

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 976**

51 Int. Cl.:

C08B 37/04 (2006.01)

A61K 31/734 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2014 PCT/CN2014/081472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2014 E 14819337 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 3018147**

54 Título: **Polisacárido de ácido poligulónico sulfatado o sal farmacéutica del mismo, método de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

02.07.2013 CN 201310275323

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

05.07.2018

73 Titular/es:

**SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA
CHINESE ACADEMY OF SCIENCES (100.0%)
No. 555 Zuchongzhi Road Zhangjiang Pudong
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**DING, JIAN;
AI, JING;
CHEN, YI y
HUANG, XUN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 674 976 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

Polisacárido de ácido poligulónico sulfatado o sal farmacéutica del mismo, método de preparación y uso del mismo

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere al campo de la medicina, y en particular, a un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, método de preparación y uso del mismo en la preparación de inhibidores del crecimiento y/o metástasis tumoral.

10

Estado de la técnica

Los tumores representan una seria amenaza a la vida y salud humanas. Los tumores malignos se han convertido en la causa número uno de muerte en los residentes urbanos y la causa número dos en los residentes rurales y ocupan el primer puesto de mortalidad entre las distintas enfermedades. La metástasis tumoral es una señal de malignidad, y la metástasis y recurrencia de tumores malignos son las principales causas de fracaso del tratamiento. Por lo tanto, el descubrimiento de fármacos antitumorales capaces de inhibir el crecimiento y metástasis tumoral es el foco de atención actual.

15

20

De acuerdo con estudios recientes, los sacáridos no solo son una clase de constituciones estructurales importantes y fuentes de energía, sino que también tienen funciones biológicas importantes. Están implicados en el reconocimiento y señalización célula-célula y se consideran una clase de moléculas señal importantes además de los ácidos nucleicos en un organismo. Asimismo, debido a que son a menudo los factores clave para el reconocimiento de señales en las superficies celulares, las reacciones anticuerpo-antígeno, la transducción y detección de señales celulares, cada vez se despierta más interés por la investigación de polisacáridos activos que tienen actividades biológicas. Sin embargo, debido a la estructura compleja y a las dificultades en la separación y caracterización estructural de los sacáridos, hasta la fecha, solo los polisacáridos de *Coriolus versicolor*, los polisacáridos de poliporos, los polisacáridos de hongos, los polisacáridos de esquizofilano, los polisacáridos de *Poria cocos* y similares se usan para fines clínicos. Existe una necesidad en la técnica para obtener más tipos de polisacáridos con actividades biológicas. Los compuestos relacionados estructuralmente se divulgan en el documento CN 1544475.

25

30

Objeto de la invención

35

A pesar de las dificultades en resolución estructural y preparación de carbohidratos, y el problema de baja actividad de los azúcares naturales, sin mencionar el problema práctico de las incidencias graves del tumor y dificultades en el tratamiento, el presente inventor completó la presente invención basándose en estudios extensos e intensos. El presente inventor completó la presente invención reaccionando ácido poligulurónico con un agente sulfonante a la temperatura apropiada durante una duración apropiada para dar un derivado sulfatado de ácido oligogulurónico, y después añadir un agente reductor para la reducción, obteniendo así un sulfato de ácido poligulónico de acuerdo con la reivindicación 1 (en lo sucesivo denominado "PGAS").

40

45

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención tiene un efecto de inhibición significativo sobre el crecimiento y metástasis tumoral, y el mecanismo de acción está asociado con su capacidad de inhibir la actividad de la heparanasa, la actividad de la enzima C-Met, la angiogénesis, la polimerización de microtúbulos, los factores de despolimerización de actina y similares. La presente invención proporciona un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde las unidades de ácido L-gulurónico están conectadas a través de un enlace 1,4-glicosídico entre sí, con un grupo hidroxilo localizado en la posición 1 del extremo reductor y los anillos de azúcar completamente sulfatados en sus posiciones C-2.

50

55

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar el uso de un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de inhibidores del crecimiento y/o metástasis tumoral.

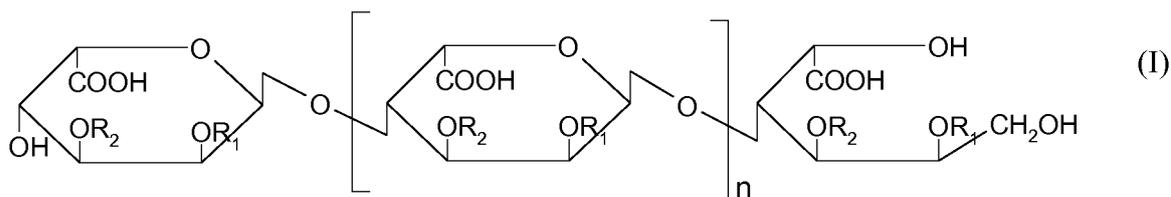
60

Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el tratamiento de tumores.

65

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con una estructura de la siguiente fórmula general (I):



5 en la fórmula general (I), n representa 0 o un número entero de 1-23, R₁ es SO₃H, R₂, independiente uno del otro, es H o SO₃H, siempre y cuando el grado de sulfatación calculado como el contenido de azufre del sulfato de ácido poligulónico sea 5 a 20 % en peso.

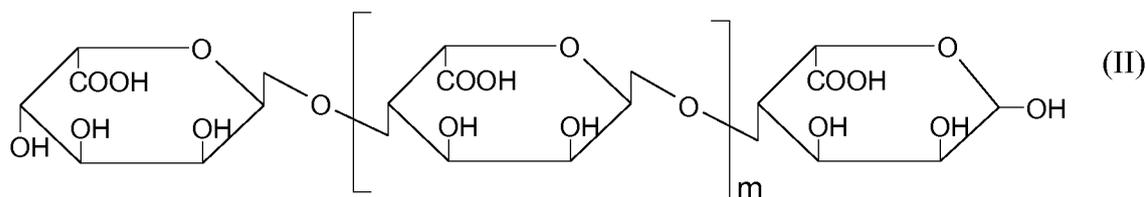
10 En el sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representado por la fórmula general (I) de la presente invención, el ácido poligulónico se forma a partir de ácidos L-gulurónicos por un enlace 1,4-glicosídico, con un grupo hidroxilo localizado en la posición 1 del extremo reductor, y anillos de azúcar completamente sulfatados en la posición C-2 del mismo y parcialmente sulfatados en la posición C-3 del mismo.

15 En la fórmula general (I) anterior, n es 0 o un número entero de 1-23, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23; preferentemente, n es un número entero de 2-13, más preferentemente, n es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y de la manera más preferente, n es 4, 5, 6, 7 u 8. Preferentemente, el contenido de azufre es 7-15 % en peso, más preferentemente 9-13 % en peso. En la presente invención, se obtienen mejores efectos biológicos usando tetrasacárido a dodecasacárido (particularmente hexasacárido a decasacárido) y/o cuando el contenido de azufre es 7-15 % en peso (particularmente 9-13 % en peso), probablemente porque estos polisacáridos se reconocen y aceptan más fácilmente por las células del cuerpo.

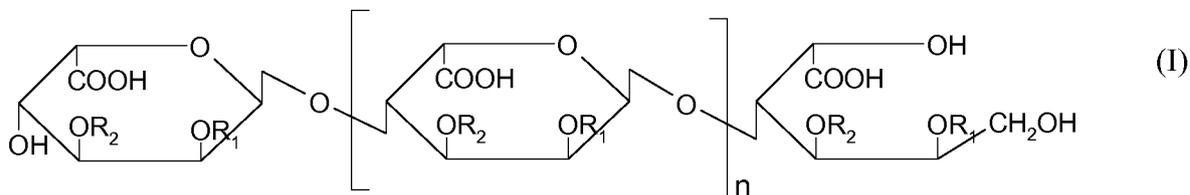
20 En la presente invención, las sales farmacéuticamente aceptables de los sulfatos de ácido poligulónico pueden ser, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio o magnesio de estos compuestos, siendo preferidas las sales de sodio. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar por métodos convencionales.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar el sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende:

30 reaccionar un ácido poligulurónico como se muestra en la siguiente fórmula estructural (II) con un reactivo sulfonante, seguido de reducción por medio de un agente reductor para dar el sulfato de ácido poligulónico como se muestra en la fórmula general (I),



en la fórmula (II), m representa 0 o un número entero de 1-48;



35 en la fórmula general (I), n, R₁ y R₂ son como se han definido anteriormente.

40 En la presente invención, preferentemente, el reactivo sulfonante puede ser ácido clorosulfónico; preferentemente, la temperatura de sulfonación puede ser 45-85 °C, más preferentemente 60-75 °C, y el tiempo de reacción puede ser 1,5-4,5 horas, más preferentemente 2-3,5 horas, de la manera más preferente 3 horas; preferentemente, el agente reductor es borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, reactivos de níquel-hidruro, agentes reductores basados en halógeno o similares.

45 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona el uso de un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de inhibidores del crecimiento y/o metástasis tumoral.

En la presente invención, el término "tumores" se refiere a cualquier forma de tumores incluyendo malignidades y,

por ejemplo, pueden ser cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, melanoma, cáncer cerebral y similares.

5 En la presente invención, preferentemente, el sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden usarse como inhibidores del crecimiento tumoral, inhibidores de la metástasis tumoral, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la heparanasa, inhibidores de la enzima C-Met, inhibidores de la polimerización de microtúbulos, inhibidores de la actividad del factor de despolimerización de actina y/o inhibidores de la agregación de actina.

10 De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención. Preferentemente, el componente activo en la composición farmacéutica consiste en uno o más sulfatos de ácido poligulónico o sales farmacéuticamente aceptables del mismo de la presente invención. En otra implementación, además del sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender uno o más fármacos antitumorales o fármacos adyuvantes antitumorales como componente activo.

15 En la presente invención, preferentemente, la composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser aquel usado habitualmente en la técnica.

20 En la presente invención, preferentemente, la composición farmacéutica se puede usar como inhibidores del crecimiento tumoral.

En la presente invención, preferentemente, la composición farmacéutica se puede usar como inhibidores de la metástasis tumoral.

25 Además, preferentemente, la composición farmacéutica se puede usar como inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la heparanasa, inhibidores de la enzima C-Met, inhibidores de la polimerización de microtúbulos, inhibidores de la actividad del factor de despolimerización de actina y/o inhibidores de la agregación de actina.

30 De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de tumores, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención a un sujeto que necesite tratamiento.

35 En la presente invención, la expresión "cantidad eficaz" se puede referir a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado deseado. Esta cantidad eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como, tipo de la enfermedad, síntomas de la enfermedad cuando se trata, estructura de un órgano objetivo específico que está siendo administrado, tamaño del sujeto o gravedad de la enfermedad o afección. Una cantidad eficaz de un compuesto particular se puede determinar empíricamente por los expertos en la materia sin experimentación indebida.

40 En vista de lo anterior, es de gran importancia el uso de un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores y la metástasis tumoral con miras a resolver la falta de fármacos eficaces para el tratamiento de tumores.

50 Descripción de las figuras

FIG. 1 muestra el resultado de separación de la columna para los componentes respectivos del sulfato de ácido poligulónico de la presente invención.

55 FIG. 2 muestra el efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre el crecimiento de xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano.

FIG. 3 muestra el efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre la metástasis de pulmón de xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano. El panel A muestra una imagen típica (aumento: 200x) de metástasis en el pulmón mediante tinción H&E (hematoxilina-eosina); el Panel B es una vista cuantitativa del efecto de inhibición de PGAS en la metástasis de pulmón de xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435. Los datos en la figura se expresan como \pm SD (desviación estándar) media en un experimento típico. *P < 0,05, **P < 0,01, grupo de tratamiento contra grupo de control.

60 FIG. 4 muestra el efecto de inhibición de la angiogénesis de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano. El panel A muestra una imagen típica de tinción CD31 con flechas que apuntan a la tinción positiva (aumento: 200x) (en el Panel A: "C" es un grupo de control, "P" es un grupo de tratamiento PGAS); el panel B es una vista cuantitativa del efecto de la inhibición de la angiogénesis de PGAS sobre los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama

humano. Los datos en la figura se expresan como \pm SD media en un experimento. **P < 0,01, grupo de tratamiento contra grupo de control.

FIG. 5 muestra el efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre la metástasis de pulmón experimental de células B₁₆F₁₀ de melanoma murino. El panel A muestra una imagen típica de metástasis en el pulmón; el panel B es una vista cuantitativa del efecto de inhibición de PGAS sobre la metástasis de pulmón experimental de B₁₆F₁₀. Los datos en la figura se expresan como \pm SD media en un experimento típico. Se pueden obtener resultados similares de al menos dos experimentos independientes. *P < 0,05, **P < 0,01, grupo de tratamiento contra grupo de control.

FIG. 6 muestra el efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre la neovascularización de la membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo (CAM). El panel A muestra un grupo de control disolvente; el panel B muestra un grupo PGAS de 200 μ g/huevo; el panel C muestra un grupo PGAS de 400 μ g/huevo; el panel D muestra un grupo PGAS de 800 μ g/huevo (aumento: 40x).

FIG. 7 muestra el efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre la actividad heparanasa. El panel A muestra el espectro HPLC que indica la inhibición de la actividad de la heparanasa de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención; el panel B muestra la tasa de inhibición de la actividad de la heparanasa de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención, calculada a partir de los resultados del espectro del panel A anterior.

FIG. 8 muestra un efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre la polimerización de tubulina en un sistema sin células. El panel A muestra dependencia de tiempo, y el panel B muestra dependencia de la dosis.

FIG. 9 muestra el efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre la despolimerización de actina en un sistema sin células.

FIG. 10 muestra el efecto de inhibición de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención sobre una actividad divisora/de despolimerización de actina del factor de despolimerización de actina. ##P<0,01, grupo de tratamiento contra grupo de control; **P<0,01, grupo médico contra grupo Cofilina.

FIG. 11 muestra la actividad de la inhibición de la metástasis tumoral de los componentes respectivos de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá a continuación con más detalle por las realizaciones. Sin embargo, las siguientes realizaciones se proporcionan solo para fines ilustrativos, y el alcance de la presente invención no se limita a las mismas.

Materiales y reactivos

Ácido poligulurónico, adquirido en Lan Tai Pharmaceuticals Co.Ltd de Ocean University of China, con un peso molecular promedio en peso de 10000 Da con respecto a dextrano. Formamida, ácido clorosulfónico, etc., proporcionado por Sinopharm Group Chemical Reagent Company, grado A.R. (reactivo analítico). Estándar de bajo peso molecular de dextrano, adquirido en Fluka Company. inyección de doxorubicina (Adriamicina, ADM), fabricada por Zhejiang Haimen Pharmaceutical Factory, medicina precisa de la salud de Zhejiang (1996) N.º 135501, contenido: 10 mg/vial, disolvente: salmuera normal, formulación, diluida hasta una concentración deseada con salmuera normal antes de cada administración. TSK gel 2000SWXL, columna de TSK gel G3000SWXL, disponible por TOSOH Company de Japón; Bio-Gel-P6, Bio-Gel-P10, de Bio-Rad Company; Sephadex G-10, Sepharose CL-4B, de Pharmacia Company; tubulina, actina, adquiridas en SIGMA Company.

Instrumentos

Espectrómetro infrarrojo inteligente NEXUS-470, de NICOLET Company; espectrómetro de RMN DPX-300, de Bruker Company; cromatografía de permeación en gel (GPC), de Beijing Longzhida Co., Ltd.; espectrofotómetro visible y ultravioleta UV-2102, de Unocal Corporation, EE.UU.

Animales experimentales

Ratones desnudos, BALB/cA, 18-22 g, proporcionados por Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences; ratones C₅₇BL/6, de 6-7 semanas, proporcionados por Shanghai Animal Center, Chinese Academy of Sciences; huevos frescos, adquiridos en Shanghai Shenbao Chicken Farm.

Ejemplo 1: Preparación de sulfato de ácido poligulónico (PGAS)

3 ml de ácido clorosulfónico se añadieron gota a gota a 10 ml de formamida manteniéndose a una temperatura inferior a 5 °C. Después de 20 min de reacción, 1 g de ácido poligulurónico se añadió y reaccionó a una temperatura de 65-70 °C durante 3 horas. 2 volúmenes de solución de etanol al 80 % se añadieron al producto de la reacción y se agitó repetidamente, para dar una sustancia viscosa. Una solución de etanol al 80 % adicional se añadió y se repitieron las etapas anteriores 2 veces. La solución se decantó y se añadió agua para dar una sustancia viscosa. La

- 5 sustancia viscosa se ajustó con una solución de Na_2CO_3 al 1 % hasta un pH de 7,0 y se sometió a precipitación de alcohol con 2 volúmenes de una solución de etanol al 95 %. El precipitado resultante se secó a una temperatura de 50-60 °C para dar un derivado sulfatado del ácido poligulurónico. El derivado se formuló en una solución de acetato sódico de 4 mg/ ml (pH7,0) y a la solución se añadió borohidruro sódico a 50 mM. La reacción se realizó a una temperatura de 30-40 °C durante 30 min y se terminó con un baño de hielo. El pH se ajustó con ácido acético 0,1M, se liberó borohidruro sódico sin reaccionar, y el pH se ajustó para ser neutro. La solución resultante se precipitó repetidamente y se lavó con etanol, y se secó, dando un producto en bruto de sulfato de ácido poligulónico (PGAS). El producto en bruto de PGAS se formuló en una solución al 10 % y se sometió a precipitación con una solución de etanol al 95 %. El precipitado resultante se lavó con etanol absoluto, se secó y se formuló en una solución al 5 %. La solución se filtró con una membrana de 3 μm para retirar impurezas y se desaló en la columna Sephadex G-10 (15x 100 cm) con agua como una fase móvil y usando la recogida de fracciones. Los eluatos se detectaron con el método de ácido sulfúrico-carbazol, y se combinaron los componentes que contienen azúcar, se concentraron a presión reducida, se desalaron y se liofilizaron, dando un sulfato de ácido poligulónico refinado.
- 10
- 15 El contenido de azufre del sulfato de ácido poligulónico preparado anteriormente se determinó con el método de combustión en matraz de oxígeno. Se tomaron aproximadamente 25 mg de una muestra, se pesaron con precisión, y se sometieron a destrucción de productos orgánicos después del método de combustión en matraz de oxígeno. Se usó un matraz de combustión de 1000 ml, se usaron 0,1 ml de solución de peróxido de hidrógeno concentrado y 10 ml de agua como líquido absorbente. Una vez que se absorbió completamente el humo generado, la sustancia resultante se puso en un baño de hielo durante 15 min, se calentó hasta ebullición suave durante 2 min, se dejó enfriar, se añadió con 50 ml de tampón de acetato amónico-etanol (pH3,7), 30 ml de etanol, y 0,3 ml de una solución roja de Alizarina al 0,1 % como indicador, y se tituló hasta naranja-rojo con una solución de titulación de perclorato de bario (0,05 mol/l). 1 ml de la solución de titulación de perclorato de bario (0,05 mol/l) es equivalente a 1,603 mg de S. Los resultados del ensayo demuestran que, basándose en el producto seco, el contenido de azufre del sulfato de ácido poligulónico es 11,2 % en peso.
- 20
- 25

Ejemplo 2: Caracterización estructural de sulfato de ácido poligulónico (PGAS)

- 30 La caracterización estructural se realizó en los componentes sacáridos en la fracción que resulta de la preparación de sulfato de ácido poligulónico anterior.

1. Espectro de absorción de UV

- 35 El sulfato de ácido poligulónico anterior se diluyó hasta una concentración adecuada, y con agua destilada como blanco, se barrió a entre 190 nm-400 nm con el espectrofotómetro visible ultravioleta UV-2102. Se descubrió que la fracción no tiene pico de absorción específico en la región ultravioleta, lo que indica ningún doble enlace conjugado en la estructura. Sin embargo, no hay absorción específica a 190-200 nm.

2. Espectroscopía infrarroja

- 40 se prensaron 0,5 mg de PGAS para ser sedimentos de KBr, y se realizó la espectroscopía infrarroja con el espectrómetro infrarrojo inteligente NEXUS-470. Se descubrió que, una vibración de estiramiento simétrico de grupos hidroxilo está presente a 3219,53 cm^{-1} , una vibración de estiramiento simétrico de grupos carbonilo en carboxilatos está presente a 1612,58 cm^{-1} , una vibración de recorte de grupos hidroxilo está presente a 1414,33 cm^{-1} , la vibración de estiramiento simétrico de enlaces de carbono-oxígeno en grupos carboxilo está presente a 1103,97 cm^{-1} , un pico de vibración de estiramiento C-O-S está presente a 823,30 cm^{-1} , y el pico de vibración de estiramiento de S=O en el sulfato después de la sulfatación está presente a 1274,62 cm^{-1} , lo que indica que el compuesto tiene una estructura de cadena principal que contiene grupos carboxilo, hidroxilo y sulfónico.
- 45

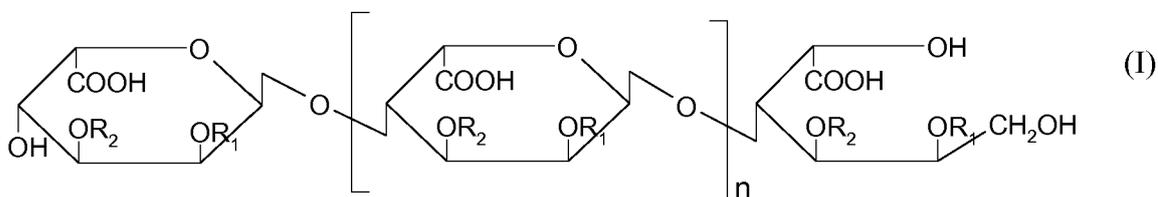
3. Espectroscopía de RMN de PGAS

- 50 La espectroscopía de RMN (RMN ^{13}C) de PGAS se determinó con un espectrómetro de RMN DPX-300 de Bruker Avance. Se descubrió que en el espectro, los picos de señales de C-2 no sulfonadas no se ven sustancialmente mientras que los picos de señales C-3 no sulfonadas todavía existen. Se indica que los grupos hidroxilo en la posición C-2 están relativamente completamente sulfonados, y los grupos hidroxilo en la posición C-3 están solo parcialmente sulfonados.
- 55

4. Peso molecular y distribución del peso molecular de PGAS

- 60 El peso molecular de PGAS se determinó con el método GPC. La detección se realizó usando el Detector de Índice de Refracción, con dextrano de Fluka Company como estándar de peso molecular, la columna de TSK gel2000SWXL como una columna cromatográfica, y una solución acuosa que contiene 0,2 % de azida sódica y 2,84 % Na_2SO_4 como una fase móvil, a un caudal de 0,5 ml/min, una temperatura de 35 °C, y un volumen de inyección de 25 μl . Se ha descubierto que, el peso molecular promedio en peso de PGAS con respecto a dextrano es 2513 Da, y los resultados de la determinación de múltiples lotes de muestras muestran que su peso molecular promedio en peso con respecto a dextrano es entre 1500-8500 Da.
- 65

Conjuntamente, estos resultados confirman que la fracción anterior es un sulfato de ácido poligulónico, que tiene un grupo hidroxilo en la posición 1 en el extremo reductor de ácido poligulurónico, y está completamente sulfonado en la posición C-2 y parcialmente sulfonado en la posición C-3, teniendo la siguiente fórmula química (I):



5

en la fórmula general (I), n, R₁ y R₂ son como se han definido anteriormente.

Ejemplo 3: Separación y preparación de componentes de PGAS

10

Se tomó una muestra de PGAS preparada anteriormente, formulada en una solución al 5 %, filtrada con una membrana de 3 μm para retirar impurezas, y se separó en la columna de gel Bio-Gel-P6 (1,6x180 cm), con 0,2 mol/l NH₄HCO₃ como una fase móvil y se recogieron las fracciones. Se detectaron los eluatos con el método de ácido sulfúrico-carbazol, se recogieron los componentes que contenían azúcar y los componentes de volumen en vacío se separaron adicionalmente sobre la columna de gel Bio-Gel-P10 (1,6x180 cm). Los productos resultantes se liofilizaron para dar una serie de componentes sacáridos de PGAS, que se identificaron por espectrometría de masas. Los resultados confirman la producción de di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, nona-, deca-, undeca- y más componentes sacáridos de PGAS.

15

20 **En los experimentos siguientes, los Ejemplos 4-11 usan el producto preparado en el Ejemplo 1, mientras que los Ejemplos 12 y 13 usan los productos preparados en el Ejemplo 3.**

Ejemplo 4: Evaluación de la eficacia de inhibición del crecimiento tumoral de sulfato de ácido poligulónico (PGAS)

25

Se inocularon células MDA-MB-435 de cáncer de mama humano (de American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) en una fase de crecimiento exponencial a una concentración de 2,5x10⁷ células/ml en el segundo cuerpo adiposo mamario izquierdo de ratones desnudos hembra de 4-5 semanas de edad (BALB/cA, proporcionados por Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences). Cuando los tumores crecieron hasta el tamaño de 100-200 mm³, los animales se dividieron uniformemente de acuerdo con los volúmenes de los tumores en un grupo de control negativo, un grupo de tratamiento (grupo de control positivo) de inyección de doxorubicina (Adriamicina, ADM), y 5 mg/kg y 20 mg/kg de grupos de tratamiento de PGAS (grupos experimentales de PGAS), 20 ratones/grupo. Los grupos experimentales de PGAS y el grupo de control positivo se dosificaron una vez por semana por inyección intravenosa durante 7 semanas continuas, y el grupo de control negativo se dosificó con una cantidad igual de salmuera normal. En los experimentos, se usó un calibre de Vernier para medir el diámetro de los tumores dos veces por semana, y el volumen del tumor (V) se calculó según la fórmula a continuación:

30

35

$$V = 1/2 \times a \times b^2$$

40

en la que, a y b representan la longitud y la anchura de los tumores, respectivamente. El volumen del tumor relativo (RTV) se calculó basándose en los resultados medidos, usando la fórmula de cálculo: $RTV_t = V_t/V_0$; en la que, V₀ es el volumen del tumor medido cuando los animales se dividieron para dosificación diferente (es decir d₀), y V_t es el tumor en el día de la medición. El indicador de evaluación farmacodinámica de la actividad antitumoral es una tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%), cuya fórmula de cálculo es la siguiente:

45

$$T/C (\%) = \frac{T_{RTV}}{C_{RTV}} \times 100\%$$

50 T_{RTV}: RTV de grupo de tratamiento; C_{RTV}: RTV de grupo de control negativo. Evaluación de la eficacia: T/C % >60 % significa ineficaz; T/C % ≤60 % con relevancia estadística de P<0,05 significa eficaz.

Se sacrificó a los animales 1 semana después de la suspensión de la dosificación. Los tejidos del pulmón se fijaron en una solución de Bouin (ácido pícrico saturado: formaldehído: ácido acético glacial=75:25:5) durante más de 24 horas, y se empaparon en etanol absoluto hasta que aparecieron las metástasis de pulmón como nódulos blancos, y los tejidos de pulmón recuperaron el color normal. El número de nódulos de metástasis de pulmón por pulmón se observó y se registró bajo un microscopio de disección. Aparte del tumor ortotópico, los tejidos se colocaron en nitrógeno líquido, se almacenaron congelados para la extracción del ARN total y la proteína. Aparte de los pulmones

55

y el tumor ortotópico, los tejidos se fijaron en formalina al 10 %, y la angiogénesis en los tejidos del tumor se determinó por tinción H&E e inmunohistoquímica.

Se descubrió que 15-20 días después de la inoculación del tumor, los xenoinjertos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano habían crecido hasta alrededor de 100-200 mm³, con un éxito de la inoculación del 100 %; en las semanas 8-9 después de la inoculación, un gran número de metástasis aparecieron en los tejidos de pulmón de los ratones desnudos portadores de tumores, con una tasa de metástasis del 100 %. En ese momento, los animales se sacrificaron y se sometieron a evaluación del efecto antitumoral. El tratamiento de PGAS se realizó por inyección intravenosa una vez por semana durante 7 semanas continuas. El grupo de tratamiento de PGAS de 5 mg/kg muestra la capacidad de inhibición del crecimiento de los tumores ortotópicos, pero el efecto de inhibición del tumor es insignificante, con un valor de T/C del 67,3 %; el grupo de tratamiento de PGAS de 20 mg/kg muestra la capacidad de inhibición de manera significativa del crecimiento de los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 del cáncer de mama en ratones desnudos, con un valor de T/C de hasta 37,6 %. El ADM de fármaco de control positivo muestra la capacidad de inhibición de manera significativa del crecimiento de tumores ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano, y el grupo de tratamiento de ADM de 5 mg/kg tiene un valor de T/C de 21,8 %. Esto demuestra que PGAS puede inhibir de manera significativa el crecimiento de los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano (FIG. 2). Bajo el régimen de dosificación de 5 mg/kg y 20 mg/kg mediante inyección intravenosa una vez por semana durante 7 semanas continuas, las tasas de inhibición de PGAS sobre la metástasis de pulmón de xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano son 60,2 % y 88,4 %, respectivamente. La tasa de inhibición de doxorubicina (5 mg/kg) sobre la metástasis de pulmón es 89,8 %. Esto demuestra que PGAS puede inhibir de manera significativa la metástasis de pulmón de los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano (FIG. 3). Además, el efecto de PGAS sobre la angiogénesis *in vivo* se evaluó por tinción inmunohistoquímica. La detección del marcador CD31 específico de células endoteliales muestra que un gran número de pequeños vasos se generan en los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano. No hay cambio significativo en la cantidad de pequeños vasos en xenoinjertos para el grupo de tratamiento PGAS de 5 mg/kg en comparación con el grupo de control, mientras que hay una disminución significativa en la cantidad de pequeños vasos en los xenoinjertos en el grupo de tratamiento de PGAS de 20 mg/kg en comparación con el grupo de control, con una tasa de inhibición del 42,1 %. Esto muestra que PGAS puede inhibir de manera significativa la angiogénesis en los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano (FIG. 4).

Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia de inhibición de metástasis tumoral de sulfato de ácido poligulónico (PGAS)

Ratones C57BL/6 de 6-7 semanas de edad (proporcionados por Shanghai Animal Center, Chinese Academy of Sciences) se dividieron de forma aleatoria en un grupo de control negativo en salmuera normal, y un grupo de tratamiento de PGAS de 5 mg/kg y un grupo de tratamiento de PGAS de 20 mg/kg, 10 animales/grupo. Células B₁₆F₁₀ de melanoma murino (de American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) en una fase de crecimiento exponencial en una concentración de 2,5X10⁶ células/ml se inocularon en la vena de la cola de los ratones. 20 min antes de la inoculación de las células, los grupos de PGAS se dosificaron una vez mediante inyección intraperitoneal (i.p.), y el grupo de control negativo se dosificó con una cantidad equivalente de salmuera normal. Después de 11 días, se retiraron los pulmones de los ratones, y los tejidos del pulmón se fijaron en una solución de Bouin (ácido pícrico saturado: formaldehído: ácido acético glacial= 75:25:5) durante más de 24 horas. El número de nódulos de metástasis de pulmón por pulmón se observó y se registró bajo un microscopio de disección. Como alternativa, dicha observación se realizó después de que los tejidos de pulmón se empaparan adicionalmente en etanol absoluto durante dos días hasta que los tejidos de pulmón recuperaron el color normal. Se descubrió que, 11 días después de la inoculación, un gran número de metástasis aparecieron en los tejidos de pulmón de los ratones, con una tasa de metástasis del 100 % y en el régimen de dosificación de inyección i.p. única, el grupo de tratamiento de PGAS de 5 mg/kg muestra una inhibición significativa de la metástasis del tumor, con una tasa de inhibición de hasta 40,81 %, y el grupo de tratamiento de PGAS de 20 mg/kg muestra una inhibición más significativa sobre la metástasis en el pulmón de las células B₁₆F₁₀ del melanoma, con una tasa de inhibición de hasta el 82,20 %. Los resultados muestran que los PGAS pueden inhibir de manera significativa la metástasis en el pulmón de las células B₁₆F₁₀ de melanoma (FIG. 5).

El inventor estudió además el mecanismo de acción de PGAS.

Ejemplo 6: Ensayo de inhibición de angiogénesis mediante PGAS

Huevos frescos (adquiridos en Shanghai Shenbao Chicken Farm) se colocaron en una base Roll-X incubadora (Lyon Electric Company, CA, EE.UU.) a 39 °C y a una humedad del 50 % (la cámara de gas hacia arriba). Después de incubación continua durante 7 días, los huevos se iluminaron para identificar si los embriones de pollo estaban vivos y se determinó y marcó la posición de la membrana corioalantoidea. Se hizo un pequeño agujero en el extremo del saco alveolar de los huevos, y el embrión de pollo se colocó horizontalmente (la membrana corioalantoidea hacia arriba). El saco alveolar se succionó suavemente con una perilla para pipeta de caucho, de tal manera que la membrana corioalantoidea se colapsó y separó de la cáscara de huevo, y permitió mantenerse durante un periodo de tiempo. Después, una posición de ventana abierta de 1 cm² se hizo sobre el embrión de pollo, y la ventana

abierta se molió y recortó con unas tijeras, el polvo se retiró de la cáscara de huevo, la cáscara de huevo en la ventana abierta se peló, y la membrana corioalantoidea fue claramente visible. Se trataron las esponjas de gelatina con un tamaño de 0,25 X 0,25 X 0,25 (longitud X anchura X altura) cm³ con 10 µl de PGAS a una concentración final de 200, 400, 800 µg/huevo y un control de vehículo, y después se colocó suavemente en el lugar en la membrana corioalantoidea sin vasos grandes. La ventana pequeña se selló con cinta transparente estéril, y los huevos se incubaron adicionalmente durante 48 horas. Se retiró la cinta para su observación, se tomaron fotografías (aumento: 40x), y se evaluó el efecto de inhibición de PGAS sobre la angiogénesis de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo. Se descubrió que (FIG. 6), en la membrana corioalantoidea adyacente a la esponja que contenía PGAS, la densidad del vaso se redujo de manera significativa, y se presentó la tendencia de inhibición dependiente de la concentración. Esto muestra que PGAS tiene el efecto de inhibición de la angiogénesis.

Ejemplo 7: Ensayo de inhibición de la actividad de la heparanasa mediante PGAS

El sistema de expresión en insecto sin suero y el sistema de purificación en columna de afinidad de la heparanasa se establecieron usando ADNc de heparanasa humana obtenida de placenta humana mediante amplificación por PCR y recombinación de genes, y se obtuvo una heparanasa altamente activa con una pureza del 95 % o superior. A 150 µl de tampón de reacción (acetato sódico 50 mM, pH4.2), 0,5 µg de FITC-HS (heparán sulfato marcado con isotiocianato de fluoresceína) y heparanasa a una concentración final de 25 ng/ ml, y también se añadió PGAS a varias concentraciones, y se reaccionó a 37 °C durante 3 h. Después de 5 min a 100 °C, se realizó la centrifugación a 10000 rpm durante 20 min para sedimentar los materiales insolubles. El sobrenadante se filtró con una membrana de filtro de 0,45 µm y después se inyectó sobre la columna de TSK gel G3000SWXL con una carga de 20 µl, usando un tampón Tris 50 mM/NaCl 150 mM, pH7,5, y un caudal de 0,8 ml/min. La intensidad de fluorescencia del producto FITC-HS se detectó con un detector de fluorescencia (Ex: 485 nm, Em: 538 nm). Se evaluó la actividad relativa de la enzima mediante la disminución de la mitad del área frontal del pico FITC-HS intacto, para determinar el efecto de PGAS sobre la actividad de la heparanasa. Se descubrió que, PGAS inhibe la actividad de la heparanasa de una manera dependiente de la dosis, con una IC₅₀ de 6,55 ng/ ml, y cuando la dosis es 40 ng/ ml, la actividad es mejor que la heparina del control positivo (FIG. 7).

Ejemplo 8: Ensayo de inhibición de la actividad de la enzima C-Met mediante PGAS

El sustrato Poli (Glu, Tyr) de la reacción enzimática se recubrió sobre una placa de microtitulación, la solución de ATP y sulfato de ácido poligulónico y la solución de la enzima c-Met con concentraciones apropiadas se añadieron y se colocaron en un agitador para la reacción a 37 °C durante 1 hora. Después, se añadió el anticuerpo PY99 diluido con T-PBS que contenía 5 mg/ ml de BSA y se reaccionó en el agitador a 37 °C durante 0,5 horas. Además, anti-IgC de ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante se añadió y se reaccionó en el agitador a 37 °C durante 0,5 horas adicionales. Para finalizar, se añadió 2 mg/ ml de solución en desarrollo de OPD, se reaccionó a 25 °C en la oscuridad durante 1-10 min, y se añadió H₂SO₄ 2M para terminar la reacción. Se midió la absorbancia a 490 nm mediante el lector de microplacas y se calculó la tasa de inhibición de la actividad enzimática:

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = \left(\frac{\text{Valor de DO del compuesto} - \text{valor de DO de pocillo de control sin enzima}}{\text{Valor de DO de pocillo de control negativo} - \text{Valor de DO de pocillo de control sin enzima}} \right) \times 100$$

Se descubrió que, la tasa de inhibición de la actividad enzimática de sulfato de ácido poligulónico a una concentración de 10 µg/ ml sobre c-Met es 71,1 %, lo que indica que el sulfato de ácido poligulónico tiene el efecto de inhibición de la actividad de la enzima C-Met.

Ejemplo 9: Ensayo de inhibición de la polimerización de tubulina mediante PGAS

Se añadieron 10 µl de PGAS a varias concentraciones en una placa de 96 pocillos y se precalentó a 37 °C durante 10 min. El polvo liofilizado de tubulina se diluyó en tampón de PEM (PIPES 100 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM) más GTP 1 mM, glicerina al 5 % hasta una concentración de 12 µM. 90 µl de esta solución se añadió a la placa de 96 pocillos, y se inició un lector de microplacas, la temperatura era de 37 °C y la longitud de onda de detección se ajustó a 340 nm. Se mezcló completamente y se leyó una vez por min durante 30 min. continuos. Los resultados muestran que PGAS puede inhibir significativamente la polimerización de tubulina en el sistema sin células, y cuando la concentración de PGAS aumenta de 2,5 µM a 40 µM, la tasa de inhibición aumenta de 18,26 % a 73,44 %, que es dependiente de la dosis, con una IC₅₀ de 8,58 µM (FIG. 8).

Ejemplo 10: Inhibición de la despolimerización de actina mediante PGAS

Se añadió actina marcada con pirenilo en un tampón de agregación (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,5), y se incubó a 37 °C durante 30 min. de manera que se agregó en fibrillas. Después, el tampón de despolimerización de actina (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 0,2 mM, ATP 0,2 mM, pH 8,0) y PGAS de diferentes concentraciones se añadieron para la dilución de manera que se despolimerizó. Un lector de microplacas de fluorescencia se ajustó a una longitud de onda de emisión de 360 nm y una longitud de onda de absorción de 410 nm y a una temperatura de 37 °C. Se mezcló completamente y se leyó una vez por min. durante 30 min. continuos.

Los resultados muestran que, PGAS puede inhibir significativamente el proceso de despolimerización de actina en el sistema sin células y exhibe dependencia de la dosis (IC_{50} es 10,6 μ M) (FIG. 9).

5 **Ejemplo 11: Inhibición de PGAS sobre la actividad divisora/de despolimerización de actina de cofilina**

10 Sulfato de ácido poligulónico se acopló con Sepharose CL-4B para preparar una columna de cromatografía de afinidad de sulfato de ácido poligulónico. Usando esta columna de cromatografía, se extrajeron y se separaron las proteínas de unión de sulfato de ácido poligulónico en la línea celular A549 de cáncer de pulmón. Se descubrió por identificación de espectrométrica de masas que, la cofilina es una de las proteínas que se une fuertemente a sulfato de ácido poligulónico. Estudios adicionales muestran que sulfato de ácido poligulónico puede inhibir significativamente la actividad divisora/de despolimerización de actina de la cofilina (FIG. 10). Esto indica que el sulfato de ácido poligulónico puede enlazarse a la cofilina para inhibir la actividad divisora/de despolimerización de actina de la cofilina, y por lo tanto funcionar para inhibir la migración celular de las células tumorales.

15 **Ejemplo 12: Determinación de la actividad de componentes de azúcar de PGAS**

20 Se ensayó la actividad antitumoral de los componentes de azúcar de PGAS preparados en la Realización 3. Se descubrió que, los componentes tetrasacáridos a dodecasacáridos (que corresponden a aquellos en los que n es 2-10 en la fórmula general (I)) del PGAS a una dosis de inyección intravenosa de menos de 15 mg/kg tienen un valor T/C del 30 % o inferior sobre el crecimiento de los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano en ratones desnudos, y tienen una tasa de inhibición del 95 % o superior sobre la metástasis de pulmón de los mismos; los componentes hexasacáridos a decasacáridos (en la fórmula general (I), n=4-8) a una dosis inferior a 10 mg/kg tienen un valor T/C del 30 % o inferior sobre el crecimiento de los xenoinjertos ortotópicos MDA-MB-435 de cáncer de mama humano en ratones desnudos, y tienen una tasa de inhibición del 95 % o superior sobre la metástasis de pulmón de los mismos. Los resultados son mejores cuando el contenido de azufre es 7-15 % en peso, y son mejores cuando es 9-13 % en peso.

30 **Ejemplo 13: Determinación de la actividad de inhibición de la metástasis tumoral de los componentes de azúcar de PGAS**

35 El efecto de componentes de azúcar de PGAS diferentes separados en el Ejemplo 3 sobre la metástasis tumoral se detectó con el ensayo celular Transwell. Se usa tripsina para digerir células MDA-MB-435 de cáncer de mama que se cultivan por pasaje *in vitro* en la etapa de crecimiento exponencial, seguido de lavado con cultivo sin suero tres veces y diluido a 2×10^6 ml. 100 μ l de las diluciones celulares se añadieron en las cámaras superiores de los pocillos en la célula Transwell, y 600 μ l de cultivo que contiene FBS al 10 % se añadieron en las cámaras inferiores, y se añadieron 100 μ g/ml de diferentes componentes PGAS tanto a las cámaras superiores como inferiores. Después de que las células se incubaron en una incubadora que contenía CO_2 al 5 % a 37 °C durante 12 h, el medio de cultivo se retiró, y se fijaron las células en una solución de etanol al 90 % durante 30 min. Las células se tiñeron con una solución violeta cristal al 0,1 % (ácido bórico 0,1M, violeta cristal al 0,1 % (p/v), etanol al 2 %) a temperatura ambiente durante 10 min, se enjuagaron con agua clara, y se limpiaron con hisopos de algodón para retirar las células no migradas en la capa superior. Las células se observaron, fotografiaron y registraron bajo un microscopio. Para finalizar, se realizó la extracción con solución de ácido acético al 10 % a 100 μ l/pocillo durante 10 min, los valores de DO se determinaron a 595 nm, y se calcularon las tasas de inhibición de la migración de diferentes componentes de azúcar sobre las células de cáncer de mama.

$$45 \quad \text{Tasa de inhibición de la migración (\%)} = (1 - DO_{\text{tratamiento}}/DO_{\text{control}}) \times 100 \%$$

50 Se descubrió que, las células MDA-MB-435 en el grupo de control pueden migrar libremente desde las cámaras superiores a inferiores dentro de 12 horas junto con el gradiente de concentración de FBS. Se puede observar a partir de los resultados fotográficos de tinción de violeta cristal que, diferentes componentes de azúcar de PGAS, que varían desde tetrasacáridos (en la fórmula general I, n=2) hasta undecasacáridos (en la fórmula general I, n=9), y polisacáridos más grandes, pueden inhibir significativamente la migración de las células tumorales, mientras que el componente disacárido (en la fórmula general I, n=0) y el componente trisacárido (en la fórmula general I, n=1) tienen tasas de inhibición inferiores (FIG. 11), lo que indica que varios componentes PGAS (particularmente, de tetrasacárido a undecasacárido y policomponente más grande) tiene el efecto de inhibición de la metástasis de las células tumorales.

Procesamiento estadístico

60 Los datos anteriores se sometieron a análisis estadístico con el software Statview, se expresaron los resultados como "Valores medios \pm SE", y se usó ANOVA para su comparación.

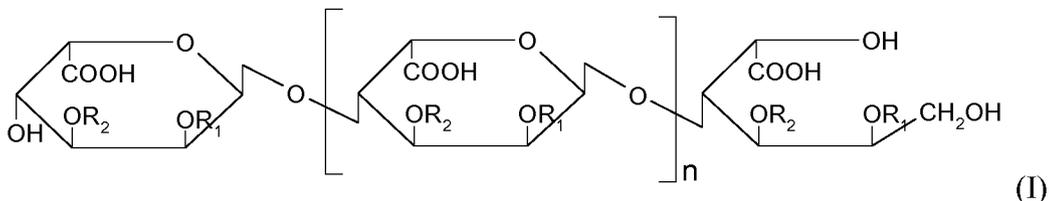
65 De acuerdo con los resultados farmacológicos anteriores, se puede preparar una composición farmacéutica usando medios de formulación convencionales mezclando una cantidad eficaz de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención con vehículo farmacéutico. La composición farmacéutica se puede usar como fármacos de tratamiento tumoral y fármacos de tratamiento de metástasis tumoral, y también se puede usar como inhibidores de

la angiogénesis, inhibidores de la heparanasa, inhibidores de la enzima C-Met, inhibidores de la polimerización de microtúbulos e inhibidores de la despolimerización de actina. El uso de un sulfato de ácido poligulónico de la presente invención en la preparación de un medicamento para tratar tumores y metástasis tumoral es de relevancia muy importante.

5

REIVINDICACIONES

1. Un sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la unidad de ácido L-gulurónico se une por enlaces 1,4-glicosídicos entre sí, con un hidroxilo localizado en la posición 1 del extremo reductor, y los anillos de azúcar completamente sulfatados en la posición C-2, en donde el sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene una estructura de la siguiente fórmula general (I):



10 en donde,

n representa 0 o un número entero de 1-23,

R₁ es SO₃H,

15 R₂, independiente uno del otro, representa H o SO₃H,

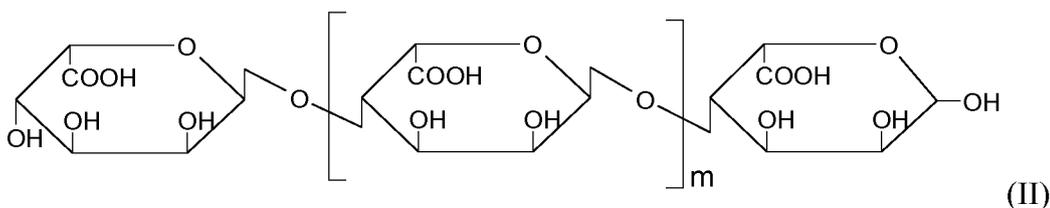
siempre y cuando el grado de sulfatación calculado como el contenido de azufre del sulfato de ácido poligulónico sea 5 a 20 % en peso.

2. El sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la fórmula general (I), n es un número entero de 2-13, preferentemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

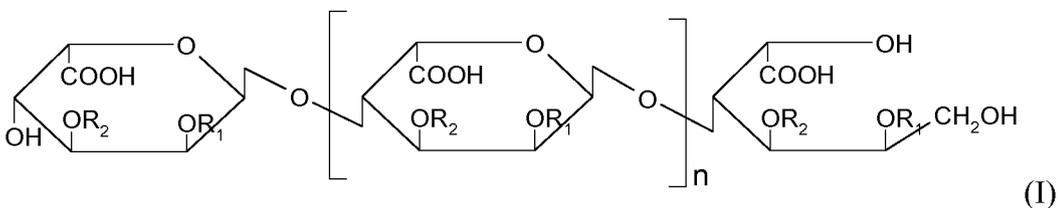
3. El sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el contenido de azufre es 7-15 % en peso, preferentemente 9-13 % en peso.

4. Un método para preparar el sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

reaccionar un ácido poligulurónico como se muestra en la siguiente fórmula estructural (II) con un reactivo sulfonante, seguido de reducción por medio de un agente reductor para dar el sulfato de ácido poligulónico como se muestra en la fórmula general (I),



en la fórmula estructural (II), m representa 0 o un número entero de 1-48;



en la fórmula general (I), n, R₁ y R₂ son como se han definido en la reivindicación 2.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el reactivo sulfonante es ácido clorosulfónico; la temperatura de sulfonación es 45-85 °C, preferentemente 60-75 °C; el tiempo de reacción es 1,5-4,5 horas, preferentemente 2-3,5 horas, de la manera más preferente 3 horas; y/o, el agente reductor es borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, los reactivos de níquel-hidruro o los agentes reductores basados en halógeno.

6. Uso del sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento y/o metástasis tumoral.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el tumor se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, melanoma y cáncer cerebral.
- 5 8. Uso del sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la preparación de inhibidores del crecimiento tumoral, inhibidores de la metástasis tumoral, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la heparanasa, inhibidores de la enzima C-Met, inhibidores de la polimerización de microtúbulos, inhibidores de la actividad del factor de despolimerización de actina y/o inhibidores de la agregación de actina.
- 10 9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del sulfato de ácido poligulónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 15 10. Uso de la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 en la preparación de inhibidores del crecimiento y/o metástasis tumoral.
- 20 11. Uso de la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 en la preparación de inhibidores del crecimiento tumoral, inhibidores de la metástasis tumoral, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la heparanasa, inhibidores de la enzima C-Met, inhibidores de la polimerización de microtúbulos, inhibidores de la actividad del factor de despolimerización de actina y/o inhibidores de la agregación de actina.

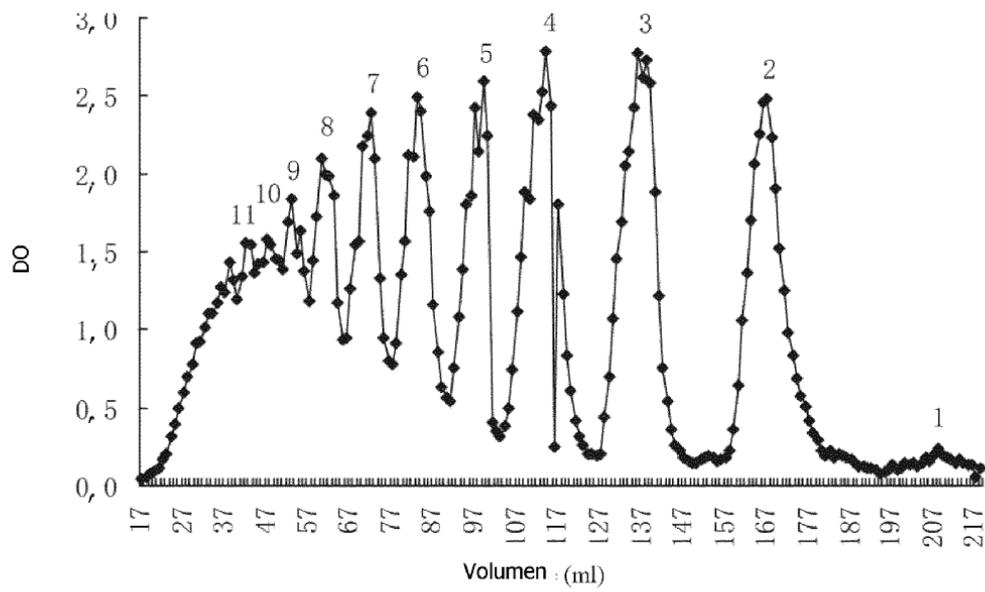


FIG. 1

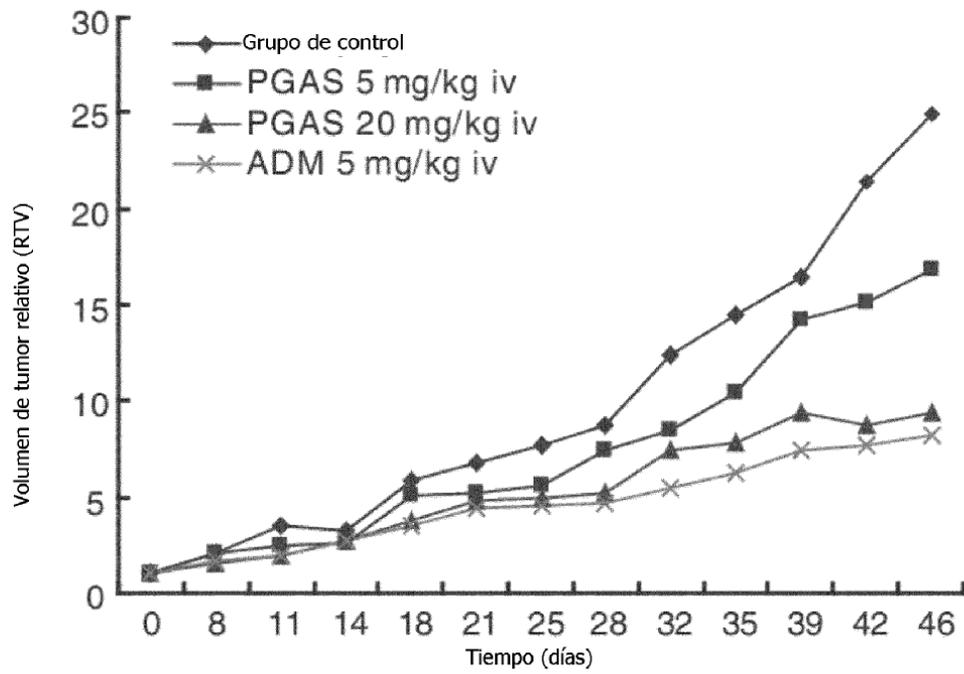
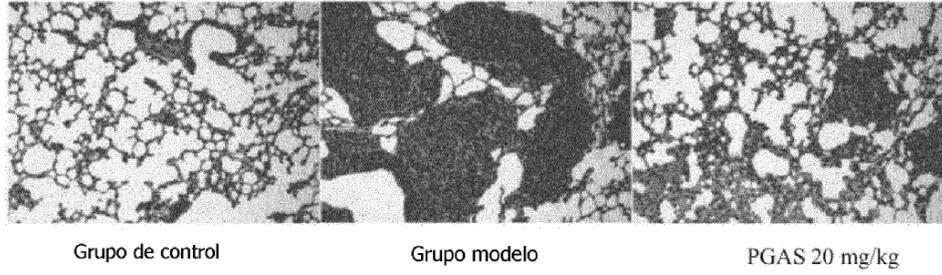


FIG. 2

A



B

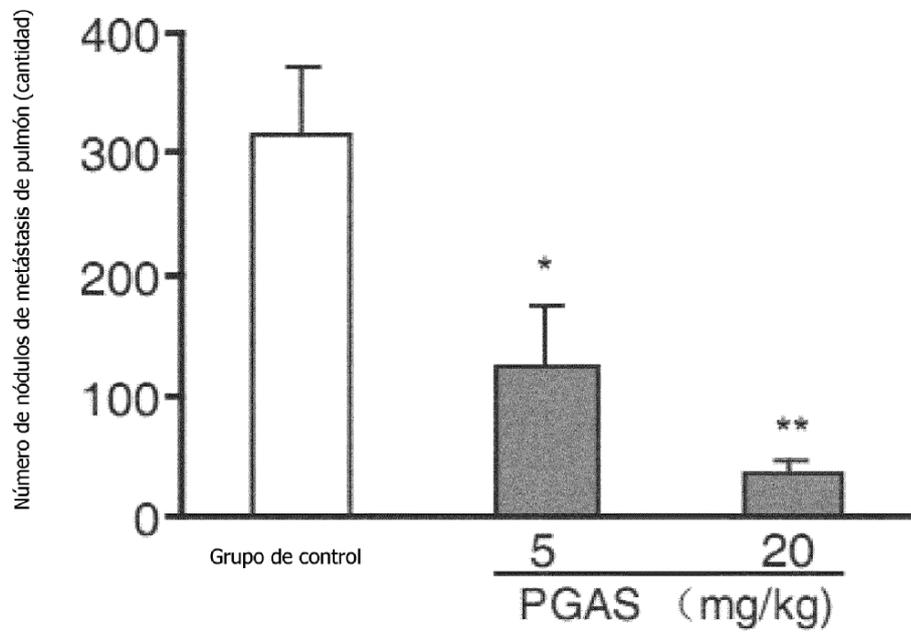
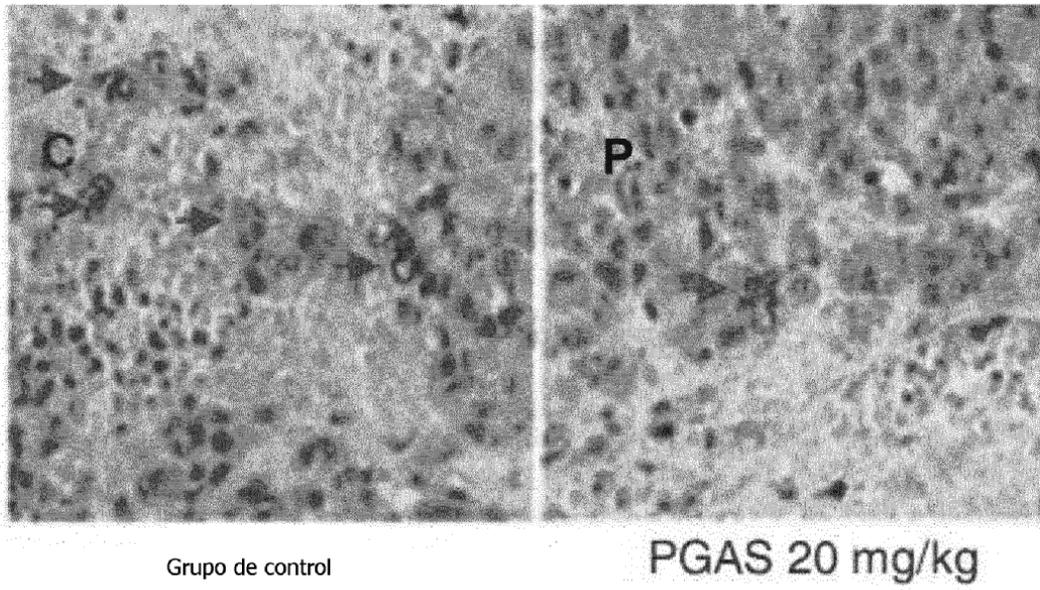


FIG. 3

A



B

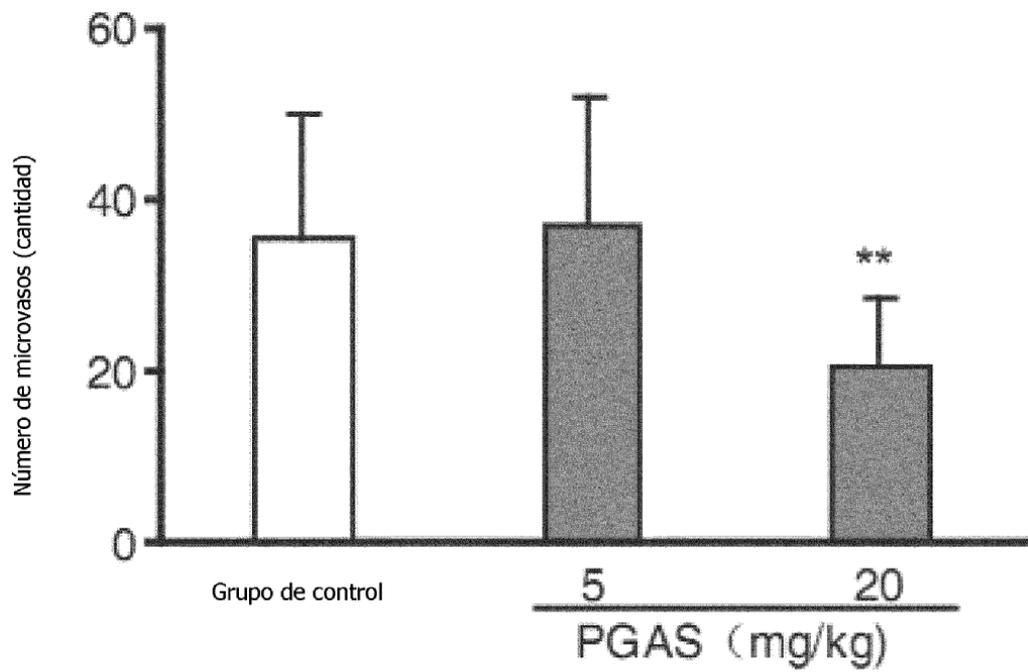
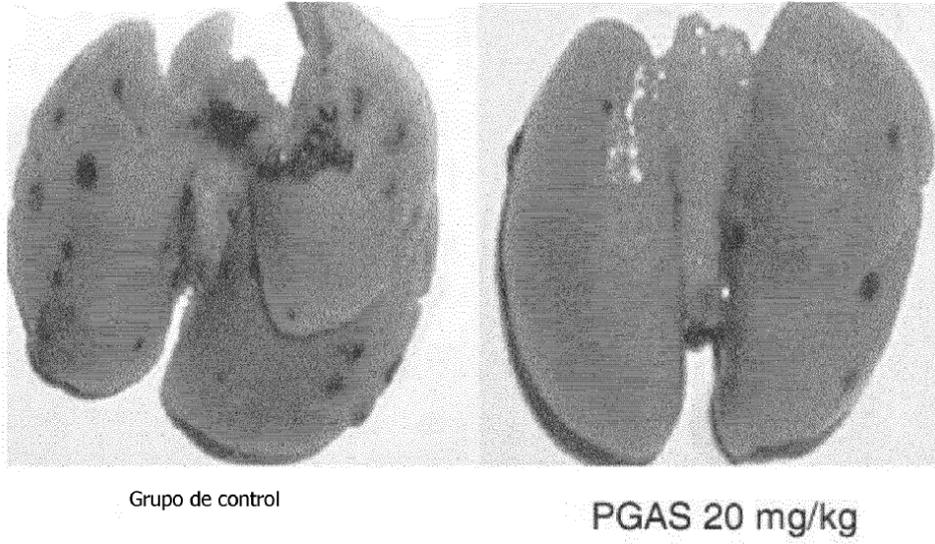


FIG. 4

A



B

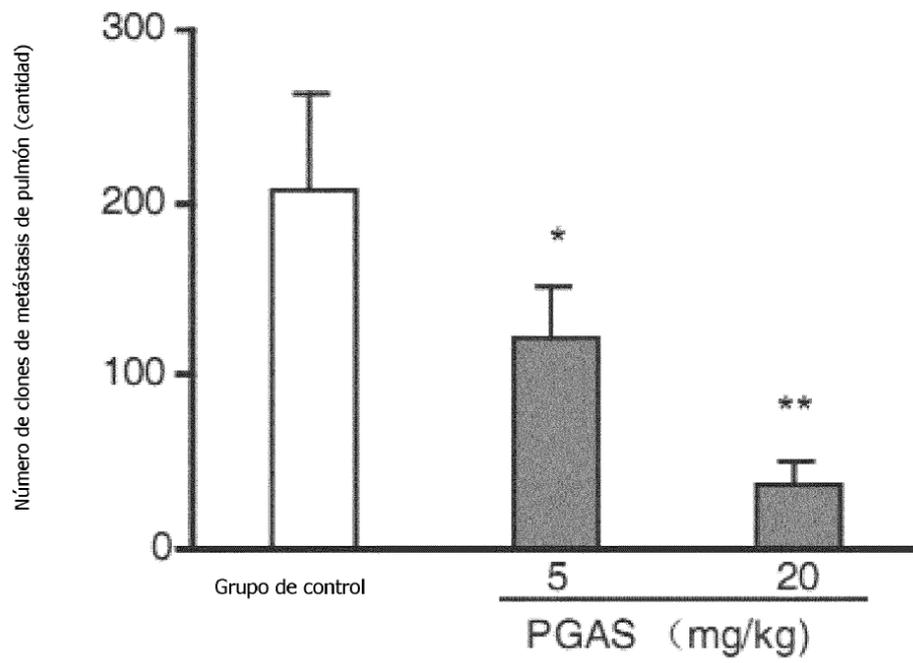


FIG. 5

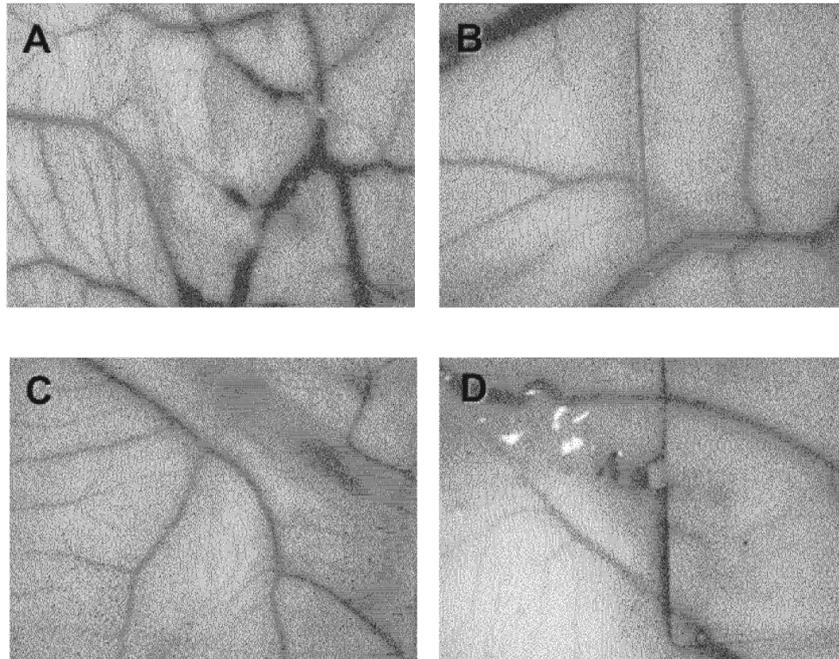
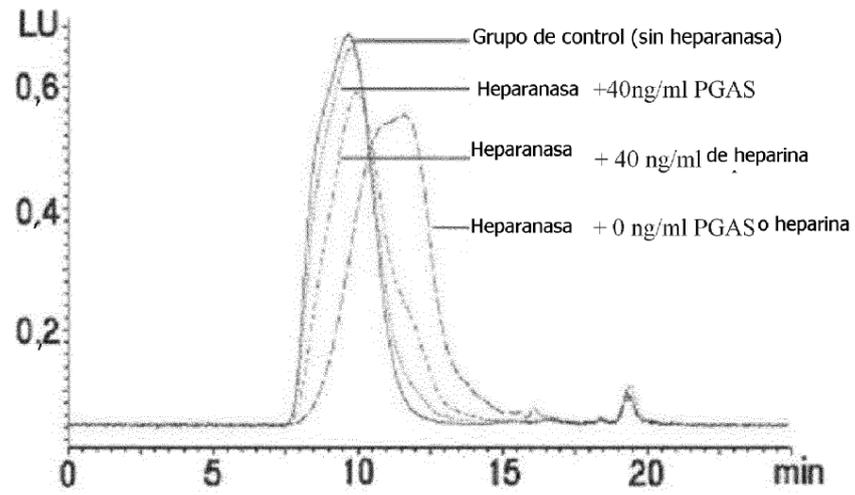


FIG. 6

A



B

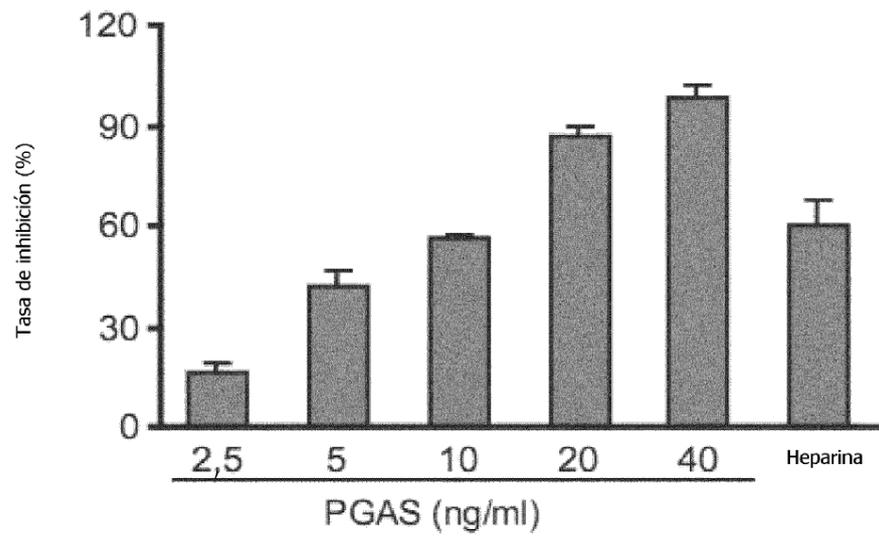
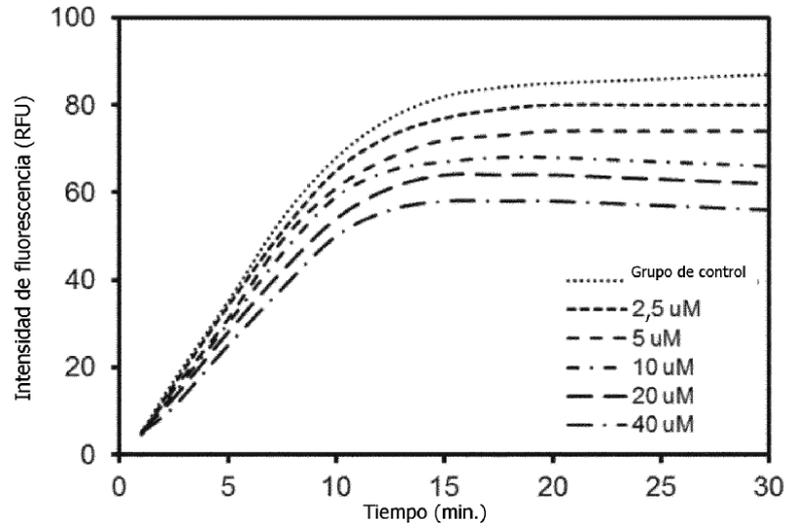


FIG. 7

A



B

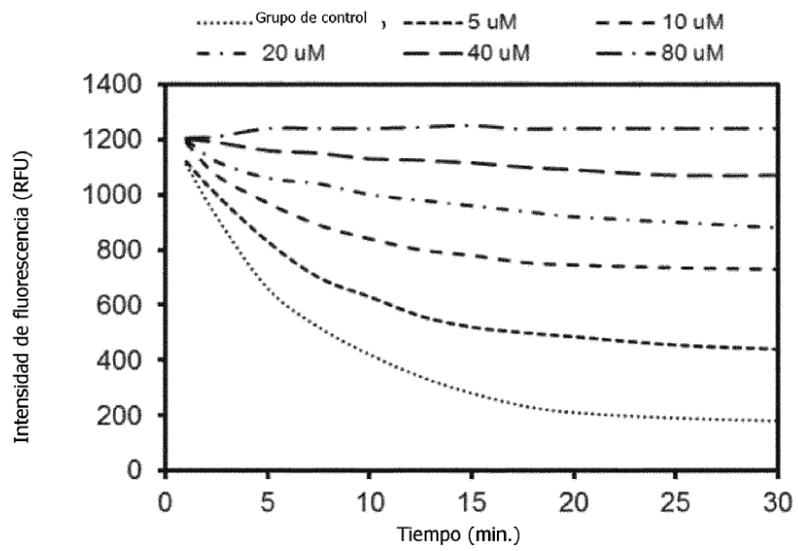


FIG. 8

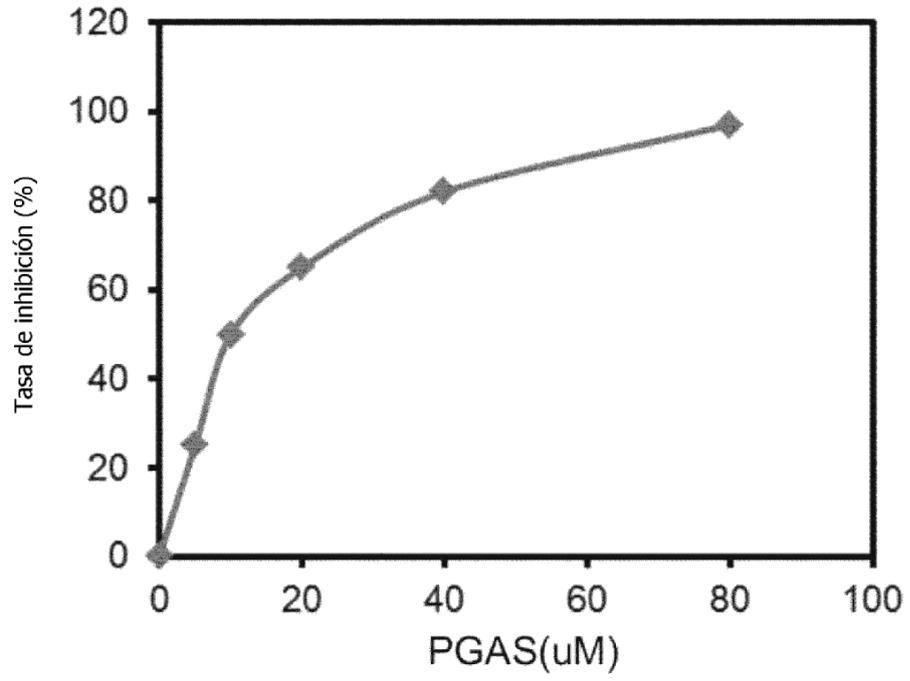


FIG. 9

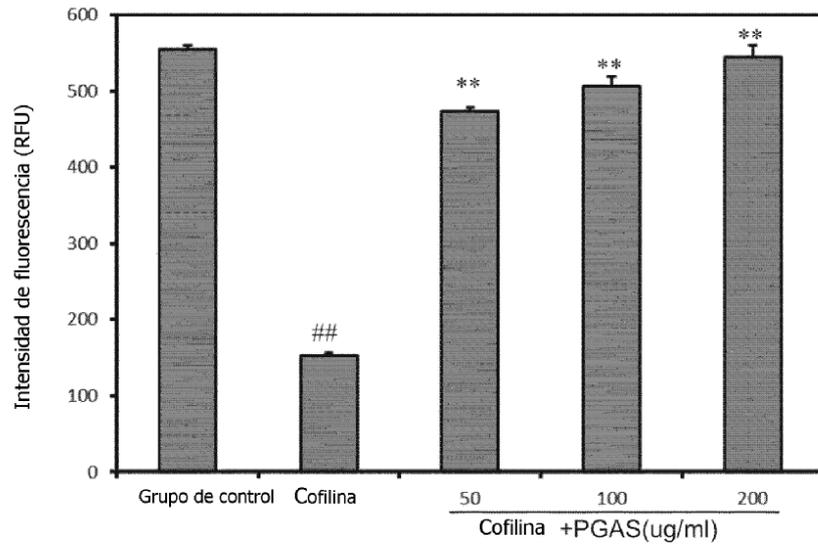


FIG. 10

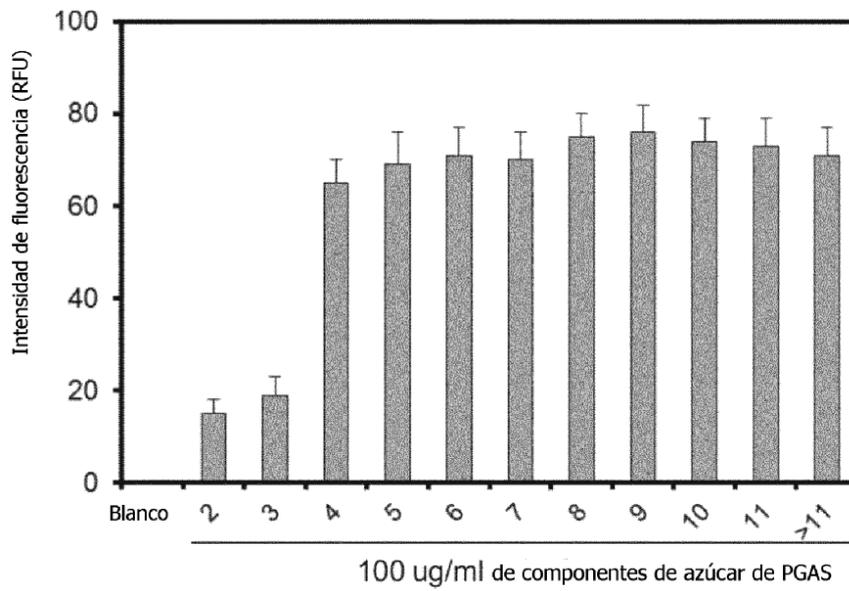


FIG. 11