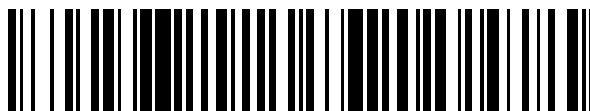


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 362**

51 Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2001** **E 10183832 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013** **EP 2343077**

54 Título: **Derivados de glicosaminoglicanos totalmente N-desulfatados como agentes inhibidores de la heparanasa, dotados con actividad antiangiogénica y desprovistos de efecto anticoagulante**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2013

73 Titular/es:

SIGMA-TAU RESEARCH SWITZERLAND S.A.
(100.0%)
Via alla Campagna 2a
6900 Lugano, CH

72 Inventor/es:

CASU, BENITO;
TORRI, GIANGIACOMO;
NAGGI, ANNAMARIA;
GIANNINI, GIUSEPPE;
PISANO, CLAUDIO y
PENCO, SERGIO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 431 362 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 glicosaminoglicanos totalmente N-desulfatados como agentes inhibidores de la heparanasa, dotados con actividad antiangiogénica y desprovistos de efecto anticoagulante

- 5 La invención descrita en la presente memoria se refiere a heparinas totalmente-N-desulfatadas y N-Meacetiladas, 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 metastáticas, y para cualquier indicación terapéutica que obtenga un beneficio de la inhibición de la heparanasa, y a composiciones terapéuticas que las contienen.

Estado de la técnica

- 10 Los estudios realizados en la Tumor Biological Research Unit del 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 que se enlazan a la heparina, el sulfato de heparano y las enzimas que degradan al sulfato de heparano (heparanasa) en la angiogénesis y la metástasis tumoral. Estos estudios han sido aplicados a la exploración y a la identificación de
15 derivados de la heparina y moléculas miméticas de la heparina/sulfato de heparano con potente actividad inhibidora de la heparanasa (Nature 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 de polisacárido de los proteoglicanos tipo sulfato de heparano en la superficie celular y en la matriz extracelular.

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

La heparanasa puede así facilitar no solo la invasión de células tumorales y la metástasis sino también la angiogénesis tumoral, ambas etapas críticas en la progresión de los tumores.

- 25 Los agentes inhibidores específicos de la enzima heparanasa impiden la liberación y la activación de los factores de crecimiento almacenados por el sulfato de heparano así como la ruptura de la ECM, y son considerados como un enfoque muy prometedor para desarrollar fármacos anticancerígenos.

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

- 30 Para una discusión sobre la angiogénesis puede hacerse referencia al documento WO 01/55221, a nombre del presente solicitante.

- Otra importante implicación de la heparanasa es tanto la inflamación como la autoinmunidad. De hecho, la actividad de la heparanasa también se correlaciona con la capacidad de las células activadas del sistema inmunológico para dejar la circulación y provocar respuestas tanto inflamatorias como autoinmunes. La interacción de las plaquetas, granulocitos, linfocitos T y B, macrófagos y mastocitos con la ECM subendotelial está asociada con la degradación del sulfato de heparano mediante la actividad de la heparanasa. La enzima es liberada desde compartimentos intracelulares (es decir, lisosomas, gránulos específicos) en respuesta a varias señales de activación, lo que sugiere su implicación y presencia regulada en sitios inflamatorios y en lesiones autoinmunes. El tratamiento de animales experimentales con agentes inhibidores de la heparanasa (es decir, especies no anticoagulantes de heparina de bajo peso molecular - LMWH) redujo notablemente la incidencia de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), artritis adyuvante y rechazo a los injertos en animales experimentales, lo que indica que pueden aplicarse
40 inhibidores de la heparanasa para inhibir enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Heparina

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

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

- 50 La actividad antitumoral y antimetastásica de la heparina y sus derivados es debida a su capacidad de inhibir la heparanasa, de bloquear los factores de crecimiento y de regular la angiogénesis.

Sulfatos de heparano (HS)

Los sulfatos de heparano (HS) son ligandos de proteínas ubicuas. Las proteínas se enlazan a las cadenas de HS

para una variedad de acciones desde la simple inmovilización o la protección contra la acción de degradación proteolítica a modulaciones específicas de actividades biológicas, tales como la angiogénesis.

El esqueleto carbohidrato, tanto en la heparina como en los sulfatos de heparano (HS), consiste en una alternancia de D-glucosamina (GlcN) y ácidos hexurónicos (G1cA o IdoA).

- 5 En la heparina, los residuos GlcN están principalmente N-sulfatados, mientras que en los HS están tanto N-sulfatados como N-acetilados, con una pequeña cantidad de grupos NH₂ sin sustituir.

En promedio, los HS están también menos O-sulfatados que la heparina.

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

- 10 Se han hecho modificaciones químicas a la heparina para reducir su capacidad anticoagulante, preservando al mismo tiempo sus propiedades antitumorales.

La apertura de una unidad de ácido glucurónico en el sitio antitrombina reduce la afinidad de la heparina por la antitrombina: de esta forma, pueden usarse heparinas con efectos anticoagulantes aminorados, pero que aún retienen propiedades antiangiogénicas.

15 Heparanasas

Las heparanasas son enzimas que pertenecen a una familia de endoglicosidasas (una endo-β-D-glucuronidasa) que hidrolizan los enlaces glicosídicos internos de las cadenas de sulfatos de heparano (HS) y heparina.

- 20 Estas endoglicosidasas están implicadas en la proliferación de células tumorales, en metástasis y en la neovascularización de tumores. Estas enzimas son dianas biológicas para la actividad antiangiogénica. En la bibliografía científica hay un gran número de estudios de correlación estructura/actividad (véase, por ejemplo, Lapierre F. et al., Glycobiology, vol. 6, (3), 355-366, 1996). Aunque muchos aspectos tienen aún que ser clarificados, se ha informado de estudios con respecto a la inhibición de las heparanasas por la heparina y sus derivados, usando ensayos específicos que han llevado a que emerjan consideraciones de tipo estructural, las cuales pueden servir como guías para obtener nuevos, más selectivos, derivados.

- 25 En el trabajo anteriormente mencionado de Lapierre et al., se describen derivados de la heparina que se obtienen por 2-O desulfatación o por "escisión a glicol" (oxidación con peryodato y subsiguiente reducción con borohidruro de sodio). Estos derivados, definidos en la presente memoria como "heparina 2-O-desulfatada" y "RO-heparina", respectivamente, han mantenido parcialmente la actividad antiangiogénica de la heparina como se evaluó por medio del ensayo CAM en presencia de corticosteroides (ibid. página 360).

- 30 Se ha informado que los N-acil derivados de la heparina, que son moléculas miméticas de sulfato de heparano más próximas que la heparina, inhiben a la heparanasa sólo algo menos que los N-sulfato derivados. (Irimira T., Biochemistry 1986, 25, 5322-5328; Ishai-Michaeli R., et al, Biochemistry 1992, 31, 2080-2088).

Heparinas y FGF

- 25 Los FGFs regulan múltiples procesos biológicos tales como el crecimiento y la diferenciación celular, pero también funciones implicadas en procesos patológicos tales como la angiogénesis tumoral.

Los FGFs son factores de crecimiento (una familia de más que 10 polipéptidos, de los cuales los FGFs ácido (FGF-1) y básico (FGF-2) son los que han sido más estudiados, los cuales requieren un cofactor polisacárido, heparina o HS, para enlazarse al receptor de FGF (FGFR) y activarlo.

- 30 Aunque el mecanismo preciso mediante el cual la heparina y los HS activan a los FGFs es desconocido, sin embargo se sabe que la heparina/FGF/FGFR forman un complejo "trimolecular" o "ternario".

Un mecanismo postulado es que la heparina y los HS inducen la llamada dimerización en sándwich de FGF, y el último, así dimerizado, forma un complejo estable con FGFR.

Actividad antimetastásica de derivados de la heparina

- 45 La capacidad de un tumor primario para generar células metastásicas es quizás el principal problema con el que se encara la terapia anticancerígena.

Los derivados de la heparina con una capacidad sustancial de bloquear a 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 encontrado que la actividad antimetastásica en modelos animales se correlaciona con la capacidad para inhibir a la heparanasa de la heparina y de los derivados de la heparina (Bitan M. et al, *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 en la misma). Estudios sobre la dependencia del peso molecular de la actividad antimetastásica indicaron que
- 5 también las heparinas de muy bajo MW (Sciumbata, T., et al, *Invasion Metastasis* 1996, 16, 132-143) y oligosacáridos polisulfatos (Parish, C.R., et al, *Cancer Res.* 1999, 59, 3433-3441) retienen una actividad antimetastásica significativa. Aunque en general la eliminación de grupos N-sulfato (N-desulfatación) disminuye el potencial antimetastático de las heparinas, esta actividad es parcialmente restaurada tras la N-acilación (N-acetilación, N-hexanoilación (Bitan M., 1995), y N-succinilación (Sciumbata, T., 1996) de los grupos NH₂ libres
- 10 resultantes. Se encontró que la actividad antimetastásica de las heparinas se correlacionaba inversamente con sus grados de O-sulfatación (Bitan M., 1995). Sin embargo, la 2-O-desulfatación selectiva de residuos de ácido idurónico no implicaba una fuerte reducción de la actividad antimetastásica de la heparina (Lapierre, F., *Glycobiology* 1996, 6, 355-366).
- En general, tanto la actividad inhibidora de la heparanasa como la actividad antimetastásica de las heparinas y
- 15 otros polisacáridos sulfatados disminuyen con la disminución del peso molecular y del grado de sulfatación (Bitan M., 1995; Parish, C.R., 1999). Sin embargo, estas actividades también dependen de la cadena principal de carbohidrato del polisacárido (tipo de residuos y posición de uniones glicosídicas) (Parish, C. R., 1999). Puesto que la estructura tridimensional del sitio activo de la heparanasa no es aún conocida, es difícil de predecir qué cadenas principales de polisacáridos y patrones de sulfatación inhiben lo más efectivamente a la enzima.
- 20 Sobre la base del conocimiento presente, los requisitos estructurales de moléculas semejantes a la heparina que favorecen la acción inhibidora de la angiogénesis pueden agruparse en dos categorías basadas en la diana que se pretende bloquear:
- a) Inhibición de la heparanasa: aunque esta enzima reconoce y escinde secuencias de la heparina y los HS de al menos ocho unidades de monosacárido que contienen N-acil-glucosamina-ácido glucurónico (o
- 25 residuos de glucosamina N-sulfatada, véase, por ejemplo, D. Sandback-Pikas et al. *J. Biol. Chem.*, 273, 18777-18780 (1998) y referencias citadas), su inhibición puede conseguirse eficientemente mediante fragmentos de heparina más largos que tetradecasacárido (Bitan M., 1995) o mediante oligosacáridos más cortos extensamente sulfatados, tales como maltohexaosa sulfato (MHS) y fosfomán-nopentaosa sulfato (PI-88) (Parish, C. R., 1999). Sin embargo, ambos fragmentos de heparina largos y los oligosacáridos muy sulfatados son anticoagulantes, una propiedad que debe evitarse en los fármacos antimetastáticos
- 30 potenciales;
- b) Inhibición de factores de crecimiento angiogénicos (tipo fibroblastos: FGF-1 y FGF-2; tipo endotelio vascular: VEGF; tipo permeabilidad vascular: VPF): para este fin los compuestos semejantes a la heparina tienen preferiblemente secuencias de al menos cinco unidades de monosacárido de longitud, que contienen
- 35 ácido idurónico 2-sulfatado y glucosamina N,6-sulfatada (véase, por ejemplo, M. Maccarana et al. *J. Biol. Chem.* 268, 23989-23905 (1993)).
- La bibliografía describe pequeños péptidos (5-13 aminoácidos) con actividad antiangiogénica (Patente de EE.UU. 5.399.667 de la Universidad de Washington) que actúan enlazándose a un receptor de la trombospondina, o péptidos más largos (50 aminoácidos aprox.).
- 40 Se conocen factores de plaquetas modificados - (documento EP 0 589 719, Lilly), capaces de inhibir la proliferación endotelial, con IC₅₀=7 nM.
- También se han descrito ampliamente fragmentos de oligosacáridos con actividad antiangiogénica: de hecho, se ha encontrado que variando la secuencia de carbohidratos puede aumentarse la selectividad de la interacción.
- Además, la heparina puede usarse un vehículo para las sustancias que en sí mismas son angiogénicas, tales como
- 45 algunos esteroides, explotando la afinidad de la heparina por las células endoteliales vasculares; véase, por ejemplo, el documento WO 93/18793 de la Universidad de Texas y el Imperial Cancer Research Technology, en el que se reivindica que las heparinas con moléculas de enlace ácidas lábiles, tales como la hidrazina del ácido adípico, se enlazan al cortisol. El efecto antiangiogénico de las moléculas conjugadas es mayor que el de las moléculas no conjugadas, incluso cuando se administran simultáneamente.
- 50 En *Biochim. Biophys. Acta* (1996), 1310, 86-96, se describen heparinas enlazadas a esteroides (por ej. cortisol) con un grupo hidrazona en C-20 que presentan mayor actividad antiangiogénica que las dos moléculas no conjugadas.
- El documento EP 0 246 654, de Daiichi Sc., describe polisacáridos sulfatados con actividad antiangiogénica con estudios en Fase II. El documento EP 0 394 971, de Pharmacia & Upjohn - Harvard Coll., describe fragmentos de hexa-sacáridos-heparina con bajo grado de sulfatación, capaces de inhibir el crecimiento de células endoteliales y
- 55 la angiogénesis estimuladas por FGF-1. El documento EP 0 618 234, de Alfa Wasserman, describe un método para preparar glicosaminoglicanos semisintéticos con una estructura de heparina o hepatán que portan un grupo nucleófilo. El documento WO 95/05182, de Glycomed, describe varios oligosacáridos sulfatados con actividad anticoagulante, antiangiogénica y antiinflamatoria. El documento US 5.808.021, de Glycomed, describe un método

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 método prevé la desulfatación llevada a cabo en presencia de un catión de un metal bivalente, ejemplificado por calcio o cobre, seguida por liofilización del producto obtenido. Las heparinas desulfatadas tienen actividad antiangiogénica. El documento EP 0 251 134, Yeda Res & Dev Co Ltd et al, describe el uso de dosificaciones subcoagulantes de heparina o de sus derivados para prevenir el rechazo de aloinjertos y tratar enfermedades autoinmunes. La actividad de la heparina es dada por la inhibición de la heparanasa. El documento WO 88/05301, Univ. Australian Nat., describe composiciones antimetastásicas y/o antiinflamatorias que contienen un polisacárido sulfatado, el cual es un agente inhibidor de la heparanasa. Se proporcionan heparina, fucoidano, sulfato de pentosano, sulfato de dextrano. El documento WO 92/01003, Univ. Texas System, describe el uso de un derivado de heparina, el cual está desprovisto de actividad anticoagulante, como agente inhibidor de la heparanasa. Estos derivados tienen grupos sulfamino u O-sulfato, peso molecular de 1000-15000 y cada unidad monómera terminal es una unidad monómera repetitiva con un átomo de O terminal enlazada a un grupo bloqueante. Los documentos WO 94/14851 y WO 96/06867, Glycomed, proporcionan heparina mucosal 2-O, 3-O-desulfatada, o fragmentos de la misma, que están al menos 96,7% desulfatada en la posición 2-O y al menos 75% desulfatada en la posición 3-O, útil como agente inhibidor no anticoagulante de las heparanasas. Los documentos WO 95/09637 y WO 96/09828, Glycomed, describen compuestos tipo maltooligosacáridos muy sulfatados con propiedades semejantes a la heparina. El documento WO 95/30424, Glycomed, proporciona heparina 6-O-desulfatada o fragmentos de la misma con actividad inhibidora de la heparanasa. El documento WO 96/33726, Univ. Australian Nat., describe oligosacáridos sulfatados como moléculas miméticas del heparano que tienen actividad inhibidora de la heparanasa. El documento WO 01/35967, Knoll AG, proporciona un método para tratar la insuficiencia cardíaca y afecciones relacionadas administrando un agente 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 parcialmente N,O-desulfatada y N-resulfatada o está O-acetilada.

El objetivo de la invención descrita en la presente memoria es encontrar estructuras óptimas de glicosaminoglicanos para generar actividad antiangiogénica basada en mecanismos de inhibición de la heparanasa y/o inhibición de factores de crecimiento FGF. Un objetivo adicional de la invención descrita en la presente memoria es proporcionar un medicamento con actividad antiangiogénica el cual 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, a nombre del solicitante, describe glicosaminoglicanos, particularmente una heparina 2-O-desulfatada, con un grado de desulfatación no mayor que 60% de las unidades urónicas totales. Estos derivados están dotados de actividad antiangiogénica y están desprovistos de actividad anticoagulante. Dichos compuestos ejercen su actividad antiangiogénica basada en la inhibición de FGF. No fue prevista ninguna actividad para la inhibición de la 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 subsiguiente opcional total o parcial. La enseñanza general de dicha referencia no describe explícitamente las etapas de N-desulfatación y de acetilación subsiguiente opcional total o parcial.

En el documento WO 01/55221, la N-desulfatación y la N-acetilación se llevan a cabo después de la 2-O-desulfatación de las unidades idurónicas. En la fórmula I descrita en esta referencia, la unidad "U" es una de las cuatro opciones.

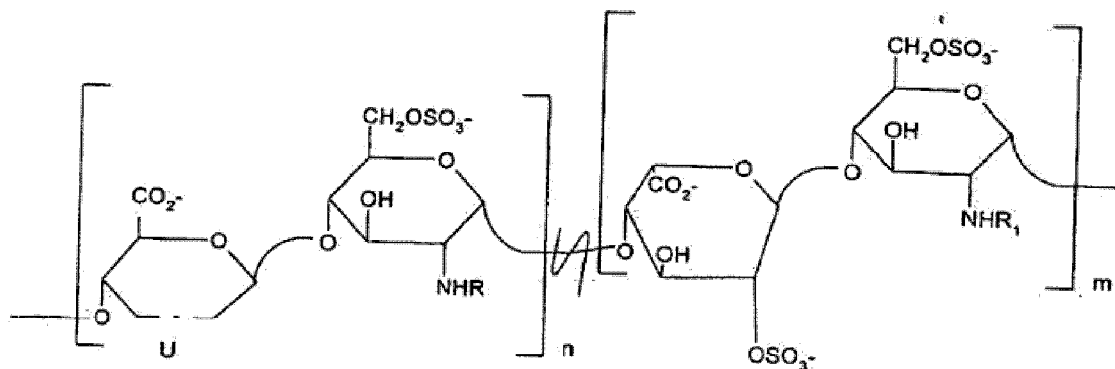
Lapierre F. et al., Glycobiology, Oxford University Press, EE.UU., vol. 6, n. 3, 1 Enero 1996, páginas 355-366, tratan con modificaciones químicas de la heparina que disminuyen su capacidad anticoagulante pero conservan sus propiedades antitumorales e inhibidoras de la heparanasa, mostrando que los productos R-OH tipo escisión a glicol poseen una alta actividad anti-heparanasa pero no están desprovistos del efecto hemorrágico. Por otra parte, Lapierre F. et al., muestran que reemplazando en las heparinas grupos N-sulfato por grupos N-acetilo se reduce su actividad anti-heparanasa.

Resumen de la invención

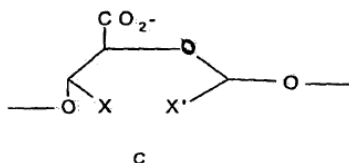
La desulfatación llevada a cabo en las condiciones descritas en la presente invención también produce la formación de unidades idurónicas con un anillo oxiránico en la posición 2,3. La apertura del anillo oxiránico en las condiciones descritas en la presente invención da lugar a unidades L-idurónicas o L-galacturónicas.

Es un objeto de la invención descrita en la presente memoria según la presente invención, dicho glicosaminoglicano es una heparina modificada, que está totalmente N-desulfatada y subsiguientemente totalmente N-acetilada.

La invención descrita en la presente memoria se refiere al compuesto de fórmula (I)



en la que el anillo U puede tener el siguiente significado:



5 X y X', son el grupo -CH₂-D, en el que D es hidroxilo;

R y R₁, residuo acetilo,

n y m, que pueden ser los mismos o diferentes, pueden variar de 1 a 40; la suma de n+m varía de 6 a 40; la relación m:n varía de 10:2 a 1:1.

10 El símbolo indica que las unidades marcadas con m y n están estadísticamente distribuidas a lo largo de la cadena de polisacárido y no son necesariamente secuenciales.

Los compuestos que son la materia objeto de la invención descrita en la presente memoria se caracterizan por un alto poder de inhibir a la heparanasa con interesantes propiedades antiangiogénicas, y son por lo tanto útiles como ingredientes activos para la preparación de medicamentos para el tratamiento de patologías que se benefician de la inhibición de la heparanasa, patologías basadas en una angiogénesis anormal, y particularmente para el

15 tratamiento de las metástasis.

Los compuestos según la presente invención también inhiben a los FGFs.

Ventajosamente, los compuestos según la presente invención muestran propiedades anticoagulantes menores, si no inexistentes, evitando o reduciendo así los efectos secundarios típicos de las heparinas. Una ventaja adicional proviene del hecho de que los compuestos según la invención pueden caracterizarse con técnicas analíticas instrumentales, tales como espectroscopia de RMN, permitiendo así el control del proceso, lo cual es

20 absolutamente deseable desde el punto de vista industrial.

También en el caso de heparinas modificadas, el peso molecular (MW) tiene una función muy importante cuando se fabrican agentes inhibidores de la angiogénesis. De hecho, es bien conocido que una reducción del peso molecular (MW) hasta valores correspondientes a unidades de penta-sacáridos no conduce a una pérdida de la actividad antiangiogénica. Por otra parte, se ha establecido que, mientras que más allá de una cierta longitud las cadenas de heparina favorecen más que inhiben la activación de FGF, son incluso mejores agentes inhibidores de la heparanasa que las cadenas más cortas. Sin embargo, la longitud óptima de cadena para la inhibición de la heparanasa depende de la estructura del inhibidor (cadena principal de carbohidrato, uniones posicionales, patrón de sulfatación) y debe establecerse para cualquier nuevo tipo de agentes inhibidores potenciales.

30 Descripción detallada de la invención

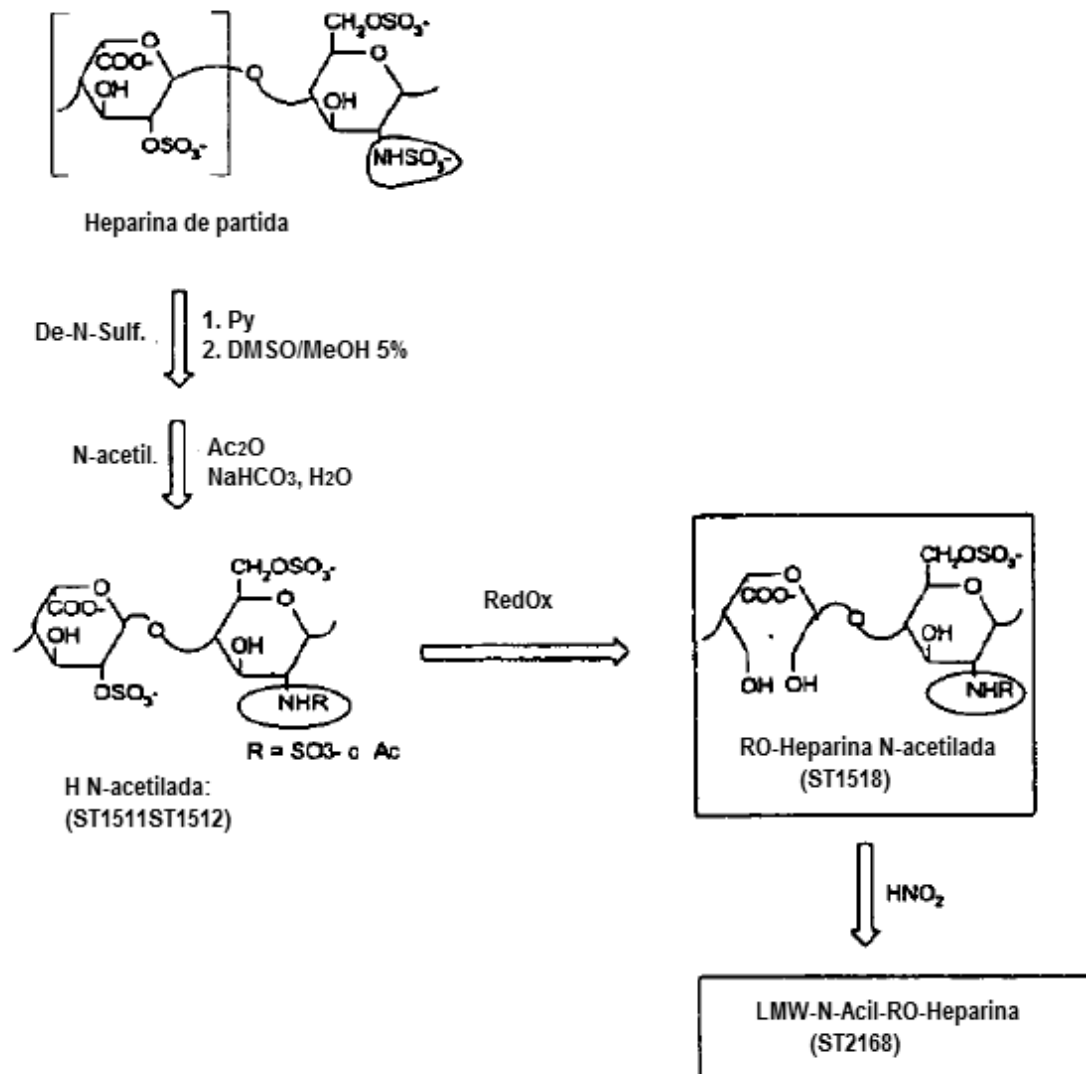
Los compuestos según la presente invención que contienen residuos de glicosamina totalmente N-desulfatados y subsiguientemente totalmente acetilados están específicamente descritos y reivindicados en la presente memoria como compuestos nuevos.

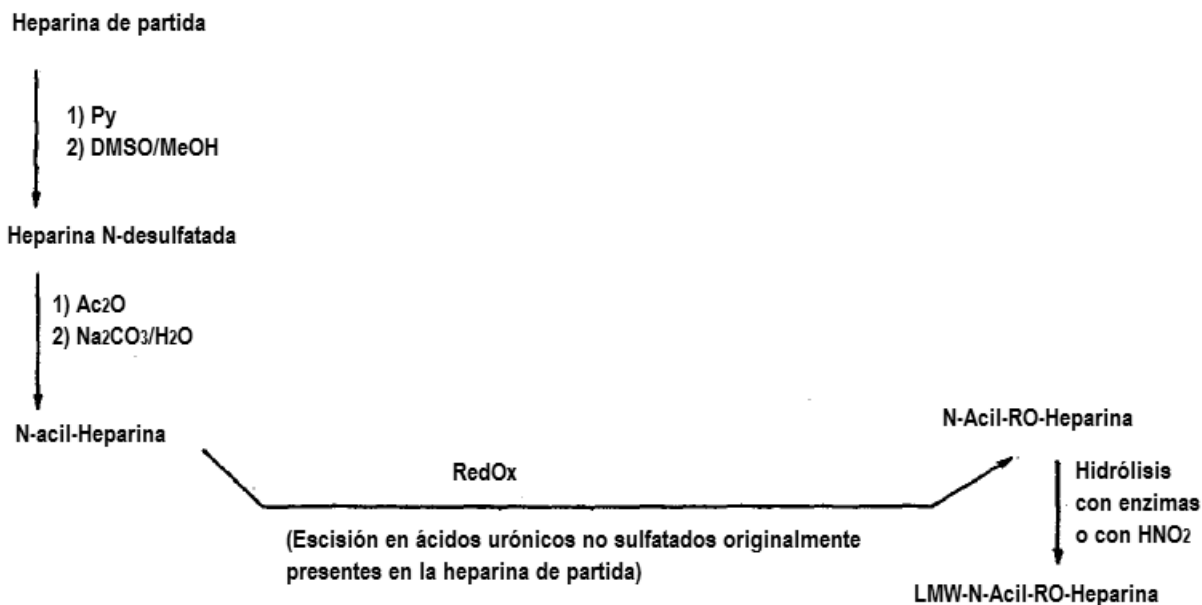
Las heparinas totalmente N-desulfatadas y totalmente N-acetiladas según la presente invención pueden prepararse sometiendo las heparinas al procedimiento que consiste en las siguientes etapas:

- 5 a) N-desulfatación mediante hidrólisis solvolítica de residuos de sulfamino en DMSO:H₂O 95:5 v:v a temperatura ambiente durante un tiempo que varía de 0,5 a 8 h, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 2 h, para dar la eliminación total o parcial de grupos sulfato en la posición 2 de los residuos de glucosamina;
- b) N-acetilación de dichos grupos totalmente desulfatados en la posición 2 de los residuos de glucosamina mediante tratamiento en una disolución acuosa alcalina (pH 8-9) con un agente acetilante, tal como anhídridos acético, para dar grupos totalmente acetilados en la posición 2 de los residuos de glucosamina;
- 10 c) oxidación de los dioles con peryodato de sodio, para dar la apertura del anillo glicósido y la formación de dos grupos aldehído por residuo modificado; y,
- d) reducción de dichos grupos aldehído a alcoholes primarios;
- e) hidrólisis ácida opcional de compuestos obtenidos en la etapa d) para obtener oligosacáridos correspondientes a las secuencias regulares, preferiblemente por desaminación con ácido nitroso. Esta reacción, la cual se aplica usualmente para obtener heparina de LMW escindiendo la unión entre los residuos de N-sulfato glucosamina y el siguiente ácido urónico, conduce a un compuesto de LMW que tiene en el extremo no reducido un residuo que consiste en un ácido urónico y en el extremo reducido un residuo de anhidro manosa, este último puede además modificarse a anhidromanitol por reducción con borohidruro. Los compuestos de LMW obtenidos contienen al menos un residuo de ácido idurónico con escisión a glicol; o
- 15 alternativamente
- 20 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, preferiblemente tetra- u octa-sacáridos, con el residuo terminal no reducido que consiste en ácido idurónico insaturado, el residuo reducido que consiste en una N-sulfoglucosamina y que al menos contiene un residuo de ácido idurónico abierto.
- 25

(Continúa en página siguiente)

El procedimiento según la presente invención también se ilustra mediante los siguientes esquemas:





Los pesos moleculares se determinan por HPLC-GPC (cromatografía de líquidos de alta resolución – cromatografía de exclusión molecular). El grado de desulfatación se determinó por conductimetría y el porcentaje de ácidos urónicos modificados por ¹³C-RMN.

5 MW es el peso molecular, y D es el índice de polidispersidad expresado como MW/Mn.

Según la invención descrita en la presente memoria, los productos de partida son heparinas que se encuentran en la naturaleza. También es posible usar heparinas químicamente modificadas con un contenido en porcentaje de N,6 disulfato que varía de 0 a 100%. Partiendo de los productos con un contenido diferente de glucosamina 6-O-sulfatada, es posible modular la longitud de las secuencias regulares entre un ácido idurónico abierto y otro. Las heparinas según la invención que presentan la apertura del anillo glicósido son convencionalmente llamadas RO
10 derivados por los expertos en el campo, queriendo decir mediante este hecho que el anillo glicósido ha sido abierto por medio de una acción de oxidación, seguida por una reducción (Reducción-Oxidación - RO). Esta apertura del anillo glicósido es también convencionalmente llamada "escisión a glicol", debido a la formación de los dos hidroxilo primarios presentes en el anillo abierto. Los compuestos referidos en la presente memoria también se denominarán
15 derivados tipo "RO" o tipo "escisión a glicol".

Las heparinas de la invención también pueden usarse como vehículos para otros tipos de fármacos, por medio del enlace adecuado con la porción de heparina que es capaz de proporcionar un enlace estable en condiciones normales de fabricación y almacenamiento de un fármaco formulado, los cuales, sin embargo, liberan el fármaco transportado en el cuerpo, preferiblemente en la vecindad del órgano diana. Ejemplos de fármacos que pueden ser
20 transportados son fármacos antiinflamatorios esteroides y no esteroides, corticoesteroides, y otros fármacos con una acción antimetastásica, en cuyo caso habrá un aumento ventajoso del efecto antimetastásico como resultado de la suma de las actividades intrínsecas separadas de los compuestos según la invención y el agente antimetastásico enlazado a los mismos, con las ventajas relacionadas de una mayor selectividad por la diana y una menor toxicidad sistémica. Ejemplos de estos fármacos son los inhibidores de las metaloproteinasas. Otros
25 fármacos que pueden ser útilmente transportados son los que actúan a nivel endotelial.

Los compuestos según la invención que se derivan de la heparina se preparan partiendo de heparina como tal por medio de N-desulfatación seguida N-acetilación usando técnicas conocidas por los expertos técnicos en el campo. Por ejemplo, la N-desulfatación se lleva a cabo por solvólisis en una disolución de DMSO:H₂O 95:5 v:v a temperatura ambiente durante un tiempo que varía de 0,5 a 8 h seguida por N-acilación en condiciones alcalinas con, por
30 ejemplo, anhídrido acético.

Las heparinas de la invención pueden además ser degradadas con agentes ácidos en condiciones adecuadas de pH, por ej. a pH 4, para dar una mezcla de oligosacáridos que mantienen las propiedades antiangiogénicas.

Los objetos de la invención descritos en la presente memoria son composiciones terapéuticas que contienen como su ingrediente activo al menos una heparina modificada descrita en la presente memoria. El ingrediente activo
35 según la presente invención estará en una mezcla con vehículos y/o excipientes adecuados normalmente usados en la tecnología farmacéutica, tales como, por ejemplo, los descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", última edición. Las composiciones según la presente invención contendrán una cantidad

terapéuticamente efectiva del ingrediente activo. Las dosis serán determinadas por el experto en el campo, por ej. el médico clínico o el médico de familia según el tipo de enfermedad a tratar y el estado del paciente, o concomitantemente con la administración de otros ingredientes activos. A modo de ejemplo, pueden indicarse dosis de 0,1 a 100 mg/kg.

- 5 Ejemplos de composiciones farmacéuticas son las que pueden administrarse oral o parenteralmente, intravenosa, intramuscular, subcutánea o transdérmicamente o en la forma de pulverizaciones nasales u orales. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el fin son comprimidos, cápsulas duras o blandas, polvos, disoluciones, suspensiones, jarabes, y formas sólidas para preparaciones líquidas improvisadas. Por ejemplo, son composiciones para la administración parenteral todas las formas inyectables por vía intramuscular, intravenosa y subcutánea así como las disoluciones, suspensiones y emulsiones. También deben mencionarse las formulaciones de liposomas. Los comprimidos también incluyen formas para la liberación controlada del ingrediente activo como formas de administración oral, comprimidos revestidos con capas adecuadas, polvos microencapsulados, complejos con ciclodextrinas, formas tipo depósito, por ejemplo, formas subcutáneas, tales como inyecciones de depósito o implantes.
- 10
- 15 Los compuestos según la invención descritos en la presente memoria poseen actividad anti-heparanasa y antiangiogénica. Esto los hace adecuados para la preparación de medicamentos útiles para el tratamiento de sujetos, en general mamíferos, y particularmente sujetos humanos, que padecen de angiogénesis alterada o sujetos que necesitan un tratamiento que inhiba 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, restenosis después de una angioplastia, baipás coronario, inflamación, artritis, enfermedades autoinmunes, rechazo de aloinjertos, enfermedades cardiovasculares, enfermedad fibro-proliferativa, enfermedades provocadas por la agregación anormal de las plaquetas, enfermedades provocadas por la proliferación del músculo liso, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis aguda, hipertensión pulmonar neonatal, asma, fallo cardíaco congestivo, hipertensión pulmonar del adulto, hipertensión renovascular, retinopatías proliferativas, encefalomiелitis autoinmune experimental, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de la insulina, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn.
- 20
- 25

Ventajosamente, los compuestos según la presente invención están sustancialmente desprovistos de los efectos laterales típicos de la heparina. En particular, los compuestos según la invención están sustancialmente desprovistos de actividad anticoagulante. Por sustancialmente desprovistos de tal actividad, el experto en el campo quiere decir ninguna o sólo una actividad despreciable desde el punto de vista del uso clínico.

30

La actividad inhibidora de la heparanasa se determina según un método establecido por el grupo de Vlodavsky (Bitan M. et al, 1995). El método está basado en la evaluación de la extensión de la fragmentación provocada por la heparanasa de las cadenas de sulfato de heparano de proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG). Como fuente de HSPG se usa más comúnmente matriz extracelular (ECM) marcada con sulfato. La ECM marcada con sulfato es incubada con heparanasa recombinante a pH 6,2 en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto de ensayo. Para evaluar la ocurrencia de la degradación de los proteoglicanos, el medio de incubación se recoge y filtra por un gel mediante columnas de Sepharose 6B (0,9 x 30 cm). Se eluyen fracciones (0,2 mL) con PBS a un caudal de 5 mL/h y se recuenta su radioactividad. El volumen excluido (V_o) se marca mediante azul de dextrano y el volumen total incluido (V_t) por rojo de fenol. Los fragmentos de degradación de cadenas laterales de HS se eluyen por Sepharose 6B a $0,5 < K_{av} < 0,8$ (pico II). En las condiciones experimentales dadas, los buenos agentes inhibidores de la heparanasa inhiben la fragmentación del HS en concentraciones de 10 mg/mL o menos.

35

40

Los resultados de los ejemplos de referencia se muestran en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

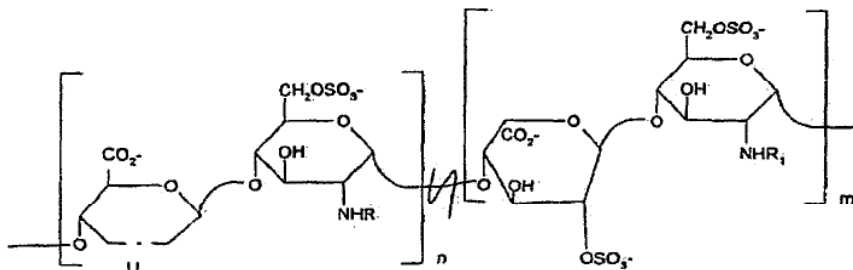
Inhibición de la heparanasa en dosis que varían de 25 µg/mL a 5 µg/mL				
		Inhibición		
	Dosis	25 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL
	Heparina	100%	n.d.	> 100%
ST1516*	Heparina 50% RO	100%	n.d.	> 85%
ST1514*	Heparina ~50% RO	100%	100%	> 85%
ST1515*	Heparina 27,5% RO	100%	100%	100%
ST1518**	50% NAc heparina 30% RO	100%	100%	> 85%
*Compuesto de referencia descrito en el documento WO01/55221				
**Compuesto de referencia descrito en el documento EP 1427427				

Vale la pena advertir que ST1518 tiene una alta actividad de inhibición incluso a la concentración de 1 mg/mL.

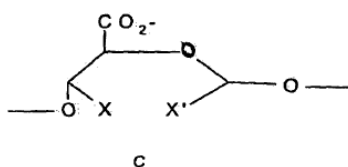
- 5 Los compuestos según la presente invención, y en particular uno nuevo, se ensayaron respecto a su actividad con respecto a los factores de crecimiento FGF, con el mismo modelo experimental que se describió en el documento WO 01/55221 y mostraron una actividad comparable con los descritos en la referencia citada.

REIVINDICACIONES

1. Heparina N-reacetilada totalmente N-desulfatada, de fórmula (1)



en la que el anillo U tiene el siguiente significado



R y R₁ son un residuo acetilo;

X y X', son el grupo -CH₂-D, en el que D es hidroxilo;

n y m, que pueden ser los mismos o diferentes, pueden variar de 1 a 40; la suma de n+m varía de 6 a 40; la relación m:n varía de 10:2 a 1:1, el símbolo indica que las unidades marcadas con m y n están estadísticamente distribuidas a lo largo de la cadena de polisacárido y no son necesariamente secuenciales.

2. Procedimiento para la preparación de los compuestos según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

a) N-desulfatación mediante hidrólisis solvolítica de residuos de sulfamino en DMSO:H₂O 95:5 v:v a temperatura ambiente durante un tiempo que varía de 0,5 a 8 h, para dar la eliminación total de grupos sulfato en la posición 2 de los residuos de glucosamina;

b) N-acetilación de dichos grupos totalmente desulfatados en la posición 2 de los residuos de glucosamina mediante tratamiento en una disolución acuosa alcalina (pH 8-9) con un agente acilante, para dar grupos totalmente acilados en la posición 2 de los residuos de glucosamina;

c) oxidación de los dioles con peryodato de sodio, para dar la apertura del anillo glicósido y la formación de dos grupos aldehído por residuo modificado; y,

d) reducción de dichos grupos aldehído a alcoholes primarios;

e) hidrólisis ácida opcional de los compuestos obtenidos en la etapa d) para obtener oligosacáridos correspondientes a las secuencias regulares; o alternativamente

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, preferiblemente tetra- u octa-sacáridos, consistiendo el residuo terminal no reducido en ácido idurónico insaturado, el residuo reducido en una N-sulfoglucosamina y conteniendo al menos un residuo de ácido idurónico abierto.

3. Uso de los compuestos según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento que tiene actividad inhibidora de la heparanasa.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento tiene actividad antiangiogénica.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que dicho medicamento es útil para el tratamiento de la inflamación.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que dicho medicamento es útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.
- 5 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que la enfermedad a tratar se selecciona del grupo que consiste en tumores primarios, metástasis, retinopatías diabéticas, psoriasis, fibroplasia retrolenticular, restenosis después de una angioplastia, baipás coronario, inflamación, artritis, enfermedades autoinmunes, rechazo de aloinjertos, enfermedades cardiovasculares, enfermedad fibro-proliferativa, enfermedades provocadas por la agregación anormal de las plaquetas, enfermedades provocadas por la proliferación del músculo liso, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis aguda, hipertensión pulmonar neonatal, asma, fallo cardíaco congestivo, hipertensión pulmonar del adulto, hipertensión renovascular, retinopatías proliferativas, esclerosis múltiple, encefalomielitis autoinmune experimental, diabetes dependiente de la insulina, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn.
- 10 8. Composición terapéutica, que al menos contiene un compuesto según la reivindicación 1 como un ingrediente activo en mezcla con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.