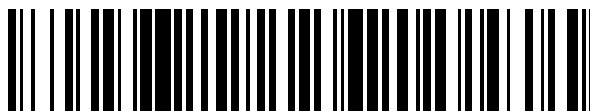


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 582**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2014** **E 18170785 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 3375792**

54 Título: **Derivados de glicosaminoglicanos N-desulfatados y su uso como fármacos**

30 Prioridad:

31.10.2013 IT LO20130005

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

18.11.2019

73 Titular/es:

NOVAHEALTH BIOSYSTEMS LLC (100.0%)
700 E. Main Street
Waunakee, WI 53597, US

72 Inventor/es:

NAGGI, ANNAMARIA y
TORRI, GIANGIACOMO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 731 582 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 N-desulfatados y su uso como fármacos

5 **Sumario**

La invención de refiere a derivados de glicosaminoglicano N-desulfatados y, opcionalmente, 2-O-desulfatados, en los que al menos parte de los dioles y OH/NH₂ adyacentes han sido convertidos al aldehído correspondiente, habiéndose reducido dichos aldehídos al correspondiente alcohol. Estos productos están dotados de actividad inhibidora de heparanasa y actividad anti-tumor. Dichos derivados de glicosaminoglicano se obtienen de glicosaminoglicano natural o sintético, preferentemente, de heparina no fraccionada, heparinas de bajo peso molecular (HBPM), heparán sulfato o derivados de los mismos. Los glicosaminoglicanos naturales pueden obtenerse de cualquier fuente animal (es posible utilizar diferentes especies animales y órganos).

La invención se refiere además al proceso para su preparación y, además, a su uso como principios activos de medicamentos, útiles en patologías. En particular, dichas patologías comprenden mieloma múltiple y otros cánceres (es decir, sarcomas, carcinomas, malignidades hematológicas), incluyendo su forma metastásica. Los derivados de glicosaminoglicano de la invención pueden utilizarse como medicamentos también en combinación con otras terapias, ya sean terapias oncológicas o no. Asimismo, la invención se refiere al uso de dichos derivados de glicosaminoglicano N-desulfatado y, opcionalmente 2-desulfatados, preferentemente, obtenidos de heparinas y, heparinas de bajo peso molecular (HBPM) en cualquier indicación terapéutica que se beneficie de la inhibición de heparanasa (es decir, nefropatía diabética, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis, artritis, psoriasis, septicemia, aterosclerosis), también en combinación con tratamientos o fármacos establecidos conocidos.

La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo al menos uno de dichos derivados de glicosaminoglicano N-desulfatado y, opcionalmente O-desulfatado, en los que al menos parte de los dioles y OH/NH₂ adyacentes han sido convertidos en el aldehído correspondiente, seguido de la reducción al alcohol correspondiente. Opcionalmente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo al menos uno de dichos derivados de glicosaminoglicano en combinación con al menos otro principio activo, más preferentemente un compuesto terapéutico. Preferentemente, dichos derivados de glicosaminoglicano son derivados de heparina o heparinas de bajo peso molecular (HBPM).

Antecedentes

El mieloma múltiple es la segunda malignidad hematológica más frecuente que representa más de un 10 % de todos los cánceres hematológicos en los Estados Unidos, produciéndose cada año cerca de 20.000 casos nuevos y con una mortalidad superior a 50 % (Graham-Rowe D., 2011, Multiple myeloma outlook. Nature 480, s34-s35).

Durante los últimos años, se han desarrollado terapias prometedoras, como la administración del inhibidor proteasoma (Velcade), bifosfonatos, talidomida y otros. La eficacia de estos agentes se debe, al menos en parte, a su impacto sobre el microentorno del tumor de mieloma.

Si bien se ha demostrado la eficacia de dichos agentes contra el mieloma, se necesitan fármacos nuevos y mejorados para tratar mieloma y otros tumores.

La heparanasa es una endo-β-glucuronidasa que escinde las cadenas de heparán sulfato (HS) de proteoglicanos (PG-HS) como sindecano-1, liberando así factores de crecimiento unidos a HS.

En los seres humanos, parece haber una sola enzima heparanasa funcional dominante capaz de escindir HS. La heparanasa se expresa en muchos tumores humanos, en los que aumenta significativamente tanto el potencial angiogénico como metastásico de las células tumorales. De hecho se han correlacionado niveles de heparanasa elevados con progresión avanzada y metástasis en muchos tipos de tumor. Por ejemplo, se asocia un alto nivel de heparanasa con un tiempo de supervivencia de los pacientes posoperatorio más corto. En los laboratorios de los Profesores Vlodavsky y Sanderson se ha determinado por ensayo un papel directo de heparanasa en la metástasis de tumor.

Además de sus funciones enzimáticas, que incluyen la liberación de factores de crecimiento unidos a HS y la degradación de la matriz extracelular (MEC) mediante células invasivas, la heparanasa también tiene una función no enzimática que puede influir en el comportamiento del tumor y su microentorno. El grupo de Sanderson lideró un estudio de heparanasa y sindecano-1 en mieloma, estableciendo que heparanasa actúa como regulador principal de su fenotipo de tumor agresivo. Esto tiene lugar al promover la regulación al alza de VEGF y MMP-9, que estimulan en conjunto el crecimiento de tumor, la destrucción ósea metastásica y osteolítica. De hecho se ha demostrado *in vivo* que la heparanasa promueve el crecimiento de tumores de mieloma y metástasis espontáneo al hueso y que la expresión de heparanasa mediante células tumorales aviva la osteólisis galopante, debido al menos parcialmente a la regulación a la alza de expresión RANKL. El efecto de promoción de osteólisis de heparanasa puede revestir una

gran importancia ya que se liberan factores de crecimiento unidos al hueso cuando se degrada el hueso. Por otra parte, los osteoclastos pueden liberar factores de promoción de crecimiento de tumor como HGF. Estos factores en combinación pueden ayudar a establecer nichos dentro de la médula ósea que soportan la migración dirigida de célula tumoral y el posterior crecimiento (Fux, L, et al. 2009, Heparanase: busy at the cell surface. Trends Biochem Sci 34 (10): 511-519; Sanderson R.D., y Yang Y., 2008, Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. Clin. Exp Metastasis 25: 149-59; Ilan N., et al. 2006. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. Int. J. Biochem. Cell Biol. 38: 2018-2039). La inhibición de heparanasa es por tanto una diana viable de terapia de mieloma, soportada por el hecho de que existe una sola heparanasa enzimáticamente activa y por el hecho de que su expresión en tejidos normales es rara. Asimismo, se ha demostrado que ratones en los que se ha desactivado heparanasa son viables y no presentan trastornos visibles. Esto indica que no se producen efectos secundarios o muy leves con la estrategia de inhibición de heparanasa (Casu B., et al. 2008. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. Pathophysiol Haemost Thromb. 36: 195-203; Vlodavsky I., et al. 2007. Heparanase: structure, biological functions, y inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. Curr Pharm Des. 13: 2057- 2073; Naggi A., et al. 2005. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfatation, Graded N-Acetylation, and Glycol Splitting. J. Biol. Chem. 280: 12103-12113).

La heparina es un polisacárido sulfatado polidisperso de la familia de glicosaminoglicano dotado de actividad anticoagulante y antitrombótica. Las cadenas de sacárido de la heparina consisten en restos de ácido urónico y D-glucosamina alternos. La unidad de repetición principal es el disacárido ácido L-idurónico 2-O-sulfatado (IdoA2S)_a(1→4) y D-glucosamina N-, 6-O-sulfatada (GlcN6S). Los constituyentes menores son ácido L-idurónico y D-glucurónico no sulfatado, junto con N-acetil D-glucosamina y D-glucosamina N-, 3-O, 6-O- trisulfatada (Casu B., 2005. Structure y active domains of heparin. En: Chemistry y Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Amsterdam: Elsevier. 1-28; Casu B. and Lindahl U. 2001, Structure y biological interactions of heparin y heparan sulfate. Adv Carbohydr Chem Biochem 57: 159-206). La heparina, que es estructuralmente similar a HS, es capaz de inhibir eficazmente heparanasa, pero su uso a altas dosis en la estrategia de inhibición de heparanasa es imposible debido a su actividad anticoagulante.

Cabe destacar que las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) que son más biodisponibles y menos anticoagulantes que heparina, parecen prolongar la supervivencia de pacientes con cáncer, probablemente a través del efecto directo en el crecimiento de tumor y metástasis. Esto puede deberse, al menos en parte, a la inhibición de la actividad enzimática de heparanasa (Zacharski L.R., y Lee, A.Y. 2008, Heparin as an anticancer therapeutic. Expert Opin Investig Drugs 17: 1029-1037; Yang Y et al., 2007, The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. Blood 110: 2041-2048).

En la técnica anterior se han seleccionado inhibidores de actividad de enzimática de heparanasa eficaces estudiando la inhibición de heparanasa mediante heparinas no-anticoagulantes, conteniendo la mayoría de ellas restos de ácido urónico no sulfatados modificados por apertura del anillo glicosídico en el enlace 2-3 (división de glicol). Dichos inhibidores difieren en su grado de O-sulfatación, N-acetilación y división de glicol de restos de ácido urónico no sulfatados tanto pre-existentes como generados por 2-O-desulfatación graduada (Naggi A., 2005. Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative. En: Chemistry and Biology of Heparin y Heparan Sulfate. Amsterdam: Elsevier 461-481).

El término "división de glicol" (dg) se refiere convencionalmente a polímeros de carbohidrato que presentan apertura de algún resto monosacárido como consecuencia de la rotura (división de glicol) de una unión entre dos carbonos adyacentes, que llevan cada uno de ellos un grupo hidroxilo. Las heparinas de división de glicol de primera generación, es decir, las llamadas "oxiheparinas reducidas" (heparinas RO), consistieron en gran medida en bloques polisulfatados sin modificar interrumpidos ocasionalmente por restos de división glicol que corresponden a restos de ácido glucurónico/ácido idurónico no sulfatados que estaban presentes junto con las cadenas originales (Naggi A., 2005. Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative. In: Chemistry y Biology of Heparin y Heparan Sulfate. Amsterdam: Elsevier 461-481). Esta acción química en la heparina, modificando los restos de ácido glucurónico dentro del sitio de unión de ATIII reduce o elimina la actividad anticoagulante, haciendo posible su uso a altas dosis.

En la patente internacional WO 92/17188 se divulga la actividad anti-proliferativa con respecto a células del músculo liso de una especie no anti-coagulante de heparina. Dicha heparina se prepara por N-desacetilación de unidades de N-acetil glucosamina, que constituyen un componente menor de las cadenas de heparina natural con un agente que contiene hidracina, seguido de oxidación de peryodato de dioles o grupos OH/NH₂ adyacentes en los aldehídos correspondientes. La oxidación va seguida de la reducción de aldehídos en alcoholes, sin una fragmentación sustancial del glicosaminoglicano. Las unidades N-sulfatadas no se ven afectadas por la oxidación-reducción.

Las heparinas N-desulfatadas (Chemical Abstract Registry number 53260-52-9), conocidas también como "heparamina" en el Merck Index (14ª Edición, 2006) son conocidas por estar dotadas de varios efectos: una menor actividad anticoagulante, cierta actividad contra metástasis de cáncer gástrico en ratones, inhibiendo la expresión de VEGF y angiogénesis (Chen-J-L et al. 2007, World J. Gastroenterol 21, 457-461) y prevención de daño hepático/renal inducido por isquemia y reperfusión (Chen-J-L et al. 2002, World J. Gastroenterol 8, 897-900). Las

heparinas N-desulfatadas son también conocidas como productos intermedios para la síntesis de varias heparinas N-aciladas. El grado de N-desulfatación puede oscilar entre 10 % y hasta 100 % de restos de glucosamina N-sulfatada presente en heparinas (Huang L. y Kerns RJ. 2006, Bioorg. Med Chem, 14,2300-2313).

5 La patente internacional WO 01/55221 divulga glicosaminoglicanos con un grado de 2-O-desulfatación no superior a 60 % del total de unidades de ácido urónico. Dichos glicosaminoglicanos están desprovistos de actividad anticoagulante y presentan actividad anti-angiogénica sobre la base de la inhibición de FGF. No se prevé actividad para la inhibición heparanasa.

10 La patente estadounidense US 2008/0051567 divulga un compuesto que corresponde a heparina 100 % N-acetilada y 25 % de heparina de división de glicol, que ejerce una escasa actividad anticoagulante, o ninguna y una baja liberación de factores de crecimiento desde la matriz extracelular, al mismo tiempo que inhibe heparanasa, crecimiento de tumor, angiogénesis e inflamación en modelos de animales experimentales, incluyendo modelo de Sanderson de mieloma.

15 No obstante, sigue existiendo la necesidad de proporcionar compuestos mejorados con una mayor actividad de inhibición de heparanasa, una selectividad mayor, una mejor biodisponibilidad y eficacia para el tratamiento de patologías relacionadas con heparanasa, como mieloma y otros tumores.

20 Breve descripción de las figuras

Figura 1: estructuras dominantes generadas por la oxidación de peryodato y reducción con borohidruro de un glicosaminoglicano.

25 (1) Unidad disacárida de un polímero glicosaminoglicano que comprende un ácido urónico (idurónico y/o glucurónico) y una glucosamina (2-N-acetilada, sin sustituir en 2-N y/o 2-N-sulfatada), en la que el grupo hidroxilo (R₄) puede estar sustituido por un grupo sulfato o estar sin sustituir. Tras la N-desulfatación, los polímeros de glicosaminoglicano pueden comprender unidades disacáridas que comprenden glucosaminas 2-N-acetiladas (2) y 2-NH₂ glucosaminas (naturales y/o N-desulfatadas) (3). La oxidación con peryodato y reducción con borohidruro llevan a la conversión de dioles adyacentes de restos de ácido urónico 2-O-no sulfatados (5, 6, 8) y grupos OH/NH₂ adyacentes de glucosamina 2-N- y 3-O-no sulfatada (7,8) en los aldehídos correspondientes (por oxidación) y después en los correspondientes alcoholes (por reducción). Debe advertirse que en las unidades disacárido que contienen glucosamina N-desulfatada y ácido urónico 2-O no sulfatado, ambos restos se convierten en dialdehídos y después en restos de división de glicol (8).

35 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a nuevos glicosaminoglicanos químicamente modificados, en particular heparina y HBPM, que inhiben fuertemente la heparanasa y su actividad de degradación de heparán sulfato.

40 Los nuevos compuestos de la presente invención, dotados de actividad inhibidora de heparanasa, son derivados de glicosaminoglicanos N-desulfatados y, opcionalmente, 2-O-desulfatados, en los que al menos parte de los dioles adyacentes y OH/NH₂ han sido convertidos al correspondiente aldehído, reduciéndose después dichos aldehídos al correspondiente alcohol. La conversión a aldehídos se lleva a cabo preferentemente empleando peryodato, en condiciones adecuadas para romper tanto la unión de dioles adyacentes de restos de ácido urónico como la unión C₂-C₃ de glucosamina, que llevan los sustituyentes amina e hidroxilo respectivamente. Los compuestos de partida pueden contener también naturalmente restos de ácido urónico 2-O-no-sulfatados. En particular, la N-desulfatación tiene lugar en los restos de glucosamina N-sulfatados, mientras que la O-desulfatación se produce en los restos de ácido urónico 2-O-sulfatados.

50 Preferentemente, los derivados de glicosaminoglicano de la presente invención se originan a partir de glicosaminoglicanos naturales o sintéticos, preparándose éstos últimos química o enzimáticamente (Naggi A. et al., 2001, "Toward a biotechnological heparin through combined chemical y enzymatic modification of the Escherichia coli K5 polysaccharide. "Seminars in thrombosis and hemostasis, 27, 5437), como por ejemplo heparinas no fraccionadas, heparinas de bajo peso molecular (HBPM), heparán sulfatos o fracciones de los mismos; más preferentemente, los derivados de glicosaminoglicano se derivan de heparinas naturales o sintéticas de HBPM.

60 La N-desulfatación específica de restos de glucosamina N-sulfatados hace sustancialmente que dichos residuos sean susceptibles de conversión en los aldehídos correspondientes (y después en los alcoholes correspondientes), siempre y cuando estos restos están también 3-O-no-sulfatados. En la Figura 1, se muestran en una vista esquemática todas las unidades disacáridas que pueden estar presentes en una cadena de glicosaminoglicano y su cambio tras la N-desulfatación, oxidación y reacción de reducción.

65 A modo de ejemplo, las cadenas de heparina pueden comprender de forma natural entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 35 % de restos de ácido urónico 2-O-no sulfatados, entre 0 % y 50 % de restos glucosamina N-acetilados y entre aproximadamente 0 % y 6 % de restos de glucosamina sin sustituir en N (ni N-sulfatados ni N-acetilados). Las diferentes composiciones dependen de la fuente de heparina (la fuente de órgano, especie animal) y

de los procedimientos de extracción.

Cada resto no sulfatado, tanto en el carbono 2 como en el carbono 3, de un glicosaminoglicano es susceptible de conversión en aldehído. En consecuencia, la N-desulfatación extensiva comprendida en el proceso de la presente invención proporciona otros residuos más susceptibles de dicha conversión con respecto al porcentaje de unidades susceptibles en glicosaminoglicanos naturales, aumentando el porcentaje de unidades en las que OH/NH₂ adyacentes se convierten en los aldehídos correspondientes (y después en los alcoholes correspondientes), preservando sin embargo el contenido natural de restos de ácido idurónico 2-O-sulfatados. Opcionalmente, la 2-O-desulfatación de glicosaminoglicanos inducida químicamente permite modular la relación entre glucosamina y ácido urónico susceptible de oxidación y reacciones de reducción de acuerdo con la presente invención.

La invención se refiere además a dichos derivados de glicosaminoglicano N-desulfatados y, opcionalmente, 2-O-desulfatados, en los que los dioles y OH/NH₂ adyacentes han sido convertidos en el aldehído correspondiente, con apertura del anillo, reduciéndose después dichos aldehídos en el alcohol correspondiente. La invención se refiere además a un proceso para la preparación de dichos derivados de glicosaminoglicano y también a su uso como principios activos de medicamentos para el tratamiento de patologías como mieloma múltiple y otros cánceres, incluyendo sus formas metastásicas. Asimismo, la invención se refiere al uso de dichos derivados de glicosaminoglicano en cualquier indicación terapéutica que se beneficie de la inhibición de heparanasa. La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados de glicosaminoglicano N-desulfatados y, opcionalmente, 2-O-desulfatados, en los que se han convertido dioles y OH/NH₂ adyacentes en el aldehído correspondiente, con apertura del anillo, reduciéndose después dichos aldehídos al correspondiente alcohol.

Los derivados de glicosaminoglicano N-desulfatados y, opcionalmente 2-O-desulfatados de la presente invención se pueden obtener a través de un proceso que comprende:

a) N-desulfatación de 25 a 100 %, preferentemente de 30 % a 90 %, más preferentemente de 45 % a 80 % de restos de glucosamina N-sulfatados de un glicosaminoglicano; opcionalmente, el proceso comprende además 2-O-desulfatación de hasta 50 %, preferentemente hasta 25 %, de restos 2-O sulfatados de un glicosaminoglicano; el producto obtenido comprende preferentemente de 0 % a 50 % de restos de glucosamina N-acetilados, de 50 % a 100 % de restos de glucosamina N-no-sulfatados;

b) conversión en los aldehídos correspondientes, preferentemente por oxidación de peryodato de OH/NH₂ adyacente de restos de glucosamina 2N, 3-O-no sulfatados y de dioles adyacentes de restos de ácido urónico 2-O-no-sulfatados (desulfatados químicamente, así como los no-sulfatados presentes naturalmente a lo largo de la cadena original); los restos glucosamina 2N-, 3-O-no sulfatados pueden estar presentes entre un 25 % y un 100 %.

c) la reducción de dichos aldehídos, preferentemente con borohidruro sódico, en los alcoholes correspondientes.

Opcionalmente, el proceso comprende además la desacetilación parcial o total de restos N-acetilados del glicosaminoglicano.

En realizaciones preferentes, los derivados de glicosaminoglicano de la presente invención se obtienen a partir de glicosaminoglicanos naturales o sintéticos (preparados químicamente o enzimáticamente), preferentemente, de heparinas no fraccionadas, HBPM, heparán sulfato o derivados de los mismos. Más preferentemente, los derivados de glicosaminoglicano de la presente invención se obtienen de heparinas o HBPM.

En una realización preferente, la oxidación, preferentemente oxidación con peryodato, se lleva a cabo en condiciones para escindir tanto los dioles adyacentes de ácidos urónicos como el enlace entre C₂ y C₃ de glucosamina, que llevan sustituyentes amino e hidroxilo, respectivamente.

En una realización preferente, las muestras de glicosaminoglicano modificadas, preferentemente la heparina o HBPM modificadas, dotadas de diferentes grados de N-desulfatación se someten a oxidación con peryodato y reducción con borohidruro sódico en un medio acuoso, llevándose a cabo por modificación de métodos conocidos. La oxidación de peryodato puede realizarse en presencia de NTA (ácido nitriloacético), utilizarse un agente quelante y secuestrante para reducir la despolimerización, en presencia de NaHCO₃ o piridina para alcalinizar la solución, o en presencia de MnCl₂ con o sin NTA. Preferentemente, la oxidación de peryodato se lleva a cabo en presencia de NTA. Preferentemente, la oxidación se lleva a cabo a un pH comprendido entre 5,5 y 10,0, más preferentemente, comprendido entre 6,0 y 9,0 de dicho glicosaminoglicano.

La presente invención se refiere además a un proceso para romper la unión C₂-C₃ de restos de glucosamina de glicosaminoglicano que comprende: oxidación, preferentemente con peryodato, a un pH comprendido entre 5,5 y 10, más preferentemente entre 6,0 y 9,0, de dicho glicosaminoglicano.

Preferentemente, los restos de glucosamina en los que se han convertido OH/NH₂ adyacente en el correspondiente

aldehído, reduciéndose después los aldehídos a los alcoholes correspondientes, constituyen de 25 % a 100 %, más preferentemente de 50 % a 100 %, siendo sobre todo preferente de 60 % a 90 %, de los restos de glucosamina del glicosaminoglicano.

5 Los compuestos derivados de glicosaminoglicano que se pueden obtener a través del proceso mencionado tienen preferentemente un peso molecular comprendido entre 800 y 30.000 Da, dependiendo de las condiciones del proceso y del glicosaminoglicano de partida. Cuando se emplea heparina no fraccionada como material de partida, los compuestos derivados de glicosaminoglicano que se pueden obtener a través del proceso mencionado, tienen preferentemente un peso molecular de 3.000 a 20.000 Da, preferentemente de 4.000 a 12.000 Da.

10 Se ha demostrado de manera inesperada que los nuevos derivados de glicosaminoglicano de la presente invención son fuertes inhibidores de heparanasa *in vitro* y que inhiben mieloma en modelos de animales.

15 Los productos con el mayor número de unidades, en los que se han convertido los dioles y OH/NH₂ adyacentes en los aldehídos correspondientes, reduciéndose los aldehídos después en los correspondientes alcoholes, también están menos sulfatados con respecto a los glicosaminoglicanos naturales y sus derivados RO. Por lo tanto, es de esperar que presenten menos interacciones de proteína y una farmacocinética más favorable que sus análogos con un menor contenido de restos modificados.

20 La presente invención se refiere además a compuestos que se pueden obtener a través de los procesos antes descritos para su uso como medicamentos.

En particular, la presente invención se refiere a compuestos que se pueden obtener a través de los procesos que se han descrito para su uso como agentes anti-metastásicos, como anti-tumor, preferentemente como anti-mieloma.

25 Se ha demostrado que la heparina y los derivados de heparina de bajo peso molecular preparados de acuerdo con la presente invención, a pesar de su bajo grado de sulfatación, inhiben eficazmente la actividad de heparanasa, tanto *in vitro* como *in vivo*, en varios modelos experimentales de mieloma.

30 Asimismo, se ha demostrado que los derivados de la presente invención, incluso con pesos moleculares bajos (véase los ejemplos 5, 6 y 8), tienen una actividad inhibitora de heparanasa superior a las de las heparinas RO obtenidas a partir de heparinas 2-O-desulfatadas de peso molecular similar. Éstas últimas de muestran en la Tabla 1.

35

TABLA 1

Muestra	% de ácidos urónicos de división de glicol	Promedio peso molecular, Pm (kDa)	Inhibición heparanasa IC ₅₀ (ng/ml)
Heparina RO 1	28	17	8
Heparina RO 2	26	10	50
Heparina RO 3	23	7	500
Heparina RO 4	23	5	750

Los datos muestran una tendencia general a reducir la actividad inhibitora de heparanasa al reducirse el peso molecular de la heparina de división de glicol de tipo RO.

40 Ejemplos

Preparación de compuestos

45 Se llevó a cabo la N-desulfatación de heparina no fraccionada (en adelante HNF) divulgada en los siguientes ejemplos por modificación de métodos conocidos (Inoue Y y Nagasawa K 1976. "Selective N-desulfatación of heparin con dimethyl sulfoxide containing water or methanol." Carbohydr Res 46 (1) 87-95). Se determinó el grado de N-desulfatación por ¹³C-RMN (Naggi A., et al. 2001, "Generation of anti-factor Xa active, 3-O-sulfated glucosamine-rich sequences by controlled desulfatación of oversulfated heparins." Carbohydr. Res. 336, 4, 283-290).

50 Se sometieron muestras de heparinas modificadas, dotadas de diferentes grados de N-desulfatación, a oxidación de peryodato para dar unidades de división con dos grupos aldehído y reducción con borohidruro sódico (NaBH₄) en un medio acuoso para dar derivados de heparina finales; se realizaron ambas reacciones por modificación de métodos conocidos. Se llevó a cabo la oxidación de peryodato, preferentemente, en presencia de NaHCO₃, piridina, MnCl₂ o MnCl₂ con NTA. Se llevó a cabo la 2-O-desulfatación gradual de HNF siguiendo la modificación de métodos conocidos (Jaseja M. et al. 1989 "Novel regio- and stereo-selective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence." Canad J Chem, 67, 1449-1455; R. N. Rej Arthur S. Perlin 1990 "Base-catalyzed conversion of the α-L-iduronic acid 2-sulfate unit of heparin into a unit of α-L-galacturonic acid, y related reactions." Carbohydr. Res. 200, 25, 437-447; Casu B. et al. 2004 "Undersulfated y Glycol-Split Heparins

Endowed con Antiangiogenic Activity." J. Med. Chem., 47, 838-848). En adelante "RO" indica el % de restos de división de glicol en los que se han convertido dioles y OH/NH₂ adyacentes en el aldehído correspondiente y a continuación en los alcoholes correspondientes, con respecto al total de restos de glicosaminoglicano.

5 Ensayo *in vitro*

Sobre la base de los estudios anteriores de Bisio et al. (Bisio A. et al. 2007 "High-performance liquid chromatographic/mass spectrometric studies on the susceptibility of heparin specie to cleavage by heparanase." Sem Thromb hemost 33 488-495), el grupo del Prof. Vlodavsky en la Universidad de Haifa, Israel determinó la actividad de inhibición de heparanasa *in vitro* de acuerdo con el método descrito por Hammond et al. (Hammond et al. 2010 "Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening." Anal Biochem. 396, 112-6). Brevemente, heparanasa puede escindir el pentasacárido sintético Fondaparinux, que es un fármaco anti-trombótico, que corresponde estructuralmente a sitio de unión anti-trombina de la heparina. Tras la hidrólisis mediante heparanasa, se obtienen un trisacárido y un disacárido de reducción. Éste último puede cuantificarse fácilmente para valorar la actividad de heparanasa. En los ejemplos de la presente invención, la solución de ensayo comprende (100 µl) tampón de acetato sódico 40 mM pH 5,0 y 100 mM Fondaparinux (GlaxoSmithKline), con o sin muestra de inhibidor. Se añade heparanasa a una concentración final de 140 pM al comenzar el ensayo. Se sellan las placas con una cinta adhesiva y se incuban a 37 °C durante 2-24 horas. Se detiene el ensayo por adición de 100 µl de una solución de disulfonato de 4-[3-(4-yodofenil)-1H-5 tetrazolio]-1,3-benzeno 1,69 mM (WST-1, Aspep, Melbourne, Australia) en NaOH 0,1M. Se volvieron a sellar las placas con cinta adhesiva y se revelaron a 60 °C durante 60 minutos. Se midió la absorbancia a 584 nm (Fluostar, BMG, Labtech). En cada placa, se preparó una curva normal construida con D-galactosa como patrón de azúcar reductor en el mismo tampón y volumen con respecto al intervalo de concentración de 2 a 100 µM. Se determinó el valor IC₅₀. Se validaron los resultados obtenidos aplicando el ensayo colimétrico mencionado utilizando diferentes ensayos en los que se emplea una matriz extracelular (MEC) marcada con un sulfato radioactivo como sustrato. Brevemente, se deposita el sustrato MEC mediante células endoteliales de la córnea cultivadas y así se asemeja íntimamente con la membrana del basamento subendotelial en su composición, función biológica y propiedades de barrera. Se puede encontrar información detallada sobre la preparación de MEC marcada con sulfato y su uso para ensayos de heparanasa en Vlodavsky, I., Current Protocols in Cell Biology, capítulo 10: Unidad 10.4, 2001.

30 Ensayo *in vivo*

Se determinó la actividad antimieloma *in vivo* siguiendo sustancialmente el procedimiento descrito en Yang Y et al. (Yang Y., et al. 2007. "The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy." Blood 110: 2041-2048). Brevemente, se obtuvieron ratones CB17 scid/scid de 5 a 6 semanas de vida de Arlan (Indianapolis, IN) o Charles River Laboratories (Estados Unidos). Se alojó a los ratones y se llevó un seguimiento de ellos en las instalaciones para animales de la Universidad de Alabama en Birmingham. Todos los procedimientos y protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Se inyectaron 1 x 10⁶ células de mieloma CAG que expresan heparanasa (de baja y alta expresión) subcutáneamente en el lomo izquierdo de cada uno de los ratones. 10 días después de la inyección de las células de tumor, se implantó a los ratones bombas osmóticas Alzet (Durect Corporation Cupertino, CA) en el lomo derecho. Las bombas contenían o bien solución de los compuestos de ensayo (nuevos derivados de heparina) o bien tampón fosfato (PBS) como control. Se administró la solución de manera continua durante 14 días. Transcurridos 14 días, se sacrificó a los animales y se determinó el peso en húmedo de los tumores subcutáneos y el nivel de kappa en suero medio y se compararon entre los grupos experimentales por pruebas de rango logarítmico (p<0,05 se consideró estadísticamente significativo).

La imagen de bioluminiscencia con luciferasa semanalmente proporciona datos cuantitativos sobre tumores primarios y rastrea la metástasis dentro del hueso, así como en los tejidos blandos. Sobre todo, el modelo SCID-hu es único en el sentido de que se inyectan células de tumor humanas directamente en pequeñas piezas de hueso fetal humano implantadas subcutáneamente en ratones SCID, recapitulando así íntimamente el mieloma humano.

Procedimiento general de análisis RMN

55 Se registraron los espectros a 25 °C en un espectrómetro Bruker Avance 500 (Karlsruhe, Alemania) equipado con una criosonda TLC de 5 mm o con una sonda BBO de 10 mm. Se realizó la integración del área pico o volúmenes en el espectro utilizando un software Bruker TopSpin 2.0 normal.

N-DESULFATACIÓN DE HEPARINA NO FRACCIONADA

60 EJEMPLO 1 (G8220)

Se disolvió HNF (4,01 g, lote G3378) en agua (32 ml) y se trató con agitación con Amberlite IR 120 (H+, 144 ml). Se llevó la solución ácida filtrada a un pH 7 con piridina, a continuación, se concentró a sequedad a presión reducida. Se disolvió la sal de piridinio resultante en 40 ml de una mezcla de DMSO:H₂O (95: 5 en volumen), a continuación, se agitó a 25 °C durante 48 horas. Tras la dilución con 40 ml de agua, se dializó la solución a 4 °C durante 16 horas

contra agua destilada en membrana (límite: 3.500 Da). La concentración a presión reducida y la liofilización dio: G8220 (2,7 g), rendimiento = 67 % p/p, Pm= 19.100 Da, grado de N-desulfatación determinado por ^{13}C -RMN = 74,7 % del total de restos de glucosamina, ácido urónico 2-O sulfatados determinado por ^{13}C -RMN = 18 % del total de monosacáridos.

5

EJEMPLO 2 (G8343)

10 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se convirtió una muestra de HNF (0,25 g, lote G3378) en la correspondiente sal piridinio, que fue N-desulfatada en una mezcla de DMSO: MeOH (95: 5 en volumen). Al cabo de 2 horas con agitación a 25 °C, se trató la mezcla de reacción siguiendo el mismo procedimiento final que el descrito en Ejemplo 1, para dar G8343 (0,172 g), rendimiento = 69 % p/p, Pm= 18.000 Da, grado de N-desulfatación determinado por ^{13}C -RMN= 63,3 % del total de restos de glucosamina, ácido urónico 2-O-sulfatados determinado por ^{13}C -RMN= 19 % del total de monosacáridos.

15 EJEMPLO 3 (G8516)

Partiendo de una muestra de HNF (0,25 g, lote G3378) y siguiendo el procedimiento descrito en Ejemplo 2, pero reduciendo el tiempo de reacción de N-desulfatación a 40 minutos, se obtuvo G8516 (0,17 g), rendimiento = 68 %, grado de N-desulfatación por ^{13}C -RMN= 49,7 % del total de restos de glucosamina, ácido urónico 2-O-sulfatados determinado por ^{13}C -RMN= 17 % del total de monosacáridos.

20

EJEMPLO 4 (G8147)

25 Se disolvió en agua (20 ml) HNF (2,5 g, lote G3378) y se trató con agitación con Amberlite IR 120 (H+, 90 ml). Se llevó a un pH 7 la solución ácida filtrada con piridina, a continuación se concentró a sequedad a presión reducida. Se disolvió la sal piridinio resultante en 25 ml de una mezcla de DMSO: MeOH (90: 10 en volumen), a continuación se agitó a 25 °C durante 18 horas. Tras la dilución con 25 ml de agua, se dializó la solución a 4 °C durante 16 horas contra agua destilada en membrana (límite: 3,500 Da). La concentración a presión reducida y la liofilización dieron: G8147 (1,9 g), rendimiento = 76 % p/p, Pm= 18.200 Da, grado de N-desulfatación por ^{13}C -RMN = 60 % del total de restos de glucosamina.

30

EJEMPLO 5 (G9416)

35 Se disolvió en agua (40 ml) HNF (5 g, lote G3378) y se trató con agitación con Amberlite IR 120 (H+, 90 ml). Se llevó a un pH 7 la solución ácida filtrada con piridina, a continuación, se concentró a sequedad a presión reducida. Se disolvió la sal piridinio resultante en 100 ml de una mezcla de DMSO: MeOH (95: 5 en volumen), a continuación, se agitó a 25 °C durante 18 horas. Tras la dilución con 100 ml de agua, se dializó la solución a 4 °C durante 16 horas contra agua destilada en membrana (límite: 3,500 Da). La concentración a presión reducida y la liofilización dieron: G9416 (3,65 g), rendimiento = 73 % p/p, Pm= 18.800 Da, Grado de N-desulfatación por ^{13}C -RMN= 77 % del total de restos de glucosamina.

40

EJEMPLO 6 (G8079)

45 Se disolvió en agua (8 ml) HNF (1 g, lote G3378) y se trató con agitación con Amberlite IR 120 (H+, 90 ml) durante 30 minutos. Se llevó a un pH 7 la solución ácida filtrada con piridina, a continuación, se concentró a sequedad a presión reducida. Se disolvió la sal piridinio resultante en 10 ml de una mezcla de DMSO: MeOH (95: 5 en volumen), a continuación se agitó a 25 °C durante 16 horas. Tras la dilución con 10 ml de agua, se dializó la solución a 4 °C durante 3 días contra agua destilada en membrana (límite: 3,500 Da). La concentración a presión reducida y la liofilización dieron: G8079 (1 g), rendimiento = 100 % p/p, grado de N-desulfatación por ^{13}C -RMN = 60 % del total de restos de glucosamina.

50

OXIDACIÓN CON PERYODATO Y REDUCCIÓN CON BOROHI DRURO SÓDICO DE HEPARINAS N-DESULFATADAS

55 EJEMPLO 7 (G8340)

Se añadió una muestra de G8220 del ejemplo 1 (0,25 g, 74,7 % de restos de heparina N-desulfatados), disuelta en agua (7,3 ml) y enfiada a 4 °C, a un volumen equivalente de NaIO_4 0,2 M. Se ajustó el valor de pH a 6,8 con NaHCO_3 2 M (aproximadamente 2,1 ml) y, con agitación en oscuridad a 4 °C, se añadió ácido nitrilotriacético 0,08 M (NTA, 10 ml) a la solución. Se llevó el valor de pH de 4,0 a 6,6 por adición de NaHCO_3 2 M y se mantuvo la mezcla de reacción con agitación a 4 °C durante 8 horas. Se apagó el exceso de peryodato por adición de etilen glicol (0,73 ml); al cabo de 1 hora, se desaló la mezcla de reacción por diálisis contra agua destilada en membrana (límite: 3,500 Da) a 4 °C durante 16 horas. Se trató la solución desalada con NaBH_4 (0,164 g, 3,4 mmoles), se agitó durante 3 horas a 25 °C, a continuación, se llevó el valor de pH a 4 con HCl 1 N para apagar el exceso de NaBH_4 y después de agitar 10 minutos, se neutralizó con NaOH 0,1 N. Tras la diálisis contra agua destilada a 4 °C durante 16 horas en membrana (límite: 3,500 Da), la concentración a presión reducida y la liofilización, se obtuvieron 0,202 g de G8340,

65

rendimiento = 90 % p/p, Pm =8.400 Da. Se determinaron los porcentajes, con respecto al total de restos de monosacárido, de RO (53 %), IdoA2S (35 %), GlcNAc (9 %) y GlcNH₂ (12 %) por ¹³C-RMN.

Inhibición de heparanasa *in vitro*: IC₅₀ = 20 ng/ml.

5 Actividad anti-mieloma *in vivo*: 60 mg/Kg/día durante 14 días: 75 % inhibición de tumor y 60 % inhibición K en suero.

EJEMPLO 8 (G8438)

10 Partiendo de G8343 el Ejemplo 2 (0,171 g de 63,3 % de restos de heparina N-desulfatados) y siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 7, se obtuvo G8438 (91,4 mg), rendimiento = 82 %, Pm= 6.800 Da. Se determinaron los porcentajes de RO (38 %), IdoA2S (32 %), GlcNAc (8 %), GlcNH₂ (4 %) por ¹³C-RMN.

Inhibición de heparanasa *in vitro* IC₅₀: 60 ng/ml.

EJEMPLO 9 (G8588)

20 Partiendo de G8516 del Ejemplo 3 (0,171 g de 44 % de restos de heparina N-desulfatados) y siguiendo el procedimiento descrito en Ejemplo 7, se obtuvo G8588 (0.136 g), rendimiento = 80 %, Pm= 11.000 Da. Se determinaron los porcentajes de GlcNAc (30 %), GlcNH₂ (13 %), IdoA2S (34 %) RO (37 %) por ¹³C-RMN.

EJEMPLO 10 (G9578)

25 Partiendo de G9416 del ejemplo 5, siguiendo el procedimiento descrito en Ejemplo 7, se obtuvo G9578, rendimiento = 89 %, Pm = 6.300 Da, Grado de N-desulfatación por ¹³C-RMN= 48 % del total de restos de glucosamina. Se determinaron los porcentajes de RO (45 %) e IdoA2S (35 %) con respecto al total de restos de glicosaminoglicano por ¹³C-RMN. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* del producto de la invención produjeron los siguientes resultados:

Inhibición de heparanasa *in vitro*: IC₅₀ =75 ng/ml;

30 Actividad antimieloma *in vivo* (60 mg/kg día durante 14 días): 63 % de inhibición de tumor.

EJEMPLO 11 (G8188)

35 Se añadió una muestra de heparina N-desulfatada G8147 del ejemplo 4 (0,25 g, 60 % restos de heparina N-desulfatados), disuelta en agua (7,3 ml) y enfriada a 4 °C a un volumen equivalente de NaIO₄ 0,2 M. Se ajustó el valor de pH a 6,8 con NaHCO₃ 2 M (aproximadamente 2,1 ml) con agitación, en la oscuridad a 4 °C durante 16 horas. Se apagó el exceso de peryodato por adición de etilen glicol (0,73 ml) y, al cabo de 1 hora, se desaló la mezcla de reacción por diálisis contra agua destilada en membrana (límite: 3.500 Da) a 4 °C durante 16 horas. Se trató la solución desalada con NaBH₄ (0,164 g, 3,4 mmoles), se agitó durante 3 horas a 25 °C, a continuación, se llevó su valor de pH a 4 con HCl 1 N para apagar el exceso de NaBH₄ y, después de 10 minutos de agitación, se neutralizó con NaOH 0,1 N. Tras la diálisis contra agua destilada a 4 °C durante 16 horas en membrana (límite: 3.500 Da), concentración a presión reducida y liofilización, se obtuvieron 0,168 g de G8188, rendimiento = 67 % p/p, Pm = 3.460 Da. Se determinaron los porcentajes de RO (43 %), IdoA2S (40 %), GlcNAc (6 %) y GlcNH₂ (4 %) por ¹³C-RMN.

EJEMPLO 12 (G8189)

50 Se añadió una muestra de G8147 (0,25 g, 60 % de restos de heparina N-desulfatados), disuelta en agua (7,3 ml) y enfriada a 4 °C, a un volumen igual de NaIO₄ 0,2 M. Se ajustó el valor pH a 6,8 con piridina (5 % v/v, aproximadamente 730 µl), con agitación en la oscuridad a 4 °C durante 16 horas. Se apagó el exceso de peryodato por adición de etilen glicol (0,73 ml) y al cabo de 1 hora, se desaló la mezcla de reacción por diálisis contra agua destilada en membrana (límite: 3.500 Da) a 4 °C durante 16 horas. Se trató la solución desalada con NaBH₄ (0,164 g, 3,4 mmoles), se agitó durante 3 horas a 25 °C, a continuación, se llevó su valor pH a 4 con HCl 1 N para apagar el exceso de NaBH₄ y al cabo de 10 minutos de agitación, se neutralizó con NaOH 0,1 N. Después de la diálisis contra agua destilada a 4 °C durante 16 horas en membrana (límite: 3.500 Da), concentración a presión reducida y liofilización, se obtuvieron 0,181 g de G8189, rendimiento = 72 % p/p, Pm = 5.150 Da. Se determinaron los porcentajes de RO (49 %), IdoA2S (39 %), GlcNAc (7 %) y GlcNH₂ (7 %) por ¹³C-RMN.

EJEMPLO 13 (G8217)

60 Se añadió una muestra de G8147 (0,25 g, 60 % de restos de heparina N-desulfatados), disuelta en agua (7,3 ml) y se enfrió a 4 °C, a un volumen equivalente de NaIO₄ 0,2 M. Se ajustó el valor de pH a 6,8 con NaHCO₃ 2 M (aproximadamente 2,1 ml) y se añadieron 30 ml de MnCl₂ 0,05 M (la concentración final en la solución fue 0.0000 1 M) con agitación en la oscuridad a 4 °C durante 16 horas. Se apagó el exceso de peryodato añadiendo etilen glicol (0,73 ml). Durante la noche, la muestra precipitó ya que el pH llegó a 8, después se llevó el valor de pH a

6 con HCl 1 N. Al cabo de 1 hora, se desaló la mezcla de reacción por diálisis contra agua destilada en membrana (LÍMITE: 3.500 Da) a 4 °C durante 16 horas. Se trató la solución desalada con NaBH₄ (0,164 g, 3,4 mmoles), se agitó durante 3 horas a 25°C, a continuación, se llevó su valor pH a 4 con HCl 1 N para apagar el exceso de NaBH₄ y después de 10 minutos de agitación, se neutralizó con NaOH 0,1 N. Después de la diálisis contra agua destilada a 4 °C durante 16 horas en membrana (límite: 3.500 Da), concentración a presión reducida y liofilización, se obtuvieron 0.230 g de G8217, rendimiento = 92 % p/p, Pm =7.455 Da. Se determinaron los porcentajes de RO (31 %), IdoA2S (29 %), GlcNAc (8 %) y GlcNH₂ (6 %) del total de restos glicosaminoglicano por ¹³C-RMN.

EJEMPLO 14 (G8219)

Se añadió una muestra de G8147 (0,25 g, 60 % de restos de heparina N-desulfatados), disuelta en agua (7,3 ml) y enfriada a 4 °C, a un volumen equivalente de 0,2 M NaIO₄. Se ajustó el valor pH a 6,8 con 2 M NaHCO₃ (aproximadamente 1,2 ml) y se añadieron, con agitación en la oscuridad a 4 °C, ácido nitrilotriacético 0,08 M (NTA, 10 ml) y 31 ml de MnCl₂ 0,05 M a la solución. Se llevó el valor pH de 4,0 a 6,3 añadiendo NaHCO₃ 2 M y se mantuvo con agitación la mezcla de reacción a 4 °C durante 8 horas. Se apagó el exceso de peryodato agregando etilen glicol (0,73 ml) y al cabo de 1 hora, se desaló la mezcla de reacción por diálisis contra agua destilada en membrana (límite: 3.500 Da) a 4 °C durante 16 horas. Se trató la solución dializada con NaBH₄ (0,164 g, 3,4 mmoles), se agitó durante 3 horas a 25 °C, a continuación, se llevó su pH a 4 con HCl 1 N para apagar el exceso de NaBH₄ y después de 10 minutos de agitación, se neutralizó con NaOH 0,1 N. Después de la diálisis contra agua destilada a 4 °C durante 16 horas en membrana (límite: 3.500 Da), concentración a presión reducida y liofilización, se obtuvieron 0,202 g de G8219, rendimiento = 90 % p/p, Pm = 7.330 Da. Se determinaron los porcentajes de RO (54 %), IdoA2S (36 %), GlcNAc (9 %) y GlcNH₂ (8 %) por ¹³C-RMN.

EJEMPLO COMPARATIVO 15 (G8092)

Se añadió a una muestra de G8079 (1 g, heparina N-desulfatada), disuelta en agua (29,2 ml) y enfriada a 4 °C, un volumen igual de NaIO₄ (pH₅) y se mantuvo la mezcla de reacción con agitación a 4 °C durante 8 horas. Se apagó el exceso de peryodato por adición de etilen glicol (2,9 ml) y al cabo de 1 hora se desaló la mezcla de reacción por diálisis contra agua destilada en membrana (límite: 3.500 Da) a 4 °C durante 16 horas. Se trató la solución dializada con NaBH₄ (0,657 g, 3,4 mmoles), se agitó durante 3 horas a 25 °C, a continuación, se llevó el valor de pH a 4 con HCl 1 N para apagar el exceso de NaBH₄ y, al cabo de 10 minutos de agitación, se neutralizó con NaOH 0,1 N. Tras la diálisis contra agua destilada a 4 °C durante 72 horas en membrana (límite: 3.500 Da), concentración a presión reducida y liofilización, se obtuvieron 0,643 g de G8092, rendimiento = 64 % p/p, Pm = 6.064 Da. El análisis ¹³C-RMN presenta un pico en 95 ppm de glucosamina N-desulfatada. La reacción de oxidación a un pH ácido no tiene lugar.

La presente invención comprende además los aspectos definidos en las siguientes cláusulas (que forman parte de la presente descripción pero no se consideran reclamaciones de acuerdo con la decisión J 15/88 de la Junta Legal de Apelaciones de la Oficina Europea de Patentes):

Cláusulas

1. Proceso para la preparación de un derivado de glicosaminoglicano que inhibe heparinasa, que comprende:

- a) N-desulfatación del 25 al 100 % de los restos N-sulfatados de un glicosaminoglicano;
- b) oxidación, preferentemente con peryodato, a un pH de 5,5 a 10,0, del 25 % al 100 % de los restos de glucosamina 2-N-, 3-O-no sulfatados y de los restos de ácido urónico 2-O-no-sulfatados de dicho glicosaminoglicano, en condiciones eficaces para convertir dioles adyacentes y OH/NH₂ adyacentes en aldehídos;
- c) reducción, preferentemente con borohidruro sódico de dicho glicosaminoglicano oxidado en condiciones eficaces para convertir dichos aldehídos en alcoholes.

2. El proceso de la cláusula 1, que comprende además:

d) 2-O-desulfatación de hasta el 50 %, preferentemente hasta el 25 %, de los restos 2-O-sulfatados del glicosaminoglicano, antes o después de la N-desulfatación.

3. El proceso de cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende además:

e) la desacetilación parcial o total de restos N-acetilados del glicosaminoglicano, antes o después de la N-desulfatación.

4. El proceso de cualquiera de las cláusulas anteriores en el que el glicosaminoglicano es un glicosaminoglicano natural o sintético, preferentemente, en donde el glicosaminoglicano natural o sintético es heparina, heparina de bajo peso molecular, heparán sulfato o fracciones de los mismos, más preferentemente, en donde el glicosaminoglicano natural o sintético es heparina no fraccionada o heparina que tiene un peso molecular de 3.500 a 8.000 Da.

5. Proceso para la escisión de la unión C₂-C₃ de los restos de glucosamina no sulfatados de un glicosaminoglicano,

que comprende:

oxidación, preferentemente, con peryodato, a un pH de 5,5 a 10,0, más preferentemente a un pH de 6,0 a 9,0, de dicho glicosaminoglicano.

5 6. Compuestos derivados de un glicosaminoglicano, que se pueden obtener a través del proceso de cualquiera de las cláusulas anteriores.

7. Los compuestos derivados de la cláusula 6, que tienen un peso molecular de 3.000 a 20.000 Da, preferentemente de 3.500 a 12.000 Da.

10 8. Compuestos oligosacáridos que se pueden obtener por despolimerización parcial enzimática o química de los compuestos derivados de un glicosaminoglicano de las cláusulas 6-7.

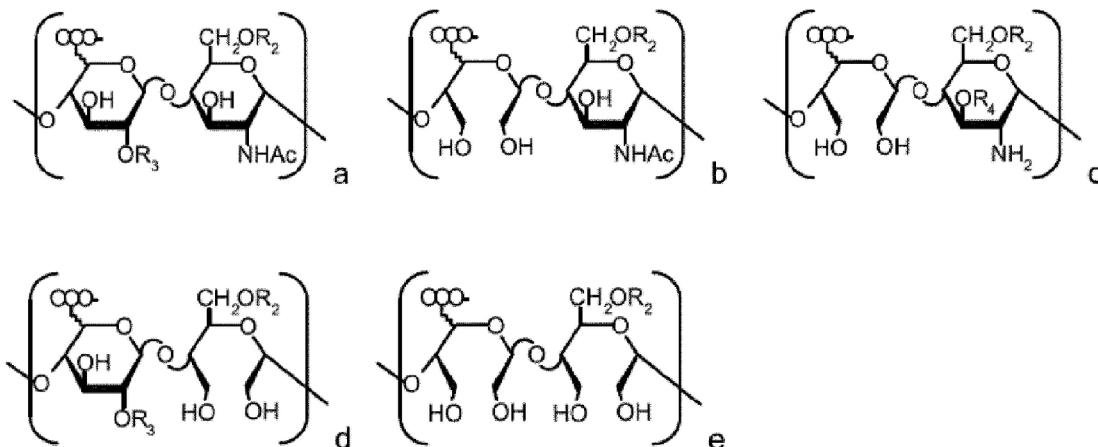
15 9. Compuestos de cualquiera de las cláusulas 6-8 para su uso como medicamentos.

10. Compuestos de la cláusula 9 para su uso como fármacos antimetastásicos, antitumorales, preferentemente para su uso como fármacos anti-mieloma.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado caracterizado por que dicho derivado comprende las siguientes estructuras:

5



en donde cada R_2 puede ser SO_3^- o H;
 en donde cada R_3 puede ser SO_3^- o H; y
 en donde cada R_4 puede ser SO_3^- o H.

10

2. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho derivado tiene un peso molecular seleccionado de entre (a) 3.000 a 20.000 Da o (b) de 3.500 a 12.000 Da.

15

3. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el glicosaminoglicano de partida a partir del cual se obtiene el derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado se selecciona entre un glicosaminoglicano natural o sintético, preferentemente en donde el glicosaminoglicano natural o sintético es heparina, heparina de bajo peso molecular, heparán sulfato o fracciones de los mismos, más preferentemente en donde el glicosaminoglicano natural o sintético es heparina sin fraccionar o heparina que tiene un peso molecular de 3.500 a 8.000 Da.

20

4. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el porcentaje, sobre el total de restos de glicosaminoglicano, de restos de división glicol (RO), en el que los dioles adyacentes y OH/NH₂ se han convertido en el aldehído correspondiente y después en los alcoholes correspondientes, está entre el 31 % y el 54 %.

25

5. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el porcentaje, sobre el total de restos de glicosaminoglicano, de ácido L-idurónico 2-O-sulfatado (IdoA2S) está entre el 29 % y el 40 %.

30

6. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el porcentaje, sobre el total de restos de glicosaminoglicano, de N-acetil D-glucosamina (GlcNAc) está entre el 6 % y el 30 %.

35

7. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el porcentaje, sobre el total de restos de glicosaminoglicano, de 2-NH₂ glucosamina (GlcNH₂) está entre el 4 % y el 13 %.

40

8. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho derivado tiene actividad inhibitoria de heparanasa.

9. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como medicamento.

10. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en la terapia de una indicación que se beneficia de la inhibición de la heparanasa.
- 5 11. Compuestos de oligosacárido obtenidos por despolimerización enzimática o química parcial del derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de las reivindicaciones 1 a 8.
12. Los compuestos de oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 10 para uso como medicamentos.
- 10 13. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado para uso de acuerdo con la reivindicación 9 o los compuestos de oligosacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dichos medicamentos son fármacos antimetastáticos o antitumorales.
- 15 14. El derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado para uso de acuerdo con la reivindicación 9 o los compuestos de oligosacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dichos medicamentos son fármacos antimielomas.
- 20 15. Composición farmacéutica que comprende el derivado de glicosaminoglicano N-desulfatado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, opcionalmente en combinación con al menos un principio activo adicional, preferentemente un compuesto terapéutico.

