et2, Et3, Et4 y Et5 tienen la estructura:





5 7. Un método para preparar un conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):

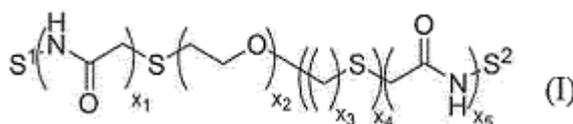


10 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el método las etapas de:

- a) transformar cada uno de los oligosacáridos en oligosacáridos persulfatados aniónicos; y
- b) conjugar los oligosacáridos;

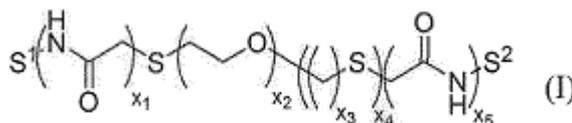
15 en el que las etapas a) y b) se pueden realizar en cualquier orden.

8. El uso de un conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):



20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno respiratorio inflamatorio.

25 9. El conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):



30 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno respiratorio inflamatorio.

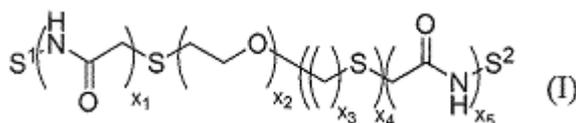
35 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 o el oligosacárido aniónico de la reivindicación 9 en los que el trastorno respiratorio inflamatorio se selecciona entre anafilaxia, asma, enfermedad respiratoria alérgica, rinitis alérgica, fibrosis subepitelial en hiperreactividad de las vías respiratorias, sinusitis crónica, rinitis alérgica perenne, aspergilosis broncopulmonar alérgica en pacientes con fibrosis quística, EPOC, ARDS/ALI, bronquitis eosinofílica, bronquiectasia, broncoespasmo, constricción bronquial, hiperreactividad bronquial, hipertrofia bronquial e inflamación bronquial.

11. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de oligosacárido aniónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

12. El uso de un conjugado de oligosacárido aniónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un ensayo o identificación sistemática excluyendo el cuerpo humano y animal.

5 13. Un ensayo o identificación sistemática excluyendo el cuerpo humano y animal para determinar el efecto biológico de uno o más conjugados de oligosacárido aniónico, comprendiendo el ensayo las etapas de:

a) poner en contacto un ligando o célula con uno o más conjugados de oligosacárido aniónico teniendo cada uno independientemente la siguiente fórmula (I):

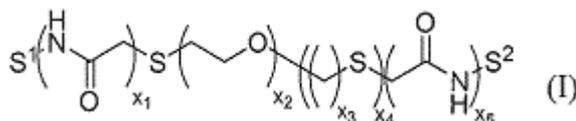


10

de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y

b) cuantificar un efecto del uno o más conjugados de oligosacárido aniónico en el ligando o célula.

15 14. Método para modular la actividad de un ligando, excluyendo el cuerpo humano y animal, que comprende poner en contacto el ligando con un conjugado de oligosacárido aniónico de fórmula (I):



20

de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

25 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14 en el que el ligando es un péptido, polipéptido, proteína, carbohidrato, lípido, glicoproteína o una molécula obtenida a partir de la identificación sistemática de producto natural o a partir de una biblioteca química, y/o en el que el ligando es una proteína que se une a un glucosaminoglucano seleccionado entre heparina, sulfato de heparina, condroitina e hialuronano.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15 en el que la proteína se selecciona entre histamina, una citoquina, un interferón, un factor de crecimiento, una enzima, una quimioquina o un receptor soluble o unido a célula o virus.

30 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16 en el que la citoquina es una interleuquina seleccionada entre IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, o un miembro de la familia IL-17 incluyendo a IL-25, o en el que el interferón se selecciona entre  $\alpha$ -interferón,  $\beta$ -interferón e  $\gamma$ -interferón, o en el que el factor de crecimiento se selecciona entre 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, MCP1, MCP2, MCP3, MCP4, MCP5, M-CSF, MIP1, MIP2, KC, NGF, NT 3, NT4, NT5, NT6, NT7, OSM, PBP, PBSF, PDGF, PECAM-1, PF4, RANTES, SCF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ <sub>1</sub>, TGF $\beta$ <sub>2</sub>, TGF $\beta$ <sub>3</sub>, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TPO, VEGF, GH e insulina, o en el que la enzima se selecciona entre superóxido dismutasa, proteína catiónica eosinofílica, una triptasa (incluyendo  $\beta$ -triptasa), una quimasa, una elastasa, fosfolipasa A2 o prostaglandina endoperóxido, o en el que la quimioquina se selecciona entre eotaxina-1, eotaxina-2 o eotaxina-3, o en el que el receptor soluble o unido a célula o virus es un receptor de trifosfato de inositol.

40

18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 en el que la modulación es inhibición.

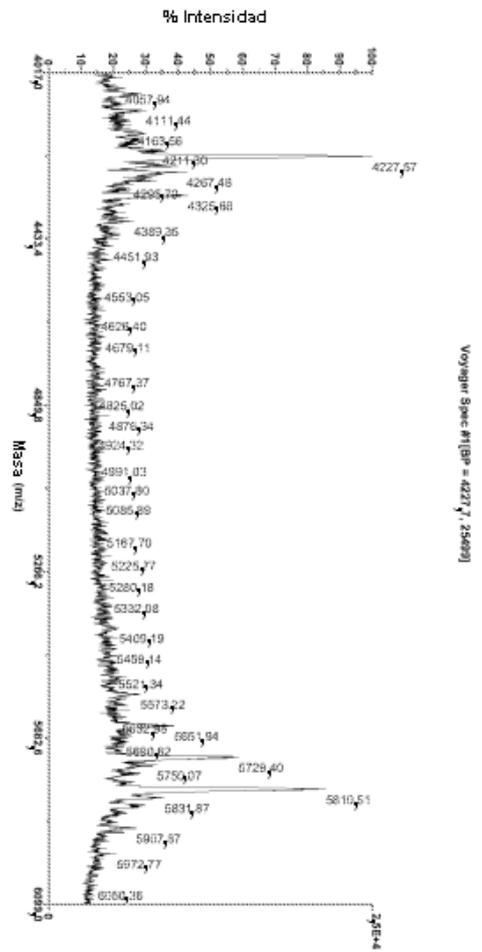


Figura 1

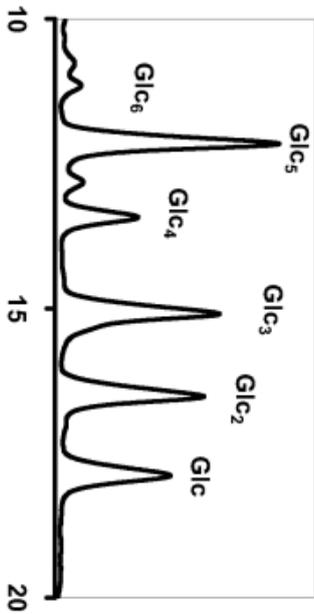


Figura 2

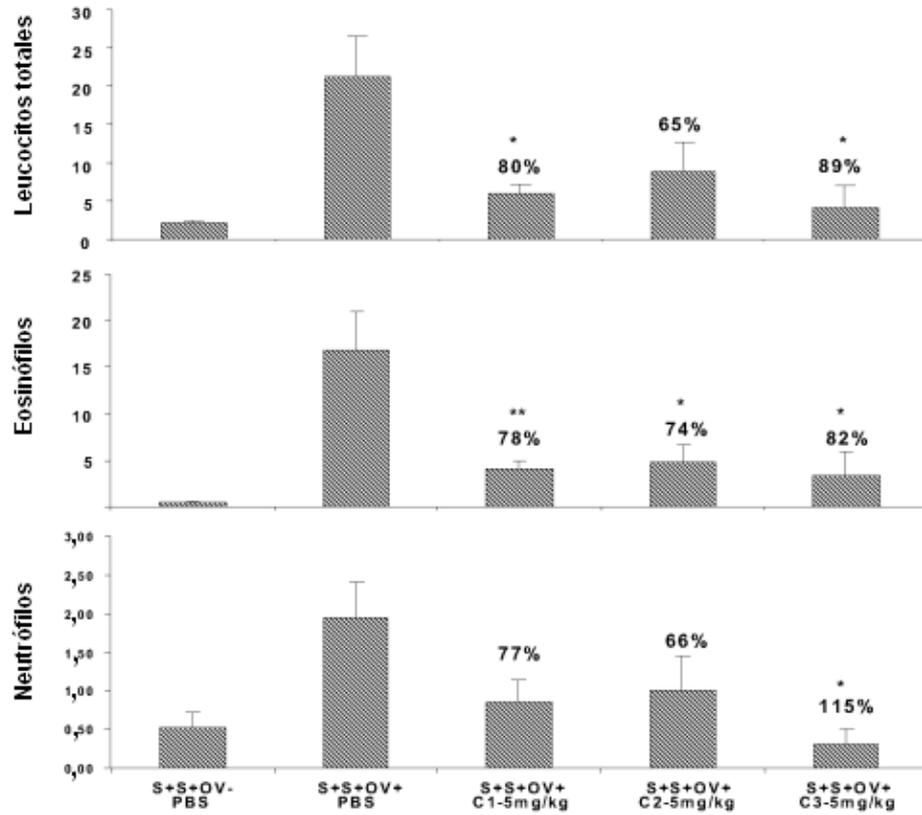


Figura 3

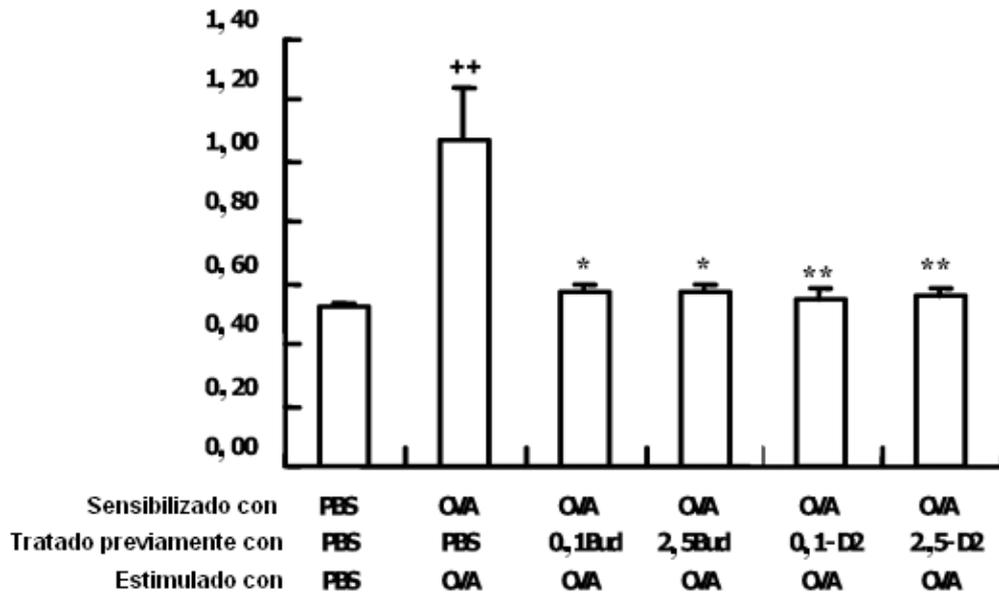


Figura 4

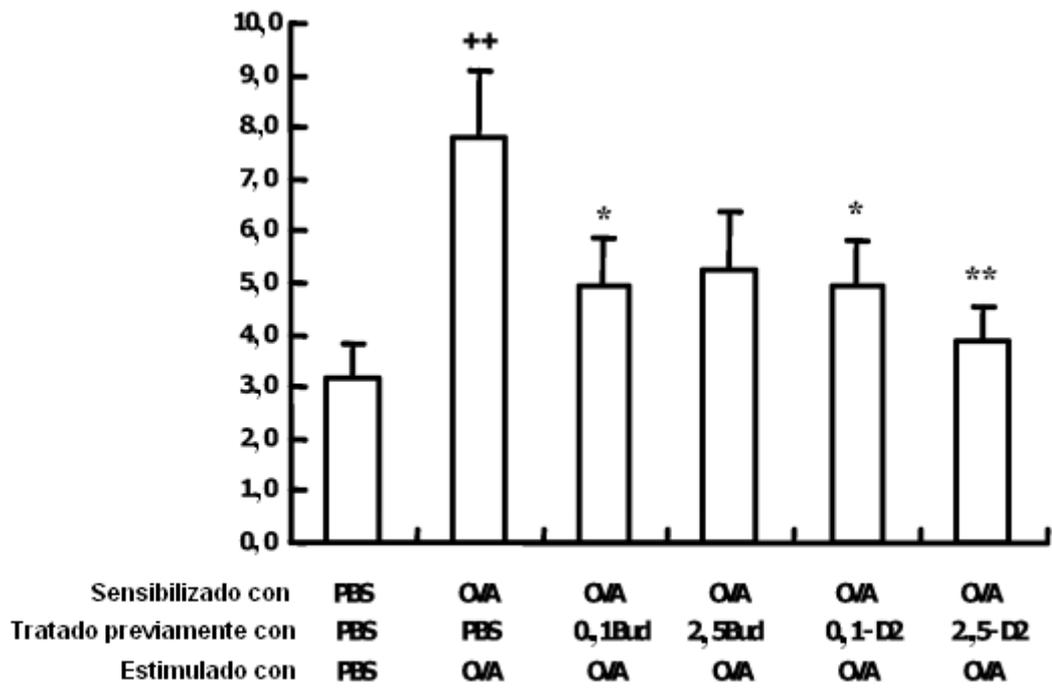


Figura 5

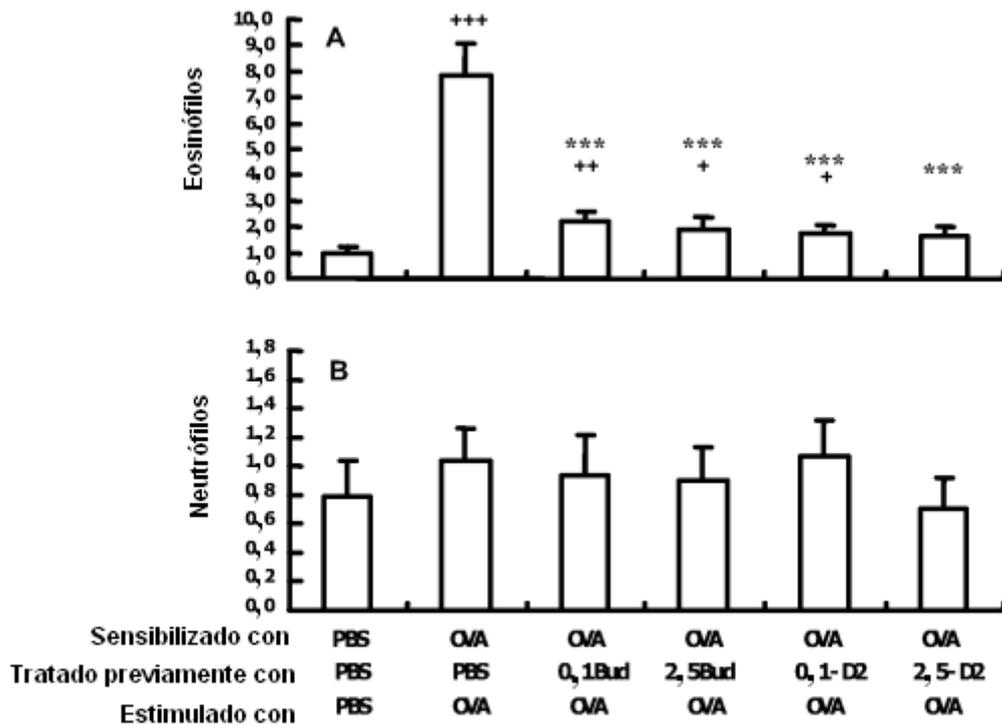


Figura 6