



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 778**

51 Int. Cl.:
A61K 31/727 (2006.01)
C08B 37/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01972468 .1**
96 Fecha de presentación : **12.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1427427**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

54 Título: **Derivados de glucosaminoglucanos parcialmente desulfatados como inhibidores de heparanasa, provistos de actividad antiangiogénica y desprovistos de efecto anticoagulante.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

73 Titular/es:
SIGMA-TAU RESEARCH SWITZERLAND S.A.
Via Alla Campagna 2A
6900 Lugano, CH

72 Inventor/es: **Casu, B.;**
Torri, G.;
Naggi, A.;
Giannini, Giuseppe;
Pisano, Claudio y
Penco, Sergio

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 778 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

Derivados de glucosaminoglucanos parcialmente desulfatados como inhibidores de heparanasa, provistos de actividad antiangiogénica y desprovistos de efecto anticoagulante

5 La invención descrita en el presente documento se refiere a heparinas parcialmente desulfatadas, a procedimientos para su preparación, a su uso como ingredientes activos para la preparación de medicamentos útiles en afecciones patológicas, como tumores, incluidas las formas metastásicas, y para cualquier indicación terapéutica que obtenga beneficios de la inhibición de la heparanasa, y a composiciones farmacéuticas que las contienen.

Estado de la técnica

10 Estudios realizados en la Unidad de Investigación Biológica de Tumores de la Hadassah-Hebrew University Hospital-Israel (Isr. Med. Assoc. J. 2000, 2, 37-45; J. Med. Chem. 2000, 43, 2591-600; Invasion Metastasis 1994-95, 14, 290-302; Exp. Cell Res. 1992, 201, 208-15;) se centran en la implicación de los factores de crecimiento de unión a heparina, heparán sulfato y enzimas de degradación de heparán sulfato (heparanasa) en la angiogénesis y la metástasis tumoral. Estos estudios se han aplicado a la detección selectiva y a la identificación de derivados de heparina y miméticos de heparina/heparán sulfato con una potente actividad de inhibición de heparanasa (Nature
15 Med. 1999, 5, 735-6; Science, 1999, 285, 33-4].

Las células tumorales liberan la enzima heparanasa, una endo- β -D-glucuronidasa que degrada la cadena polisacárida de los proteoglicanos de heparán sulfato sobre las superficies celulares y en la matriz extracelular.

20 La implicación de la heparanasa en la angiogénesis tumoral se ha correlacionado con la capacidad para liberar bFGF (FGF-2) y otros factores de crecimiento desde su almacenamiento dentro de la MEC (matriz extracelular). Estos factores de crecimiento proporcionan un mecanismo para la inducción de neovascularización en situaciones normales y patológicas.

Por tanto, la heparanasa puede facilitar no sólo la invasión de células tumorales y la metástasis sino también la angiogénesis tumoral, ambas etapas críticas en la progresión del tumor.

25 Inhibidores específicos de la enzima heparanasa impiden la liberación y la activación de los factores de crecimiento almacenados por heparán sulfato, así como la rotura de la MEC y se considera un abordaje muy prometedor para el desarrollo de fármacos anticancerosos.

Por tanto, uno de los posibles abordajes terapéuticos para un fármaco antiangiogénico es el desarrollo de un potente y selectivo inhibidor de heparanasa.

30 Para comentarios sobre la angiogénesis, se puede hacer referencia al documento WO 01/55221, en nombre del presente solicitante.

Otra implicación importante de la heparanasa es la inflamación y la autoinmunidad. De hecho, la actividad heparanasa se correlaciona también con la capacidad de células activadas del sistema inmunitario para salir de la circulación y producir respuestas inflamatorias y autoinmunitarias. La interacción de plaquetas, granulocitos, linfocitos T y B, macrófagos y mastocitos con la MEC subendotelial se asocia con la degradación de heparán sulfato mediante actividad de heparanasa. La enzima se libera desde los compartimentos intracelulares (es decir, lisosomas, gránulos específicos) en respuesta a varias señales de activación, lo que sugiere su implicación regulada y la presencia en sitios inflamatorios y lesiones autoinmunitarias. El tratamiento de animales experimentales con inhibidores de la heparanasa (es decir, especies no anticoagulantes de heparina de bajo peso molecular- HBPM) redujo marcadamente la incidencia de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE),
40 artritis adyuvante y rechazo del injerto en animales experimentales, lo que indica que los inhibidores de heparanasa se pueden aplicar para inhibir la enfermedad autoinmunitaria e inflamatoria.

Heparina

45 La heparina es una mezcla heterogénea de polisacáridos naturales de varias longitudes y varios grados de sulfatación que posee actividad anticoagulante y es secretada por los mastocitos del tejido conjuntivo presentes en el hígado (del que se aisló por primera vez), en los músculos, pulmones, timo y bazo.

Además de la secuencia regular, se ha identificado en la heparina una secuencia correspondiente al sitio activo de la actividad antitrombina.

La actividad antitumoral y antimetastásica de la heparina y sus derivados se debe a su capacidad para inhibir la heparanasa, para bloquear los factores de crecimiento y para regular la angiogénesis.

50

Heparán sulfatos (HS)

Los heparán sulfatos (HS) son ligandos proteicos ubicuos. Las proteínas se unen a las cadenas de HS para diversas acciones, desde la simple inmovilización o protección frente a la acción de degradación proteolítica hasta modulaciones específicas de actividades biológicas, tales como angiogénesis.

- 5 El esqueleto de hidrato de carbono, tanto en la heparina como en los heparán sulfatos (HS), consta de una alteración de D-glucosamina (GlcN) y ácidos hexurónicos (GlcA o IdoA).

En la heparina, los residuos GlcN son, principalmente, N-sulfatados, mientras que en los HS son N-sulfatados y N-acetilados, con una cantidad pequeña de grupos NH₂ insustituídos.

El HS también está, de medio, menos O-sulfatado que la heparina.

- 10 El uso de heparina en el tratamiento de los trastornos de angiogénesis, tales como tumores, particularmente metástasis, está sustancialmente limitado por la actividad anticoagulante de la heparina.

Se han efectuado modificaciones químicas en la heparina para reducir su capacidad anticoagulante, conservando al mismo tiempo sus propiedades antitumorales.

- 15 La abertura de una unidad de ácido glucurónico en el sitio de la antitrombina reduce la afinidad de la heparina por la antitrombina. De este modo, las heparinas se pueden usar con menos efectos anticoagulantes, pero todavía conservan propiedades antiangiogénicas.

Heparanasas

Las heparanasas son enzimas que pertenecen a una familia de endoglicosidasas (una endo-β-D-glucuronidasa) que hidroliza los enlaces glucosídicos internos de las cadenas de heparán sulfatos (HS) y heparona.

- 20 Estas endoglicosidasas están implicadas en la proliferación de las células tumorales, en la metástasis y en la neovascularización de los tumores. Estas enzimas son dianas biológicas de la actividad antiangiogénica. En la literatura científica hay un gran número de estudios de correlación estructura/actividad (véase, por ejemplo, Lapierre F. y col., Glycobiology, vol. 6, (3), 355-366, 1996). Aunque todavía quedan por aclarar muchos aspectos, se han comunicado estudios sobre la inhibición de las heparanasas por la heparina y sus derivados; usando pruebas específicas que han conducido a la aparición de consideraciones de un tipo estructural pueden servir como guías para la obtención de nuevos derivados más selectivos.

- 30 En el trabajo mencionado anteriormente de Lapierre y col., los derivados de heparina se describen tal como se obtienen mediante 2-O-desulfatación o mediante "división de glicol" (oxidación con peryodato y la posterior reducción con borohidruro sódico. Estos derivados, definidos en el presente documento como "heparina 2-O-desulfatada" y "RO-heparina", respectivamente, han mantenido parcialmente la actividad antiangiogénica de la heparina, evaluado por medio de la prueba CAM en presencia de corticosteroides (idem, página 360).

Se ha comunicado que los derivados de N-acil-heparina, que son imitadores más cercanos del heparán sulfato que la heparina, inhiben la heparanasa únicamente algo menos que los derivados N-sulfato. (Irimira T., Biochemistry 1986, 25, 5322-5328; Ishai-Michaeli R., y col, Biochemistry 1992, 31, 2080-2088).

- 35 Heparinas y FGF

Los FGF regulan múltiples procesos fisiológicos, tales como el crecimiento y la diferenciación celular, y también funciones implicadas en procesos patológicos, tales como la angiogénesis tumoral.

- 40 Los FGF son factores de crecimiento (una familia de más de 10 polipéptidos, de los cuales los FGF ácido (FGF-1) y básico (FGF-2) son los que se han estudiado más, que requieren un factor polisacárido, heparina o HS, para unirse al receptor de FGF (FGFR) y activarlo.

Aunque el mecanismo preciso por el que la heparina y el HS activan los FGF se desconoce, se sabe, no obstante, que la heparina/FGF/FGFR forman un complejo "trimolecular" o "ternario".

Un mecanismo postulado es que la heparina y el HS inducen la denominada dimerización en sándwich del FGF y, este último, aunque dimerizado, forma un complejo estable con el FGFR.

- 45 Actividad antimetastásica de los derivados de heparina

La capacidad de un tumor primario para generar células metastásicas es, quizá, el principal problema con el que se enfrenta la terapia anticancerosa.

Los derivados de heparina con una actividad considerable para bloquear la heparanasa parecen ser igualmente

capaces de inhibir la angiogénesis tanto en tumores primarios como en metástasis.

Además, la inhibición de la heparanasa reduce la capacidad de migración de las células tumorales desde el tumor primario a otros órganos.

Se ha descubierto que la actividad antimetastásica en modelos animales se correlaciona con la capacidad inhibidora de heparanasa de la heparina y los derivados de la heparina (Bitan M. y col, *Isr. J. Med. Sci.* 1995, 31, 106-108) así como otros polisacáridos sulfatados (Miao, H. Q. et al, *Int. J. Cancer* 1999, 83, 424-431, y referencias citadas en el mismo). Estudios sobre la dependencia del peso molecular de la actividad antimetastásica indicaron que también las heparinas de peso molecular muy bajo (Sciumbata, T., y col., *Invasion Metastasis* 1996, 16, 132-143) y los polisulfatos oligosacáridos (Parish, C.R., y col, *Cancer Res.* 1999, 59, 3433-3441) conservan una actividad antimetastásica significativa. Aunque, en general, la eliminación de los grupos N-sulfato (N-desulfatación) disminuye el potencial antimetastásico de las heparinas, esta actividad se restaura parcialmente tras la N-acilación (N-acetilación, N-hexanoilación (Bitan M., 1995), y N-succinilación (Sciumbata, T., 1996) de los grupos NH₂ libres resultantes. Se ha descubierto que la actividad antimetastásica de las heparinas se correlacionaba inversamente con sus grados de O-sulfatación. (Bitan M., 1995). No obstante, la 2-O-desulfatación selectiva de residuos de ácido idurónico no implicó una fuerte reducción de la actividad antimetastásica de la heparina (Lapierre, F., *Glycobiology* 1996, 6, 355-366).

En general, tanto la actividad inhibidora de heparanasa como la actividad antimetastásica de las heparinas y otros polisacáridos sulfatados disminuyen al disminuir el peso molecular y el grado de sulfatación (Bitan M., 1995; Parish, C.R., 1999). No obstante, estas actividades también dependen del armazón carbohidrato del polisacárido (tipo de residuos y posición de los enlaces glicosídicos) (Parish, C. R., 1999). Dado que la estructura tridimensional del sitio activo de la heparanasa todavía no se conoce, es difícil predecir qué armazones polisacáridos y patrones de sulfatación inhibirán de un modo más eficaz la enzima.

En base a los presentes conocimientos, los requisitos estructurales de las moléculas similares a heparina que favorecen la acción de inhibición de la angiogénesis se pueden agrupar en dos categorías en base a la diana que se pretende bloquear

a) inhibición de la heparanasa: Aunque esta enzima reconoce y escinde las secuencias de heparina y HS de al menos ocho unidades monosacáridas que contienen ácido N-acil-glucosamina-glucurónico (o residuos de glucosamina N-sulfatada, véase, por ejemplo, D. Sandback-Pikas et al. *J. Biol. Chem.*, 273, 18777-18780 (1998) y las referencias citadas), su inhibición puede realizarse con eficiencia mediante fragmentos de heparina más largos que los tetradecasacáridos (Bitan M., 1995) o mediante oligosacáridos más cortos muy sulfatados, tales como sulfato de maltohexaosa (MHS) y sulfato de fosfonamopentaosa (PI-88) (Parish, C. R., 1999). No obstante, tanto los fragmentos largos de heparina como los oligosacáridos muy sulfatados son anticoagulantes, una propiedad que debe evitarse para potenciales fármacos antimetastásicos;

b) inhibición de factores de crecimiento angiogénicos (tipo de fibroblasto: FGF-1 y FGF-2; tipo de endotelio vascular: VEGF; tipo de permeabilidad vascular: VPF): Para este fin, los compuestos similares de heparina tienen, preferentemente, secuencias de al menos cinco unidades de monosacáridos de longitud, que contienen ácido idurónico 2-sulfatado y glucosamina N,6-sulfatada (véase, por ejemplo, M. Maccarana y col. *J. Biol. Chem.*, 268, 23989-23905 (1993)).

La literatura divulga péptidos pequeños (aminoácidos 5-13) con actividad antiangiogénica (patente de EE.UU. 5.399.667 de la University of Washington) que actúan uniéndose a un receptor de trombospondina; o péptidos más largos (50 aminoácidos, aproximadamente).

Se conocen factores modificados de plaquetas (documento EP 0 589 719, Lilly), capaces de inhibir la proliferación endotelial con CI₅₀= 7 nM.

Los fragmentos de oligosacáridos con actividad antiangiogénica también se han descrito ampliamente: de hecho, se ha descubierto que al variar la secuencia de carbohidrato se puede incrementar la selectividad de la interacción.

Además, la heparina se puede usar como vehículo para sustancias que son por sí mismas antiangiogénicas, tales como algunos esteroides, explotando la afinidad de la heparina por células endoteliales vasculares; véase, por ejemplo, el documento WO 93/18793 de la University of Texas and Imperial Cancer Research Technology, en el que se reivindican heparinas con ligadores lábiles a ácidos, tales como hidrazina de ácido adípico, unidas a cortisol. El efecto antiangiogénico de las moléculas conjugadas es mayor que el de las moléculas no conjugadas, incluso cuando se administran simultáneamente.

En *Biochim. Biophys. Acta* (1996), 1310, 86-96, las heparinas unidas a esteroides (p. ej., cortisol) se describen con un grupo hidrazona en C-20 que presentan mayor actividad antiangiogénica que las dos moléculas sin conjugar.

El documento EP 0 246 654 de Daiichi Sc. Describe polisacáridos conjugados con actividad antiangiogénica con estudios de fase II. El documento EP 0 394 971 de Pharmacia & Upjohn - Harvard Coll. describe hexasacáridos, fragmentos de heparina, con sulfatación baja, capaces de inhibir el crecimiento de células endoteliales y la angiogénesis estimulada por el FGF-1. El documento EP 0 618 234 de Alfa Wasserman describe un procedimiento para preparar glucosaminoglucanos semisintéticos con una heparina o estructura de heparán portador de un grupo nucleofílico. El documento WO 95/05182 de Glycomed describe varios oligosacáridos sulfatados con actividad anticoagulante, antiangiogénico y antiinflamatoria. El documento US 5.808.021 de Glycomed describe un procedimiento para preparar heparina 2-O, 3-O desulfatada sustancialmente no despolimerizada con un porcentaje de desulfatación en las posiciones 2 del ácido idurónico (I, 2-O) y en la posición 3 de la unidad de glucosamina (A, 3-O) que varía de aproximadamente 99 a aproximadamente 75 % del porcentaje original. Este procedimiento prevé la desulfatación realizada en presencia de un catión de un metal bivalente, ejemplificado por calcio o cobre, seguido de liofilización del producto obtenido. Las heparinas desulfatadas tienen actividad antiangiogénica. El documento EP 0 251 134, Yeda Res & Dev Co Ltd y col. divulga el uso de dosis subcoagulantes de heparina o sus derivados para prevenir el rechazo del aloinjerto y tratar las enfermedades autoinmunitarias. La actividad de la heparina se proporciona mediante inhibición de la heparanasa. El documento WO 88/05301, Univ. Australian Nat., divulga composiciones antimetastásicas y/o antiinflamatorias que contienen un polisacárido sulfatado, que es un inhibidor de la heparanasa. Se proporcionan heparina flucoidan, pentosán sulfato, dextrano sulfato. El documento WO 92/01003, Univ. Texas System, divulga el uso de un derivado de heparina, que está desprovisto de actividad anticoagulación, como inhibidor de la heparanasa. Estos derivados tienen grupos sulfamino u O-sulfato, PM 1000-15000, y cada unidad monomérica terminal es una unidad repetidora monomérica con un átomo O terminal unido a un grupo de bloqueo. Los documentos WO 94/14851 y WO 96/06867, Glycomed proporcionan heparina mucosa 2-O, 3-O-desulfatados o fragmentos de los mismos, estando al menos un 96,7% desulfatado en la posición 2-O y al menos un 75 % desulfatado en la posición 3-O útiles como inhibidores de la heparanasa no anticoagulantes. Los documentos WO 95/09637 y WO 96/09828, Glycomed, divulgan compuestos de maltooligosacárido altamente sulfatados con propiedades similares a la heparina. El documento WO 95/30424, Glycomed, proporciona heparina 6-O-desulfatada o fragmentos de la misma con actividad inhibidora de heparanasa. El documento WO 96/33726, Univ. Australian Nat., divulga oligosacáridos sulfatados como miméticos de heparán que tienen actividad inhibidora de heparanasa. El documento WO 01/35967, Knoll AG, proporciona un procedimiento para tratar la insuficiencia cardíaca y afecciones relacionadas administrando un inhibidor de la heparanasa, entre los cuales se menciona la heparina que tiene grupos COOH parcialmente reducidos o está al menos parcialmente N-desulfatada y N-acetilada o está al menos en parte N,O-desulfatada y N-resulfatada o está O-acetilada.

El objetivo de la invención descrito en el presente documento es encontrar estructuras de glucosaminoglucano óptimas para generar actividad antiangiogénica en base a la inhibición de la heparanasa y/o mecanismos de inhibición del factor de crecimiento FGF. Un objetivo adicional de la invención descrito en el presente documento es proporcionar un medicamento con actividad antiangiogénica que está esencialmente desprovisto de los efectos secundarios típicos de los derivados de la heparina, tales como, por ejemplo, actividad anticoagulante.

El documento WO 01/55221, en el nombre del solicitante, divulga glucosaminoglucanos, en particular una heparina desulfatada, con un grado de desulfatación no mayor que 60 % de las unidades urónicas totales. Estos derivados se proporcionan con actividad antiangiogénica y están desprovistos de actividad anticoagulante. Dichos compuestos ejercen su actividad antiangiogénica en base a la inhibición de FGF. No se ha previsto ninguna actividad de inhibición de heparanasa.

En términos bastante generales, el documento WO 01/55221 también proporciona una heparina modificada, que contiene residuos de glucosamina con diferentes grados de N-desulfatación y acetilación posterior opcional total o parcial. Las enseñanzas generales de dicha referencia no describen explícitamente las etapas de N-desulfatación y la posterior acetilación opcional total o parcial.

Resumen de la invención

La desulfatación llevada a cabo en las condiciones descritas en la presente invención también produce la formación de unidades idurónicas con un anillo oxiránico en la posición 2,3. La abertura del anillo oxiránico en las condiciones descritas en la presente invención dan lugar a unidad es de L-idurónico o L-galacturónico.

Es un objeto de la invención descrita en el presente documento una heparina modificada que contiene residuos de glucosamina con diferentes grados de N-desulfatación y la posterior N-acetilación obtenibles mediante el procedimiento que se divulga a continuación en el presente documento.

Los compuestos que son materia objeto de la invención descrita en el presente documento se caracterizan por una potencia elevada para inhibir la heparanasa con interesantes propiedades antiangiogénicas y, por tanto, son útiles como ingredientes activos para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades que obtienen beneficios de la inhibición de la heparanasa, enfermedades basadas en una angiogénesis anómala y, particularmente, para el tratamiento de metástasis.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención también inhiben FGF.

De forma ventajosa, los compuestos de acuerdo con la presente invención muestran propiedades anticoagulantes reducidas, si no inexistentes, de modo que se evitan o reducen los efectos secundarios típicos de las heparinas. Otra ventaja surge del hecho de que los compuestos de acuerdo con la invención se pueden caracterizar con técnicas analíticas instrumentales, tales como espectroscopia RMN, de modo que se permite el control del proceso que es absolutamente deseable desde el punto de vista industrial.

En las heparinas modificadas, el peso molecular (PM) tiene una función muy importante al fabricar inhibidores de la angiogénesis. De hecho, es bien sabido que una reducción del peso molecular (PM) hasta valores correspondientes a las unidades pentasacáridas no conduce a una pérdida de actividad antiangiogénica. Por otro lado, se ha establecido que, mientras que más allá de una cierta longitud las cadenas de heparina favorecen en lugar de inhiben la activación de FGF, son incluso mejores inhibidores de la heparanasa que las cadenas más cortas. No obstante, la longitud de la cadena óptima para la inhibición de la heparanasa depende de la estructura del inhibidor (armazón de hidrato de carbono, enlaces posicionales, patrón de sulfatación) y se establecerán para cualquier tipo de potencial inhibidor.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de acuerdo con la presente invención que contienen residuos de glucosamina con diferentes grados de N-desulfatación y la posterior acetilación se divulgan específicamente en el presente documento y se reivindican como nuevos compuestos.

Lo que se quiere decir con grado de desulfatación es el porcentaje de ácidos idurónicos no sulfatados en relación con los ácidos urónicos totales presentes inicialmente en la heparina de partida. Un intervalo inicial preferido para el porcentaje de desulfatación es de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 %.

Un primer compuesto preferido es una heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada con un peso molecular (PM) de 11.200, un índice de polidispersión de 1,3, un grado de desulfatación de 1,6 (expresado como las proporciones molares SO_3 : COO, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30 % y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 50 %. Dicho compuesto también se denomina ST1518

Un segundo compuesto preferido es una heparina de bajo peso molecular parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada con un peso molecular de $M_n = 4780$, $M_w = 10.000$, un índice de polidispersión de 2,092, un porcentaje de ácidos urónicos modificados comparados con los ácidos urónicos totales de aproximadamente 30 % y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 50 %. Dicho compuesto también se denomina a continuación ST2168.

Un tercer compuesto preferido es una heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30 % y los residuos de glucosamina tienen un grado de acetilación del 27%. Este compuesto también se denomina a continuación ST2185.

Un cuarto compuesto preferido es una heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30 % y los residuos de glucosamina tienen un grado de acetilación del 39%. Dicho compuesto también se denomina a continuación ST2186.

Un quinto compuesto preferido es una heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30 % y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 64%. Dicho compuesto también se denomina a continuación ST2187.

En cuanto a los glucosaminoglucanos N-desulfatados y opcionalmente N-acetilados de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar sometiendo la heparina al procedimiento, que consiste en las siguientes etapas:

a) N-desulfatación mediante hidrólisis solvolítica de los residuos de sulfamino en $\text{DMSO:H}_2\text{O}$ 95:5 v:v a temperatura ambiente durante un tiempo que varía de 0,5 a 8 horas e incluso más preferentemente 2 horas, para dar la eliminación total o parcial de los grupos sulfato en la posición 2 de los residuos de glucosamina;

b) N-acetilación de dichos grupos total o parcialmente desulfatados en la posición 2 de los residuos de glucosamina mediante tratamiento en solución acuosa alcalina (pH 8-9) con un agente acetilante, tal como anhídrido de acetilo, para dar grupos total o parcialmente acetilado en la posición 2 de los residuos de glucosamina;

c) oxidación de los dioles con peryodato sódico, para dar la abertura del anillo glicósido y la formación de dos

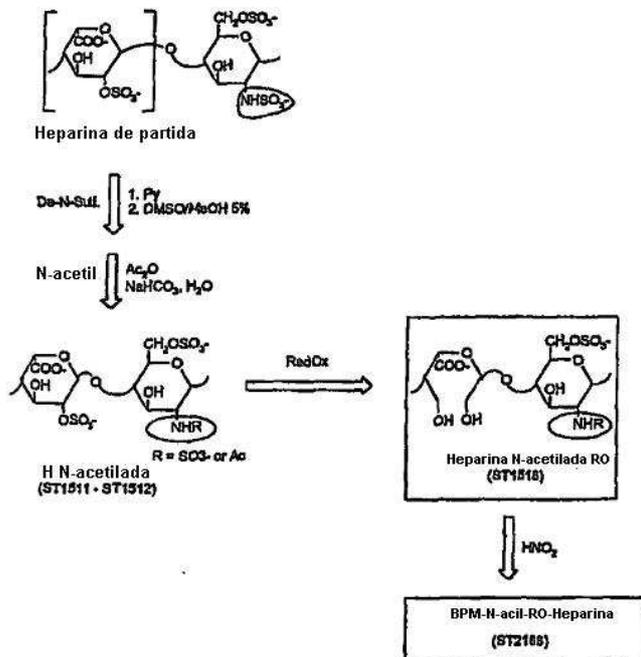
grupos aldehídos por residuo modificado;

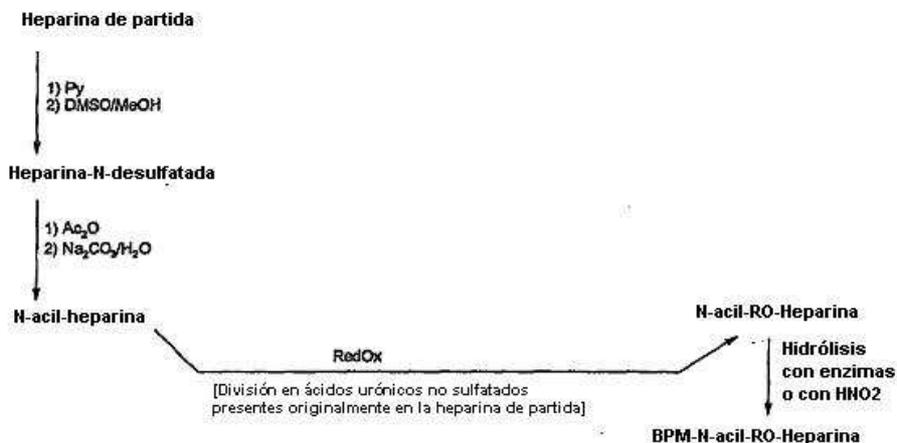
d) reducción de dichos grupos aldehídos en el alcohol primario;

5 e) hidrólisis ácido opcional de compuestos obtenidos en la etapa d) para obtener oligosacáridos correspondientes a las secuencias regulares, preferentemente mediante desaminación con ácido nitroso. Esta reacción, que normalmente se aplica para obtener heparina de bajo peso molecular escindiendo el enlace entre los residuos de N-sulfato glucosamina y el siguiente ácido urónico, conduce a un compuesto de bajo peso molecular que tiene en el extremo no reductor un residuo que consiste en un ácido urónico y en el extremo reductor un residuo de manosa anhidra, esta última puede modificarse adicionalmente a anhidromanitol mediante reducción con borohidruro. Los compuestos de bajo peso molecular obtenidos contienen al menos un residuo de glicol-ácido idurónico dividido; o, como alternativa

f) someter los productos obtenidos en la etapa d) a hidrólisis enzimática parcial con una enzima seleccionada del grupo que consiste en liasa, heparinasa, heparitinasa o equivalente, para dar oligosacáridos, preferentemente tetra u octasacáridos, consistiendo el residuo terminal no reductor en ácido idurónico no saturado, consistiendo el residuo terminal reductor en una N-sulfoglucosamina y que contiene al menos un residuo de ácido idurónico abierto.

15 El procedimiento de acuerdo con la presente invención también se ilustra en los esquemas siguientes:





De acuerdo con la invención descrita en el presente documento, el compuesto preferido es:

5 - N-acetilheparina (50 %), obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente, en el que la etapa a) se realiza durante 2 horas a temperatura ambiente y la etapa b) durante 2 horas a 4 °C, la etapa c) se realiza a 4 °C durante una noche, la etapa d) durante 3 horas a temperatura ambiente y que tiene un peso molecular (PM) de 11.200, un índice de polidispersión D de 1,3, un grado de desulfatado de 1,6 (expresado como la proporción molar SO₃COO); un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30% (denominado también a continuación en el presente documento y ST1518).

10 - N-acetilheparina de bajo peso molecular (50 %), obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente, en el que la etapa a) se realiza durante 2 horas a temperatura ambiente y la etapa b) durante 2 horas a 4 °C, la etapa c) se realiza a 4 °C durante una noche, la etapa d) durante 3 horas a temperatura ambiente, la etapa e) se realiza mediante desaminación con ácido nitroso a 4 °C durante 17 minutos, seguido de reducción de los grupos aldehído con borohidruro a temperatura ambiente durante 3 horas y que tiene un peso molecular de Pm= 4780, Mn= 10.000, un índice de polidispersión D de 2,092, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con los ácidos urónicos totales de aproximadamente 30 % (denominado también a continuación en el presente documento ST2168).

20 Los pesos moleculares se determinan mediante HPLC-GPC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento-cromatografía de permeación en gel). El grado de sulfatación se determina mediante conductimetría y el porcentaje de ácidos urónicos modificados mediante RMN ¹³C.

PM es el peso molecular y D es el índice de polidispersión expresado como PM/Mn.

25 De acuerdo con la invención descrita en el presente documento, los productos de partida son heparinas naturales. También es posible usar heparinas químicamente modificadas con un contenido porcentual de N6-disulfato que varía de 0 a 100%. Comenzando desde productos con un contenido de glucosamina 6-O-sulfatada, es posible modular la longitud de las secuencias regulares entre un ácido idurónico abierto y otro. Las heparinas de acuerdo con la invención que presentan abertura del anillo glicósido se denominan, de forma convencional, derivados de RO por los expertos en el campo, que quiere decir que el anillo glicósido se ha abierto por medio de una acción de oxidación, seguido de una reducción (Reducción-Oxidación- RO). Esta abertura del anillo glicósido también se denomina de forma convencional "glicol dividido", denominado así por la formación de los dos hidroxí primarios presentes en el anillo abierto. Los compuestos denominados en el presente documento también se denominarán derivados de "RO" o de "glicol dividido".

35 Las heparinas de la invención también se pueden usar como vehículos para otros tipos de fármacos, por medio de unión adecuada con la porción de heparina que es capaz de proporcionar un enlace estable en condiciones normales de fabricación y almacenamiento de un fármaco formulado, que, no obstante, libera el fármaco transportado en el cuerpo, preferentemente en las proximidades del órgano diana. Ejemplos de fármacos que se

pueden transportar son fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, corticosteroides y otros fármacos con acción antimetastásica, en cuyo caso habrá una ventajosa potenciación del efecto antimetastásico como resultado de la suma de las actividades intrínsecas por separado de los compuestos de acuerdo con la invención y el agente antimetastásico unido, con las ventajas relacionadas de una selectividad diana superior y menor toxicidad sistémica. Ejemplos de estos fármacos son los inhibidores de la metaloproteinasas. Otros fármacos que pueden transportar de forma útil son aquéllos que actúan a nivel endotelial.

En el caso de los compuestos de acuerdo con la invención que derivan de la heparina, éstos se preparan a partir de la heparina como tal por medio de N-desulfatación, seguido de N-acilación usando técnicas conocidas para los expertos técnicos en el campo. Por ejemplo, la N-desulfatación se realiza mediante solvolisis en solución de DMSO:H₂O a 95:5 v:v a temperatura ambiente durante el tiempo que varía de 0,5 a 8 horas, seguido de N-acilación en condiciones alcalinas con, por ejemplo, acilanhídridos (es decir, acetilo, hexanoílo, succinilo, pivaloílo). Las heparinas de la invención pueden además degradarse con agentes ácidos en condiciones de pH adecuadas, por ejemplo a pH 4, para dar una mezcla de oligosacáridos que mantienen las propiedades antiangiogénicas.

Objetos de la invención descrita en el presente documento son composiciones farmacéuticas que contienen como su ingrediente activo al menos una heparina modificada descrita en el presente documento. El ingrediente activo de acuerdo con la presente invención estará en una mezcla con vehículos y/o excipientes adecuados de uso habitual en la tecnología farmacéutica, tal como, por ejemplo, los descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", la edición más reciente. Las composiciones de acuerdo con la presente invención contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo. Las dosis serán determinadas por el experto en el campo, por ejemplo el clínico o el médico de atención primaria de acuerdo con el tipo de enfermedad que se va a tratar y el estado del paciente, o de forma concomitante con la administración de otros ingredientes activos. A modo de ejemplo se pueden indicar dosis que varían de 0,1 a 100 mg/kg.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas son aquéllas que se pueden administrar por vía oral o parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o en forma de nebulizaciones nasales u orales. Composiciones farmacéuticas adecuadas para los fines son comprimidos, cápsulas duras o blandas, polvos, soluciones, suspensiones, jarabes y formas sólidas para preparaciones líquidas extemporáneas. Composiciones para administración parenteral son, por ejemplo, todas las formas inyectables intramusculares, intravenosas y subcutáneas, así como soluciones, suspensiones y emulsiones. También se deben mencionar formulaciones de liposomas. Los comprimidos también incluyen formas para la liberación controlada del ingrediente activo, ya sea en formas de administración oral, comprimidos recubiertos con capas adecuadas, polvos microencapsulados, complejos con ciclodextrinas, formas de liberación prolongada, por ejemplo formas subcutáneas, tales como inyecciones o implantes de liberación prolongada.

Los compuestos de acuerdo con la invención descrita en el presente documento poseen actividad anti-heparanasa y antiangiogénica. Esto los convierte en adecuados para la preparación de medicamentos útiles para el tratamiento de sujetos, en general mamíferos y, particularmente, sujetos humanos que sufren angiogénesis alterada o sujetos que necesitan un tratamiento que inhibe la actividad heparanásica.

Ejemplos de enfermedades tratadas con el medicamento que es el objeto de la presente invención son tumores primarios, metástasis, retinopatías diabéticas, psoriasis, fibroplasia retrolenticular, reestenosis tras angioplastia, derivación coronaria, inflamación, artritis, enfermedades autoinmunitarias, rechazo del aloinjerto, enfermedades cardiovasculares, enfermedades fibroproliferativas, enfermedades provocadas por agregación plaquetaria anómala, enfermedades provocadas por proliferación del músculo liso, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis aguda, hipertensión pulmonar neonatal, asma, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar adulta, hipertensión vascular renal, retinopatías proliferativas, encefalopatía autoinmunitaria experimental, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn.

De forma ventajosa, los compuestos de acuerdo con la presente invención están sustancialmente desprovistos de los efectos secundarios típicos de la heparina. En particular, los compuestos de acuerdo con la presente invención están sustancialmente desprovistos de actividad anticoagulante. Por sustancialmente desprovisto de dicha actividad, el experto en la materia quiere decir ninguna, o sólo insignificante, actividad desde el punto de vista del uso clínico.

La actividad de inhibición de heparanasa se determinó de acuerdo con un procedimiento establecido por el grupo de Vlodavsky (Bitan M. y col., 1995). El procedimiento se basa en la evaluación de la extensión de la fragmentación de las cadenas de heparán sulfato de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) causada por la heparanasa. La matriz extracelular (MEC) marcada con sulfato se usa con mayor frecuencia como fuente de HSPG. La MEC marcada con sulfato se incubaba con heparanasa recombinante a pH 6,2 en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto de prueba. Para evaluar la producción de degradación de proteoglicano, el medio de incubación se recoge y aplica para filtración en gel en columnas de sefaroza 6B (0,9 x 30 cm). Las

5 fracciones (0,2 ml) se eluyen con PBS a un caudal de 5 ml/h y se cuenta la radioactividad. El volumen excluido (V_0) se marca con azul dextrano y el volumen incluido total (V_t) con rojo fenol. Los fragmentos de degradación de las cadenas laterales de HS se eluyen en la columna de Sefarosa 6B a $0,5 < K_{av} < 0,8$ (pico II). En las condiciones experimentales comunicadas, los buenos inhibidores de heparanasa inhiben la fragmentación de HS a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ o menores.

Los resultados se muestran en la Tabla 1 que se expone a continuación.

Tabla 1

Inhibición de heparanasa a dosis variables de 25 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$				
	Dosis	Inhibición		
		25 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
	Heparina	100 %	nd	>100 %
ST1516*	Heparina 40% RO	100 %	nd	>85 %
ST1514*	Heparina ~50% RO	100 %	100 %	>85 %
ST1515*	Heparina 27,5 % RO	100 %	100 %	100 %
ST1518	50 % Heparina NAC 30 % RO	100 %	100 %	>85 %
*Compuesto de referencia divulgado en el documento 01/55221				

Cabe destacar que ST1518 tiene una actividad de inhibición alta incluso a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.

10 Los compuestos de acuerdo con la presente invención, y en particular uno nuevo, se analizaron para determinar su actividad con respecto a los factores de crecimiento FGF, con el mismo modelo experimental que el descrito en el documento WO 01/55221 y se ha demostrado una actividad comparable con las divulgadas en la referencia citada.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

15 ST1518

A una solución acuosa de 1 g de heparina, previamente eluida de una columna de Amberlite IR 120, se añadió un exceso de piridina. La solución se evaporó a presión reducida; la sal de piridina resultante de la heparina se disolvió en 50 ml de una mezcla de DMSO/ H_2O a 95:5 y se agitó a 20 °C durante 2 horas, con el fin de obtener un grado de desulfatación de aproximadamente 50 %.

20 Después, la solución se diluyó con un volumen igual de una solución saturada de NaHCO_3 . La solución se sometió a diálisis contra agua destilada en membranas (corte 1000-2000D). El producto final se aisló mediante evaporación a presión reducida.

25 La heparina N-acetilada se preparó mediante N-acetilación de heparina-N-desulfatada al 50%. 1 g de heparina se disolvió en 10 ml de agua destilada; la solución se enfrió hasta 4 °C y se saturó con hidrogenocarbonato de sodio; a esta solución se añadieron 625 μl de anhídrido acético y la mezcla se agitó durante 2 horas a 4 °C. Durante la reacción, el pH se controló y se mantuvo a aproximadamente 8 añadiendo hidrogenocarbonato de sodio. Después, la solución obtenida se sometió a diálisis contra agua destilada en membranas (corte 2000-1000D).

30 1 g de heparina N-acetilada al 50 % se disuelve en 25 ml de agua destilada y se enfrió hasta 4 °C. Tras la adición de 25 ml de una solución de NaIO_4 0,2 M, la solución se deja agitar en oscuridad durante 20 horas y la reacción se detiene añadiendo etilenglicol y las sales se eliminan mediante ultrafiltración tangencial. A la solución desalada se añaden 400 mg de NaBH_4 , subdivididos en varias porciones. La solución se deja agitar durante 3 horas a temperatura ambiente, después se neutraliza con HCl diluido y se desala mediante ultrafiltración tangencial.

El espectro de RMN de ^{13}C del compuesto se muestra en la figura 1.

REIVINDICACIONES

- 1.- Heparina modificada que contiene residuos de glucosamina con diferentes grados de N-desulfatación, en el que dicha N-acetilación posterior obtenible sometiendo la heparina al procedimiento que consiste en las etapas siguientes:
- 5 a) N-desulfatación mediante hidrólisis solvolítica de los residuos de sulfamino en DMSO:H₂O 95:5 v:v a temperatura ambiente durante un tiempo que varía de 0,5 a 8 horas, para dar la eliminación total o parcial de los grupos sulfato en la posición 2 de los residuos de glucosamina;
- b) N-acetilación de dichos grupos total o parcialmente desulfatados en la posición 2 de los residuos de glucosamina mediante tratamiento en solución acuosa alcalina (pH 8-9) con un agente acetilante, para dar grupos total o
- 10 parcialmente acetilado en la posición 2 de los residuos de glucosamina;
- c) oxidación de los dioles con peryodato sódico, para dar la abertura del anillo glicósido y la formación de dos grupos aldehídos por residuo modificado;
- d) reducción de dichos grupos aldehídos en el alcohol primario;
- e) hidrólisis ácida opcional de compuestos obtenidos en la etapa d) para obtener oligosacáridos correspondientes a las secuencias regulares, o, como alternativa,
- 15 f) someter los productos obtenidos en la etapa d) a hidrólisis enzimática parcial con una enzima seleccionada del grupo que consiste en liasa, heparinasa, heparitinasa o equivalente, para dar oligosacáridos, preferentemente tetra u octasacáridos, consistiendo el residuo terminal no reductor en ácido idurónico no saturado, consistiendo el residuo terminal reductor en una N-sulfoglucosamina y que contiene al menos un residuo de ácido idurónico abierto.
- 20 2.- La heparina de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en:
- heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada con un peso molecular (PM) de 11.200, un índice de polidispersión de 1,3, un grado de desulfatación de 1,6 (expresado como una proporción molar SO₃:COO⁻), un porcentaje de ácidos urónicos modificados comparados con los ácidos urónicos totales de aproximadamente 30% y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 50 %.
- 25 - heparina de bajo peso molecular parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada con un peso molecular de Mn= 4780, Pm= 10.000, un índice de polidispersión de 2,092, un porcentaje de ácidos urónicos modificados comparados con los ácidos urónicos totales de aproximadamente 30 % y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 50%.
- heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en
- 30 comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30% y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 27%.
- heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30% y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 39%.
- 35 - heparina parcialmente N-desulfatada y N-reacetilada, un porcentaje de ácidos urónicos modificados en comparación con ácidos urónicos totales de aproximadamente 30% y los residuos de glucosamina tienen un grado de N-acetilación del 64%.
- 3.- Uso de los compuestos de la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento que tiene actividad de inhibición de la heparanasa.
- 40 4.- Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho medicamento tiene actividad antiangiogénica.
- 5.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 3-4, en el que dicho medicamento es útil para el tratamiento de inflamaciones.
- 6.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que dicho medicamento es útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.
- 45 7.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que la enfermedad que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en tumores primarios, metástasis, retinopatías diabéticas, psoriasis, fibroplasia retrolenticular, reestenosis tras angioplastia, derivación coronaria, inflamación, artritis, enfermedades autoinmunitarias, rechazo del aloinjerto, enfermedades cardiovasculares, enfermedades fibroproliferativas, enfermedades provocadas por agregación plaquetaria anómala, enfermedades provocadas por proliferación del

músculo liso, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis aguda, hipertensión pulmonar neonatal, asma, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar adulta, hipertensión vascular renal, retinopatías proliferativas, encefalopatía autoinmunitaria experimental, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn.

- 5 8.- Composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto de la reivindicación 1 o 2 como un ingrediente activo en mezcla con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

FIGURA 1

Espectro RMN de ^{13}C

