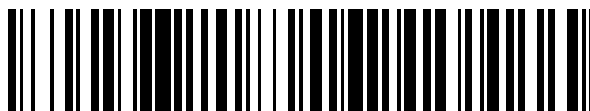


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 173**

51 Int. Cl.:

A61K 31/726 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2014** **E 19164954 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020** **EP 3520797**

54 Título: **Derivados de glicosaminoglicanos carboxilados y su uso como fármacos**

30 Prioridad:

06.11.2013 IT LO20130006

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

22.06.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TORRI, GIANGIACOMO y
NAGGI, ANNAMARIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 835 173 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 carboxilados y su uso como fármacos

5 **Sumario**

La invención se refiere a derivados de glicosaminoglicanos, dotados de actividad inhibidora de heparanasa y actividad antitumoral, que llevan grupos carboxilato en las posiciones 2 y 3 de al menos parte de los residuos de glicosaminoglicanos, y al proceso para preparar los mismos.

10 Los derivados de glicosaminoglicanos de la presente invención se generan partiendo de glicosaminoglicanos naturales o sintéticos, opcionalmente modificados químicamente o enzimáticamente. En particular, dichos derivados de glicosaminoglicanos pueden obtenerse mediante dos etapas de oxidación del glicosaminoglicano. En la primera oxidación (a), preferentemente por periodato, los dioles adyacentes y opcionalmente OH/NH₂ de los residuos de glicosaminoglicanos son convertidos a aldehídos y en la segunda oxidación (b), dichos aldehídos se convierten a grupos carboxilato. De acuerdo con la presente invención, preferentemente de 10 % a 100 %, más preferentemente de 25 % a 100 %, de los residuos no sulfatados en 2-O y opcionalmente residuos no sulfatados en 2N-, 3-O, de un glicosaminoglicano se oxidan en la primera etapa de oxidación (a), en condiciones eficaces para convertir los dioles adyacentes y opcionalmente los OH/NH₂ adyacentes a aldehídos.

20 La primera oxidación conduce preferentemente a la escisión del enlace C₂-C₃ del anillo de los residuos oxidables. Preferentemente, el glicosaminoglicano es un glicosaminoglicano natural o sintético, opcionalmente 2-O- y/o 2-N-desulfatado, que tiene un grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) de 0,8 a 2,8, preferentemente de 0,9 a 2,5. Se pretende que el grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) en la presente invención se determine mediante valoración conductimétrica de acuerdo con Casu B. y Gennaro U., 1975, *Carbohydr Res* 39, 168-176. Los derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados obtenibles por el proceso de la invención desvelado anteriormente muestran un incremento de carboxilo de 1,2 a 2,2, en el que el incremento de carboxilo se calcula como la relación entre el grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) del material de partida y el grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) del derivado di/tricarboxilado, determinado por valoración conductimétrica como se define en la presente memoria. Más específicamente, el grado de sulfatación del glicosaminoglicano de partida se determina en una muestra del producto intermedio glicosaminoglicano obtenido en la primera etapa de oxidación (a), tras la reducción por NaBH₄.

35 Preferentemente, los derivados de glicosaminoglicanos de la presente invención se obtienen partiendo de heparinas naturales procedentes de cualquier fuente animal y organismo, o de heparinas sintéticas, opcionalmente modificadas químicamente o enzimáticamente. Más preferentemente, el material de partida es heparina no fraccionada, heparinas de bajo peso molecular (HBPMs, que tienen un peso molecular de 3.500 a 8.000 Da), heparán sulfato (HS) o derivados de los mismos. Los más preferentes son los derivados de glicosaminoglicanos obtenibles a partir de heparinas no fraccionadas o de HBPMs, opcionalmente 2-O- y/o 2-N-desulfatadas.

40 La invención se refiere además a un proceso de preparación de dichos derivados de glicosaminoglicanos y además a su uso como principios activos de medicamentos, opcionalmente en combinación con fármacos o tratamientos establecidos conocidos. En particular, la presente invención se dirige a dichos derivados de glicosaminoglicanos para su uso como medicamentos para el tratamiento de condiciones patológicas, tales como mieloma múltiple y otras neoplasias (es decir, sarcomas, carcinomas, tumores hematológicos malignos), incluyendo sus formas metastásicas.

45 Además, la invención se refiere al uso de dichos derivados de glicosaminoglicanos en cualquier indicación terapéutica que se beneficia de la inhibición de la heparanasa (es decir, nefropatía diabética, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis, artritis, psoriasis, sepsis, aterosclerosis). La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados, en particular a composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de heparina di/tricarboxilada y heparina de bajo peso molecular (HBPM), como agente activo. Opcionalmente, dichas composiciones farmacéuticas comprenden además al menos un agente activo diferente, preferentemente al menos un agente antitumoral distinto.

Antecedentes

55 El mieloma múltiple es el segundo tumor hematológico maligno más frecuente y representa más del 10 % de todos los cánceres hematológicos en Estados Unidos, con aproximadamente 20.000 nuevos casos cada año y una mortalidad superior al 50 % (Graham-Rowe D., 2011, *Multiple myeloma outlook. Nature* 480, s34-s35).

60 En los últimos años, se han desarrollado terapias prometedoras, tales como la administración de un inhibidor del proteasoma (Velcade), bifosfonatos y talidomida, entre otros. La eficacia de estos agentes es, al menos, en parte, debido a su impacto en el microambiente tumoral en el mieloma.

65 Si bien la eficacia de dichos agentes contra el mieloma se ha demostrado, sigue existiendo la necesidad de nuevos y mejores fármacos para el tratamiento del mieloma y otros tumores.

La heparanasa es una endo-p-glucuronidasa que escinde heparán sulfato (HS) de HS-proteoglicanos, tales como sindecán-1, liberando de esta manera los factores de crecimiento unidos a HS.

En los seres humanos, parece que existe una única enzima heparanasa funcional dominante capaz de escindir HS. La heparanasa se expresa en la mayoría de los tumores humanos, en los que aumenta significativamente tanto el potencial angiogénico como metastásico de las células tumorales. Los niveles elevados de heparanasa han sido, de hecho, correlacionados con la progresión y metástasis avanzada de numerosos tipos de tumores. Por ejemplo, el alto nivel de la heparanasa se asocia con un tiempo de supervivencia post-operatorio más corto de los pacientes. Un papel directo de la heparanasa en la metástasis tumoral se ha demostrado en el laboratorio de Sanderson y de Vlodaysky, en donde se han sometido a ensayo nuestros nuevos inhibidores.

Además de sus funciones enzimáticas, que incluyen la liberación de factores del crecimiento unidos a HS y la degradación de la matriz extracelular (MEC), la heparanasa tiene también una función no enzimática que puede afectar al comportamiento y microambiente del tumor. El grupo de Sanderson, pionero en el estudio de la heparanasa y sindecán-1 en el mieloma, establece que la heparanasa actúa como un regulador maestro de un fenotipo tumoral agresivo en el mieloma. Esto se produce mediante la promoción de la regulación positiva de VEGF y MMP-9, que juntos estimulan el crecimiento tumoral, la destrucción ósea metastásica y osteolítica. De hecho, se demostró *in vivo* que la heparanasa promueve el crecimiento de tumores tipo mieloma y metástasis espontánea en huesos y que la expresión de heparanasa por células tumorales estimula la osteólisis generalizada, al menos parcialmente debido a la regulación positiva de la expresión de RANKL. El efecto que promueve la osteólisis de la heparanasa puede ser de gran importancia debido a que factores del crecimiento unidos a huesos se liberan cuando se degrada el hueso. Además, los osteoclastos pueden liberar factores que promueven el crecimiento tumoral, tales como HGF. Juntos, estos factores pueden ayudar a establecer nichos en la médula ósea que soportan la adquisición de células tumorales y el subsiguiente 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 la heparanasa es, así pues, una diana viable de la terapia de mieloma, soportada por el hecho de que existe una única heparanasa enzimáticamente activa en los seres humanos y por el hecho de que su expresión en tejidos normales es rara. Es más, se ha demostrado que ratones nuligénicos con heparanasa son viables y no exhiben trastornos visibles. Esto indica que un efecto secundario escaso o nulo puede derivarse de una estrategia de inhibición de la heparanasa (Casu B., *et al.* 2008. *Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. Pathophysiol Haemost Thromb.* 36: 195-203; Vlodaysky I., *et al.* 2007. *Heparanase: structure, biological functions, and 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 Desulfation, Graded N-Acetylation, y Glycol Splitting. J. Biol. Chem.* 280:12103-12113).

La heparina es un polisacárido lineal sulfatado polidisperso de la familia de los glicosaminoglicanos, dotado con actividad anticoagulante y antitrombótica. Las cadenas sacarídicas de heparina consisten en alternar ácido urónico y D-glucosamina. La unidad de repetición principal es el ácido L-idurónico en 2-O-sulfatado (IdoA2S) α (1 \rightarrow 4) y D-glucosamina en N-, 6-O-disulfatada (GlcN6S). Los constituyentes menores son ácido L-idurónico y D-glucurónico no sulfatado, junto con N-acetil D-glucosamina y D-glucosamina en N-, 3-O-, 6-O trisulfatada (Casu B., 2005. "Structure and active domains of heparin." *In: Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate.* Amsterdam: Elsevier. 1-28; Casu B. y Lindahl U., 2001, "Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate." *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 57: 159-206). La heparina, que es estructuralmente similar a HS, puede inhibir eficazmente la heparanasa, pero el uso de heparina a altas dosis en una estrategia de inhibición de heparanasa es, sin embargo, imposible debido a su actividad anticoagulante.

Curiosamente, las heparinas de bajo peso molecular (HBPMs), que son más biodisponibles y menos anticoagulantes que la heparina, parecen prolongar la supervivencia de pacientes con cáncer, probablemente a través de un efecto directo sobre el crecimiento y metástasis tumoral. Esto puede deberse, al menos, en parte, a la inhibición de la actividad de la enzima heparanasa (Zacharski L.R., y Lee, A.Y. 2008. *Heparin as an anticancer therapeutic. Expert Opin Investig Drugs* 17:1029-1037).

Los inhibidores eficaces de la actividad enzimática de la heparanasa se han seleccionado en la técnica anterior por el estudio de la inhibición de la heparanasa por heparinas no anticoagulantes, la mayoría de las cuales contienen residuos de ácido urónico no sulfatado modificados por la apertura del anillo glucosídico por escisión del enlace entre los carbonos 2 y 3 de un residuo glicosaminoglicano (división de glicol). Dichos inhibidores difieren en sus patrones de O-sulfatación, grado de N-acetilación y división de glicol en ambos residuos de ácido urónico pre-existente no sulfatado y los generados por el grado de 2-O-desulfatación (Naggi A., 2005. "Glycolsplitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative." *In: Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate.* Amsterdam: Elsevier 461-481; Yang Y. *et al.*, 2007, "The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy." *Blood*, 110:2041-2048).

En particular, la expresión "división de glicol" (dg) se refiere convencionalmente a polisacáridos que presentan la apertura de algunos residuos monosacáridos debido a la ruptura (división de glicol) de un enlace entre dos carbonos adyacentes, llevando cada uno un grupo hidroxilo. Una primera generación heparinas con división de glicol, es decir,

las llamadas "oxiheparinas reducidas" (RO-heparinas), consistió en bloques polisulfatados no modificados interrumpidos ocasionalmente por residuos con división de glicol, correspondientes a los residuos de ácido glucurónico/ácidos idurónico no sulfatados que estaban presentes a lo largo de la cadena original, primero oxidados a dialdehídos y después reducidos a alcoholes (Naggi A., 2005, "*Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative.*" In: *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Amsterdam: Elsevier 461-481).

El documento WO 01/55221 desvela 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 muestran actividad antiangiogénica basada en la inhibición de FGFs. No se ha previsto actividad para la inhibición de la heparanasa.

El documento US 2008/0051567 desvela un compuesto correspondiente a una heparina 100 % N-acetilada y con división de glicol del 25 %, ejerciendo una actividad anticoagulante escasa o nula o liberación de factores de crecimiento de la matriz extracelular. Se descubrió que dicho compuesto inhibe la heparanasa, el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la inflamación en modelos animales experimentales, incluyendo el modelo de Sanderson de mieloma (Yang Y., et al. 2007. *The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy*. *Blood* 110:2041-2048).

A pesar de que sigue existiendo la necesidad de proporcionar compuestos mejorados con mayor afinidad a la heparanasa, una mayor selectividad y una biodisponibilidad mejorada, son adecuadas para el tratamiento de patologías relacionadas con heparanasa, tales como mieloma y otros tumores.

Breve descripción de las figuras

Figura. 1: estructuras prevalentes generadas por el proceso de la presente invención. (1) unidad disacárida de un polímero de glicosaminoglicanos que comprende un ácido urónico (idurónico y/o glucurónico) y una glucosamina (2-N-acetilada, 2-N-no sustituida y/o 2-N-sulfatada), en la que los grupos hidroxilo (R_3 y R_4) pueden cada uno o ambos estar sustituidos con un grupo sulfato o no sustituido. (2, 3, 4) estructuras representativas (nuevas entidades) generadas por escisión oxidativa del anillo de los residuos de heparina en 2-no sulfatada, seguido de oxidación adicional a residuos tri- o dicarboxilados.

Figura. 2: un ejemplo de cromatograma obtenido con detección por MS. La presencia de picos correspondientes a los oligosacáridos que contienen ácido urónico y residuos di- o tricarboxilados, atribuida por los valores medidos de peso molecular, se destacan, respectivamente, por el código "+ carbox2" o "+ carbox3" en el gráfico.

Figura. 3: un ejemplo de cromatograma obtenido con detección por MS. La presencia de picos correspondientes a los oligosacáridos que contienen ácido urónico y residuos di- o tricarboxilados, atribuida por los valores medidos de peso molecular, se destacan, respectivamente, por el código "+ carbox2" o "+ carbox3" en el gráfico.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una nueva clase de derivados de glicosaminoglicanos químicamente modificados, dotados de actividad inhibidora de la heparanasa. En particular se refiere a derivados de glicosaminoglicanos carboxilados, en los que al menos parte de los residuos son residuos divididos que llevan tres grupos carboxilato (o dos, si el residuo dividido es una glucosamina).

Los derivados de glicosaminoglicanos de la presente invención son preferentemente derivados de heparina, diseñados como "heparinas di/tricarboxiladas", que inhiben fuertemente la actividad degradante de heparán sulfato de la heparanasa. Las modificaciones químicas efectuadas a la heparina, la modificación de los residuos de ácido glucurónico incluido en el sitio de unión para ATIII, la abolición de la actividad anticoagulante de heparina, permiten el uso de dosis altas.

Los derivados de glicosaminoglicanos de la presente invención se pueden obtener por oxidación, preferentemente por periodato, de los residuos en 2-no sulfatados de un glicosaminoglicano en condiciones eficaces para convertir los dioles adyacentes y los OH/NH₂ adyacentes del glicosaminoglicano a aldehídos, seguido por oxidación del glicosaminoglicano oxidado en condiciones para convertir dichos dialdehídos a grupos carboxilato. En particular, los derivados de glicosaminoglicanos de la presente invención se obtienen preferentemente a partir de un glicosaminoglicano que tiene un grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) de 0,8 a 2,8, preferentemente de 0,9 a 2,5. Se pretende que el grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) en la presente memoria se determine mediante valoración conductimétrica de acuerdo con Casu B. y Gennaro U., 1975, *Carbohydr Res* 39, 168-176. Los derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados obtenibles por el proceso de la invención desvelados anteriormente muestran un incremento de carboxilo de 1,2 a 2,2, en el que el incremento de carboxilo se calcula como la relación entre el grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) del material de partida, tras la primera etapa de oxidación, y el grado de sulfatación (relación molar SO₃/COO⁻) del derivado di/tricarboxilado, determinado por valoración conductimétrica como se define en la presente memoria. Más específicamente, el grado de sulfatación del

material de partida tras la primera etapa de oxidación se determina en una muestra del producto intermedio glicosaminoglicano obtenido en la primera etapa de oxidación (a), tras la reducción por NaBH₄.

5 Preferentemente, los derivados de glicosaminoglicanos de la presente invención se derivan de glicosaminoglicanos naturales o sintéticos (obtenidos químicamente o enzimáticamente), más preferentemente de glicosaminoglicanos en 2-O- y/o 2-N-desulfatados. En una realización preferente, dicho glicosaminoglicano natural o sintético es heparina no fraccionada, HBPM, o heparán sulfato, opcionalmente 2-O- y/o 2-N-desulfatado.

10 Más preferentemente, los derivados de glicosaminoglicanos se derivan de heparinas naturales o sintéticas o HBPMs, en 2-O- y, opcionalmente, en 2-N-desulfatadas.

15 Como ejemplo, cadenas de heparina pueden comprender naturalmente de aproximadamente 5 % a 35 % de residuos de ácido urónico en 2-O-no sulfatado, de 0 % a 50 % de residuos de glucosamina N-acetilada y de aproximadamente 0 % a 6 % de residuos de glucosamina N-no substituida (ni N-sulfatada, ni N-acetilada). Un grado diferente de sulfatación depende de la fuente de heparina (especies animales, fuentes de organismos) y de los procedimientos de extracción. Cada residuo en 2-O- o 2N-no sulfatado de glicosaminoglicanos, que no lleva sustituyentes en 3-O-sulfato, es susceptible de oxidación con apertura de anillo (división) y conversión de los dioles vecinales y los OH/NH₂ a aldehídos. Opcionalmente, el grado de 2-O-desulfatación de los glicosaminoglicanos de partida permite modular la relación de residuos divididos en glucosamina/ácido urónico.

20 La invención se refiere además al proceso de preparación de dichos derivados de glicosaminoglicanos carboxilados y además a su uso como principios activos de medicamentos para tratar condiciones patológicas, ya sea como único principio activo o en combinación con otros medicamentos. Dichas condiciones patológicas comprenden mieloma múltiple y otras enfermedades neoplásicas, incluyendo sus formas metastásicas. Es más, la invención se refiere a dichos derivados de glicosaminoglicanos carboxilados para su uso en cualquier indicación terapéutica que obtenga beneficio de la inhibición de la heparanasa. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados de glicosaminoglicanos carboxilados, opcionalmente en combinación con al menos un principio activo adicional.

25 El proceso de preparación de los derivados de glicosaminoglicanos carboxilados de la invención comprende: oxidación, preferentemente mediante periodato (o mediante el uso de reactivos oxidantes con reactividad similar), de los residuos no sulfatados susceptibles de un glicosaminoglicano, en condiciones eficaces para convertir los dioles adyacentes y opcionalmente los OH/NH₂ adyacentes a aldehídos, seguido de oxidación del glicosaminoglicano resultante de la primera oxidación, en condiciones para obtener dos nuevos grupos carboxilato de los grupos aldehído correspondientes.

30 El proceso de la presente invención comprende por consiguiente la oxidación, preferentemente mediante periodato, de 10 % a 100 %, preferentemente de 25 % a 100 %, de residuos no sulfatados en 2-O- y, opcionalmente 2-N-, 3-O- de un glicosaminoglicano, en condiciones eficaces para convertir los dioles adyacentes y opcionalmente los OH/NH₂ adyacentes a aldehídos; posteriormente se comprende la oxidación del glicosaminoglicano oxidado en condiciones eficaces para convertir dichos dialdehídos a grupos carboxilato.

35 Preferentemente, el glicosaminoglicano de partida es un glicosaminoglicano natural o sintético; más preferentemente se selecciona entre heparina, heparinas de bajo peso molecular, o heparán sulfato; más preferentemente se selecciona entre heparina y HBPMs, en 2-O- y, opcionalmente, 2-N-desulfatadas.

Preferentemente, el glicosaminoglicano de partida tiene un grado de sulfatación (SO₃⁻/COO⁻) de 0,8 a 2,8, más preferentemente de 0,9 a 2,5, mediante valoración conductimétrica, como se define en la presente memoria.

40 La primera oxidación del proceso de la invención se lleva a cabo preferentemente a un pH de 3 a 10, más preferentemente a un pH de 4,5 a 8. En una realización preferente, la primera oxidación del proceso de la invención se lleva a cabo a un pH de 3 a 5, con el fin de escindir solo el enlace C₂-C₃ de los residuos de ácido urónico no sulfatado, evitando reacciones secundarias. En otra realización preferente, la primera oxidación del proceso de la invención se lleva a cabo a un pH de 5,5 a 10, con el fin de escindir el enlace C₂-C₃ de tanto los residuos de ácido urónico en 2-O-no sulfatado como de glucosamina N-no sulfatada.

45 En una realización preferente, la primera oxidación se realiza en condiciones para escindir el enlace entre C₂ y C₃ de tanto los ácidos urónicos en 2-O-no sulfatados como de las glucosaminas en 2-N-, 3-O-no sulfatadas.

50 Opcionalmente, el proceso de acuerdo con la invención se lleva a cabo en presencia de ANT (ácido nitrilotriacético), un agente quelante y secuestrante utilizado para reducir la despolimerización, en presencia de NaHCO₃ o piridina, para alcalinizar la solución de reacción, o en presencia de MnCl₂ con o sin ANT. La oxidación adicional de dialdehído se lleva a cabo preferentemente utilizando NaClO₂, o por el uso de agentes con propiedades oxidantes comparables, tales como TEMPO (2,2,6,6 tetra metil-1-piperidinil-oxi).

55 Preferentemente, los residuos de ácido urónico carboxilados en los derivados de glicosaminoglicanos de la presente

invención son de 25 % a 100 %, más preferentemente de 50 % a 100 %, mucho más preferentemente de 60 % a 90 %, de los residuos totales del total de residuos carboxilados del glicosaminoglicano.

Los derivados de glicosaminoglicanos carboxilados que se pueden obtener por los procesos anteriores tienen preferentemente un peso molecular de 8.000 a 30.000 Da, dependiendo de las condiciones del proceso y del glicosaminoglicano de partida empleado. En una realización preferente, más preferentemente cuando se emplea heparina no fraccionada como el glicosaminoglicano de partida, el derivado de glicosaminoglicano carboxilado que se puede obtener por los procesos anteriores tiene preferentemente un peso molecular de 3.000 a 20.000 Da, preferentemente de 3.500 a 12.000 Da.

Los nuevos derivados de glicosaminoglicanos obtenibles por el proceso de la presente invención representan una nueva clase de polisacáridos similares a heparina, que se caracteriza por la presencia de residuos divididos, llevando cada uno dos grupos carboxilato adicionales. Tenga en cuenta que los residuos que llevan un grupo carboxilato natural, se convierten en residuos tricarboxilados por el proceso de la presente invención. Dichos nuevos derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados han demostrado inesperadamente que son fuertes inhibidores de heparanasa *in vitro* e inhiben el mieloma en modelos animales.

Los derivados de glicosaminoglicanos que comprenden residuos que llevan dos o tres grupos carboxilato, también son menos sulfatados que el glicosaminoglicano padre, muestran una farmacocinética más favorable que sus análogos que llevan grupos menos carboxílicos.

La presente invención se refiere además a los compuestos que pueden obtenerse por los procesos anteriores para su uso como medicamentos.

En particular, la presente invención se refiere a los compuestos que pueden obtenerse por los procesos anteriores para su uso como medicamentos antitumorales, preferentemente para su uso como medicamentos anti-mieloma, solos o en combinación con al menos un principio activo adicional.

Los derivados de heparina y heparina de bajo peso molecular preparados de acuerdo con la presente invención han demostrado una inhibición eficaz de la actividad de la heparanasa, tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo experimental de mieloma múltiple.

Ejemplos

Preparación de compuestos

Las muestras de heparinas no fraccionadas o fraccionadas, dotadas de diferente grado de sulfatación ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) mediante valoración conductimétrica, se sometieron a oxidación con periodato (para dar unidades de dialdehído divididas), realizadas por modificación de los métodos conocidos. El grado de 2-O-desulfatación de las heparinas no fraccionadas (HNF) se realizó después de la modificación de los 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 y A.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 and related reactions." *Carbohydr. Res.* 200, 25, 437-447; Casu B. *et al.*, 2004, "Undersulfated and Glycol-Split Heparins Endowed with Antiangiogenic Activity." *J. Med. Chem.*, 47, 838-848). En condiciones básicas, las unidades de ácido L-idurónico en 2-O-desulfatado (natural o químicamente inducido) se convierten en derivados de 2,3-epoxi y, finalmente, en unidades de ácido L-galacturónico. Los dialdehídos originados a partir de las unidades de ácido urónico, y opcionalmente de glucosaminas, son preferentemente, y en un corto periodo de tiempo, oxidados además a dicarboxilatos.

Ensayo *in vitro*

Basándose en 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* 33488-495), se determinó la actividad de inhibición de la heparanasa *in vitro* por el grupo del Prof. Vlodavsky de la Universidad de Haifa, Israel, 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, la heparanasa puede escindir el pentasacárido sintético Fondaparinux, que es un fármaco antitrombótico, estructuralmente correspondiente al sitio de unión a antitrombina de la heparina. Después de la escisión de heparanasa, se obtienen un trisacárido y un disacárido reductor. Este último se puede cuantificar fácilmente con el fin de evaluar la actividad de la heparanasa. En los presentes ejemplos, la solución de ensayo (100 μl) comprendía tampón acetato de sodio 40 mM, pH 5,0 y Fondaparinux 100 mM (GlaxoSmithKline), con o sin muestra inhibidora. La heparanasa se añadió a una concentración final de 140 pM para iniciar el ensayo. Las placas se sellaron con cinta adhesiva y se incubaron a 37 °C durante 2-24 horas. El ensayo se detuvo por adición de 100 μl de una solución de 4-[3-(4-yodofenil)-1H-5 tetrazolio]-1,3-benceno disulfonato 1,69 mM (WST-1, Aspep, Melbourne, Australia) en NaOH 0,1 M. Las placas se volvieron a sellar con cinta adhesiva y se desarrollaron a 60 °C durante 60 min. La absorbancia se midió a 584 nm (Fluostar, BMG, Labtech). En cada placa, una curva convencional elaborada con D-

galactosa como el nivel de azúcar reductor se preparó en el mismo tampón y volumen en el intervalo de 2 a 100 μ M. Se determinó el valor de CI_{50} . Debido a que este ensayo tiene un sustrato homogéneo con un único punto de escisión, la cinética y los parámetros bioquímicos de la enzima se pueden caracterizar de forma fiable. Los resultados obtenidos utilizando el ensayo colorimétrico descrito anteriormente se validaron utilizando una matriz extracelular (MEC) marcada con sulfato como sustrato. Brevemente, el sustrato de MEC se deposita por medio de las células endoteliales de la córnea cultivadas y por ende se parece mucho a la membrana basal subendotelial en su composición, función biológica y propiedades de barrera. La información detallada sobre la preparación de MEC marcada con sulfato y su uso para el ensayo de heparanasa se puede hallar en: Vlodavsky, I., *Current Protocols in Cell Biology*, capítulo 10: unidad 10.4, 2001. El ensayo es muy sensible, se asemeja mejor a las condiciones *in vivo*, pero, debido a su naturaleza biológica, es semicuantitativo y limitado en términos de parámetros bioquímicos.

Ensayo *in vivo*

La actividad antimieloma *in vivo* se ensayó esencialmente siguiendo 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 scid CB17/scid de 5 a 6 semanas de vida procedentes de Arlan (Indianápolis, IN) o Charles River Laboratories (EE.UU.). Los animales fueron alojados y monitoreados en el estabulario 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 Animales. Se inyectaron por vía subcutánea células de mieloma CAG que expresan 1×10^6 de heparanasa (alto o bajo nivel de expresión) en el flanco izquierdo de cada ratón. 10 días después de la inyección de las células tumorales, a los ratones se les implantaron bombas osmóticas Alzet (Durect Corporation, Cupertino, CA) en el flanco derecho. Las bombas contenían una solución de compuestos de ensayo (nuevos derivados de heparina) o TFS como control. La solución se administró de forma continua durante 14 días. Después de 14 días, los animales se sacrificaron y el peso en húmedo de los tumores subcutáneos y el nivel medio de sueros kappa se analizaron y se compararon entre los grupos experimentales mediante el ensayo del rango logarítmico ($p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo).

La formación de imágenes semanales por bioluminiscencia luciferasa proporciona datos cuantitativos sobre tumores primarios y rastrea la metástasis en el hueso, así como en los tejidos blandos. Especialmente, el modelo SCID-hu es único en que las células de tumores humanos se inyectan directamente en pequeños trozos de hueso fetal humano implantado subcutáneamente en ratones SCID, recapitulando así estrechamente el mieloma humano.

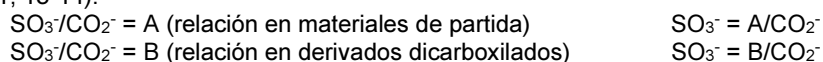
Procedimiento general de análisis por RMN

Los espectros se registraron a 25 °C en un espectrómetro Bruker Avance 500 (Karlsruhe, Alemania) equipado con una criosonda TCI de 5 mm o con una sonda BBO de 10 mm. La integración de los volúmenes pico en los espectros se realizó utilizando el software convencional de Bruker TopSpin 2.0. La estructura de los residuos de ácido urónico dicarboxilados se determinó mediante experimentos heteronucleares bidimensionales que confirmaron la presencia de los residuos tricarboxilato y permitió la identificación de su desplazamiento químico. En la siguiente tabla, se notifican los desplazamientos químicos asignados de protones y átomos de carbono en la posición 1, 4, 5 del residuo dicarboxilado, de glucosamina y ácido idurónico en 2-O-sulfatado.

Señales correspondientes a la posición del residuo	¹ H ppm	¹³ C ppm
Ácido urónico C5 gsox	4,97	81,65
Ácido urónico C4 gsox	4,59	81,22
Ácido urónico C1 gsox	5,01	103,71
C4	3,63	79,14
Glucosamina C1 NS (ANS)	5,40	99,17
C1-ANS vinculado a (gsox)	5,03	100,19
Ácido idurónico C1 2S	5,17	102,11

Procedimiento general para el cálculo del incremento de grupos carboxilo

El aumento de grupos carboxilo en los residuos de ácido urónico de derivados de heparina dicarboxilados se calculó a partir de los valores respectivos de relación molar SO_3^-/COO^- del material de partida (heparina no fraccionada o al menos heparinas parcialmente desulfatadas y HBPMs) y de los derivados dicarboxilados, evaluados mediante valoración conductimétrica (Casu B. y Gennaro U., 1975, *Carbohydr Res* 39, 168-176). En particular, el grado de sulfatación del material de partida se determina después de la primera etapa de oxidación, en una muestra reducida del producto intermedio glicosaminoglicano oxidado (véanse los ejemplos 4-7), mientras que el grado de sulfatación del derivado carboxilado de glicosaminoglicano final se determina después de la segunda etapa de oxidación (véanse los ejemplos 8-11, 13-14).



Dado que el número de grupos sulfato no cambia durante las dos etapas de oxidación, se puede concluir que el

aumento de los grupos carboxilo (CO_2^- (derivados dicarboxilados)/ CO_2^- (materiales de partida)) es igual a la relación de las relaciones molares individuales A y B

$$\text{Incremento de carboxilo (I.C.)} = A/B = \text{CO}_2^- \text{ (derivados dicarboxilados)} / \text{CO}_2^- \text{ (materiales de partida)}$$

5 Escisión enzimática de las heparinas y sus derivados carboxilados y análisis por HPLC/MS

El sustrato (2-3 mg) se disolvió en una mezcla 1:1 (v/v) de tampón acetato de sodio 100 mM (pH 7,0) y acetato de calcio 10 mM para obtener una solución de 7,7 mg/ml. Para llevar a cabo la escisión enzimática se añadieron 144 μl de la mezcla de acetato de sodio 100 mM y acetato de calcio 10 mM (1:1) y 3 μl de mezcla de heparinasas (liasas de heparina I, II y III) (1 μl de cada liasa, 2 mU/ μl de solución enzimática) a 13 μl de la solución de heparina. La mezcla de reacción se agitó a 37 °C. (Thermo-Shaker TS-100, Biosan) durante 24 h. La reacción se detuvo por adición de 3 μl de 3 % de HCOOH. Cada muestra se diluyó dos veces con agua y se analizó por IPRP-HPLC/ESI-TOF (microTOF-Q, Bruker). Un Kinetex C18 y un gradiente (0'-17 % B, 15'-20 % B, 55'-40 % B, 100'50 % B, 115'90 % B) que usa la fase A (pH 6,25) y B (pH 7,95) con DBA- CH_3COOH 10 mM se utilizaron con un caudal de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

15 EJEMPLO 1 (G7669)

Una muestra de HNF (2,5 g del lote G5842) en NaOH 1 M (32 ml) se calentó a 60 °C durante 30 min. Después de enfriar a temperatura ambiente y neutralización con HCl 2 N, la solución se dializó a temperatura ambiente durante 3 días frente a agua destilada en membranas (corte: 3.500 Da). La concentración bajo presión reducida y liofilización dio: 2,15 g (rendimiento = 80 % en p/p) de un producto intermedio con un 13 % de los residuos de ácidos urónicos totales que llevan un grupo epóxido como se determina por ^{13}C -RMN. La muestra se disolvió en agua (32 ml) y se mantuvo bajo agitación a 70 °C durante 2 días, con el fin de hidrolizar los grupos epoxi. Después de la concentración y la liofilización, se obtuvo G7669.

25 EJEMPLO 2 (G8661)

Una muestra de HNF (2,11 g de lote G3378) en 27 ml de NaOH 1 N se agitó a 60 °C durante 30 min. La neutralización, el enfriamiento a temperatura ambiente y la diálisis, la concentración y la liofilización (como se describe en el Ejemplo 1) dio el producto intermedio G8637 (1,5 g). Ya que su espectro ^{13}C -RMN indicó la presencia de grupos epoxi, G8637 (1,5 g) se disolvió en agua (32 ml) y se mantuvo bajo agitación a 70 °C durante 2 días, con el fin de hidrolizar los grupos epoxi. Después de la concentración y la liofilización, se obtuvo G8661 (1,5 g).

35 EJEMPLO 3 (G8699)

Una muestra de HNF (2,01 g de lote G3378) se procesó como se describe en el Ejemplo 2 para dar el derivado del producto intermedio G8638 que contiene epoxi. Una muestra de G8638 (1,4 g) se disolvió en agua (32 ml) y se calentó bajo agitación a 70 °C durante 24 horas, para dar, después de la concentración y la liofilización, 1,3 g de G8699.

40 OXIDACIÓN CON PERIODATO DE HEPARINA NO FRACCIONADA Y DERIVADOS DE 2-O-DESULFATADOS

EJEMPLO 4 (G7731)

A partir de la muestra G7669 del Ejemplo 1 (1,8 g, 13 % de 2-O-desulfatación) en agua (52 ml), la solución se enfrió a 4 °C, se agitó en la oscuridad y se añadieron 52 ml de NaIO_4 0,2 M. Después de 16 horas, el exceso de periodato se inactivó mediante la adición de etilenglicol (5,2 ml) y después de 1 h a 4 °C, la mezcla de reacción se desaló por diálisis a 4 °C durante 16 horas. Después de la concentración bajo presión reducida y liofilización, se obtuvo el dialdehído que lleva G7731 (1,5 g), rendimiento = 83 %. Una pequeña porción de la muestra se redujo con NaBH_4 para medir PM = 8.242 Da y $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 2,46$, mediante valoración conductimétrica.

50 EJEMPLO 5 (G8425)

A partir de una muestra de HNF (0,25 g, lote G3378) y siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se obtuvo el dialdehído que lleva G8425 (0,24 g), rendimiento = 96 % en p/p.

55 EJEMPLO 6 (G8678)

A partir de una muestra de G8661 del Ejemplo 2 (1,5 g) y realizando el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se obtuvo el dialdehído que lleva G8678 (1,5 g). Una pequeña porción de la muestra se redujo con NaBH_4 para medir $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1,96$ mediante valoración conductimétrica.

60 EJEMPLO 7 (G8710)

A partir de una muestra de G8699 del Ejemplo 3 (0,56 g) y siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se obtuvo el dialdehído que lleva G8710 (0,56 g). Una pequeña porción de la muestra se redujo con NaBH_4 para medir $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1,51$ mediante valoración conductimétrica.

5 OXIDACIÓN DE LOS PRODUCTOS INTERMEDIOS DE ÁCIDO URÓNICO Y DIALDEHÍDICO CON RESPECTO A LOS DICARBOXILATOS CORRESPONDIENTES

EJEMPLO 8 (G7927)

10 Una muestra de G7731 del Ejemplo 4 (0,3 g) se disolvió en agua (29 ml), se enfrió a 0 °C en un matraz de fondo redondo y doble boca y, bajo agitación en atmósfera de nitrógeno, se trató con una solución acuosa (6 ml) que contenía NaClO_2 (0,362 g). Después de una adición gota a gota de ácido acético glacial (0,118 ml) hasta alcanzar pH 4,0, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de otras 3 horas bajo agitación a temperatura ambiente, por N_2 fundente, se obtuvo una solución incolora. La mezcla de reacción se neutralizó con NaOH 0,5 N y se desaló por diálisis como se ha descrito en el Ejemplo 4. La concentración y la liofilización dieron G7927 (0,228 g), rendimiento = 76 % en p/p, con:

PM = 6.450 Da;
 $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1,23$;

20 Incremento de carboxilo (I.C.) = 2

El análisis de la inhibición de la heparanasa *in vitro* dio: $\text{Cl}_{50} = 10$ ng/ml.

EJEMPLO 9 (G8437)

25 A partir de una muestra de G8425 del Ejemplo 5 (0,25 g), en la cual solo los ácidos urónicos no sulfatados presentes de forma natural en la cadena de heparina (18 %) se oxidaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 8, G8437 (0,21 g) se obtuvo al reducir 1,5 horas el N_2 fundente antes de la neutralización de la mezcla de reacción, con:

30 PM = 12.100 Da;
 $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1,62$;
 Incremento de carboxilo (I.C.): 1,43.

El análisis de inhibición de la heparanasa *in vitro* dio: $\text{Cl}_{50} = 10$ ng/ml.

35 EJEMPLO 10 (G8767)

A partir de muestras de G8678 del Ejemplo 6 (1 g) y siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 8, se obtuvo G8767 (1,05 g), con:

40 PM = 8.800 Da;
 $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1,27$;
 Incremento de carboxilo (I.C.) = 1,55.

Análisis de la actividad antimieloma *in vivo* (60 mg/kg día durante 14 días) dio: inhibición tumoral del 52 % e inhibición de suero K del 20 %.

45 EJEMPLO 11 (G8733)

A partir de la muestra G8710 del Ejemplo 7 (0,56 g) y siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 8, se obtuvo G8733 (0,453 g), rendimiento = 80 % en p/p, con:

50 PM = 5.540 Da;
 $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 0,97$;
 Incremento de carboxilo (I.C.) = 1,56.

Análisis de la actividad antimieloma *in vivo* (60 mg/kg día durante 14 días) dio: una inhibición tumoral del 53 %.

55 EJEMPLO 12 (G9685)

60 A partir de una muestra de HNF (lote G3378) y siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se obtuvo el derivado de dialdehído. El derivado de dialdehído se oxidó adicionalmente en presencia de clorito de sodio, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 8, obteniendo el derivado carboxilado G9685, PM = 11.700 Da.

El análisis de la inhibición de la heparanasa *in vitro* dio: $\text{Cl}_{50} = 10$ ng/ml;

El análisis de la actividad antimieloma *in vivo* (60 mg/kg día durante 14 días) dio: inhibición tumoral del 68 %.

65 EJEMPLO 13 (G7897)

Una muestra de G7731 del Ejemplo 4 (0,3 g) se disolvió en agua (3 ml) y se trató con 1,36 ml de NaClO₂ a pH 8,2 a 8,5 con HCl al 4 %. Después, se añadió 1 mg de TEMPO y el pH se mantuvo a 7-7,5 con NaOH 1 M durante 24 h. La mezcla de reacción se desaló por diálisis, se concentró y se liofilizó para dar G7897 (0,190 g), rendimiento = 63 % p/p, con:

SO₃⁻/COO⁻ = 1,92;
Incremento de carboxilo (I.C.) = 1,28.

10 EJEMPLO 14 (G9585)

A partir de una muestra de heparina en 2-O-desulfatada (G9416, SO₃⁻/COO⁻ = 1,39), siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se obtuvo el derivado de dialdehído G9577. Una muestra de G9577 (0,242 g) disuelta en agua (21 ml) se enfrió a 0 °C en un matraz de doble boca de fondo redondo y, bajo agitación en atmósfera de nitrógeno, se trató con una solución acuosa (1 ml) que contenía NaClO₂ (0,128 g). Después de una adición gota a gota de ácido acético glacial (0,084 ml) hasta alcanzar pH 4,0, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de otras 3 horas bajo agitación a temperatura ambiente, por N₂ fundente, se obtuvo una solución incolora. La mezcla de reacción se neutralizó con NaOH 0,5 N y se desaló por diálisis como se ha descrito en el Ejemplo 4. La concentración y la liofilización dieron G9585 (0,148 g), rendimiento = 61 % p/p, con:

PM = 4.700 Da;
SO₃⁻/COO⁻ = 0,82;
Incremento de carboxilo (I.C.) = 1,69.
El análisis de la inhibición de la heparanasa *in vitro* dio: Cl₅₀ = 44 ng/ml.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un derivado de glicosaminoglicano para inhibir la heparanasa, en el que el derivado de glicosaminoglicano contiene residuos di- o tricarbóxilados y/o se obtiene mediante un proceso que comprende:
- 10 a) la oxidación del 10 % al 100 %, de residuos no sulfatados en 2-O- y opcionalmente 2-N-, 3-O-, de un glicosaminoglicano, en condiciones eficaces para convertir los dioles adyacentes y opcionalmente los OH/NH₂ adyacentes en dialdehídos;
- 10 b) la oxidación del glicosaminoglicano oxidado en condiciones eficaces para convertir dichos dialdehídos en grupos carboxilato, en donde el glicosaminoglicano es un glicosaminoglicano natural o sintético, seleccionado entre heparina, heparinas de bajo peso molecular, heparán sulfato, opcionalmente 2-O- y/o 2-N-desulfatado, en donde el uso no comprende el tratamiento del cuerpo humano o animal.
- 15 2. El uso de la reivindicación 1, en el que el glicosaminoglicano se selecciona entre heparina no fraccionada o HBPM, opcionalmente 2-O y/o 2-N-desulfatada.
- 20 3. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el glicosaminoglicano tiene un grado de sulfatación (SO₃⁻/COO⁻), determinado por valoración conductimétrica, de 0,8 a 2,8.
- 25 4. El uso de la reivindicación 3, en el que el glicosaminoglicano tiene un grado de sulfatación (SO₃⁻/COO⁻), determinado por valoración conductimétrica, de 0,9 a 2,5.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el derivado de glicosaminoglicano tiene un incremento de carboxilo, de 1,2 a 2,2.
- 30 6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que en la etapa a), la oxidación se realiza mediante un periodato.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que en la etapa a), del 25 % al 100 %, de los residuos no sulfatados en 2-O-, y opcionalmente 2-N-, 3-O-, del glicosaminoglicano se oxidan.
- 35 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el derivado de glicosaminoglicano tiene un peso molecular de 3.000 a 20.000 Da.
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el derivado de glicosaminoglicano tiene un peso molecular de 3.500 a 12.000 Da.
- 40 10. El derivado de glicosaminoglicano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de una indicación terapéutica obteniendo beneficio de la inhibición de la heparanasa.
11. El derivado de glicosaminoglicano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de la metástasis o tumores que se benefician de la inhibición de la heparanasa.
- 45 12. El derivado de glicosaminoglicano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento de mieloma que se beneficia de la inhibición de la heparanasa.

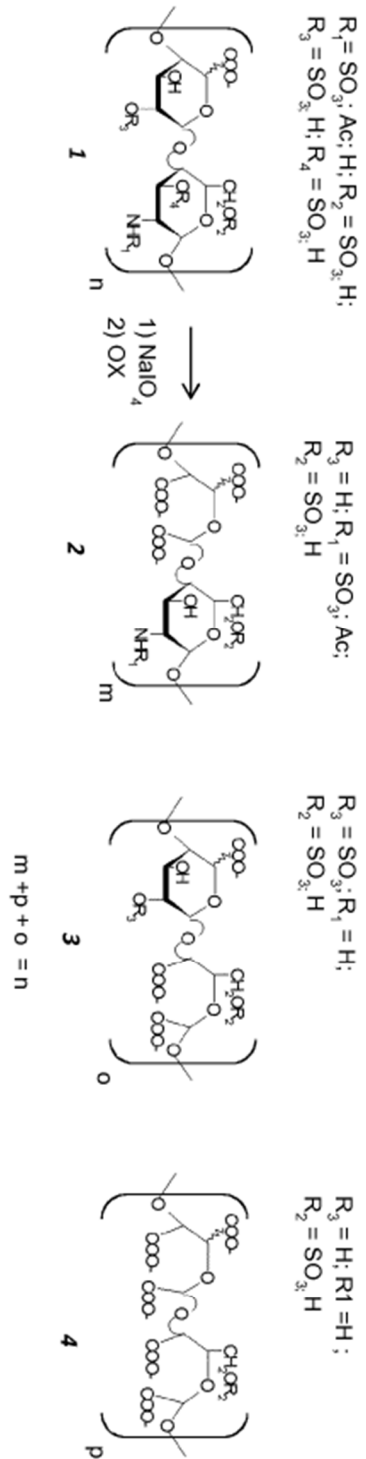


Figura 1

Figura 2

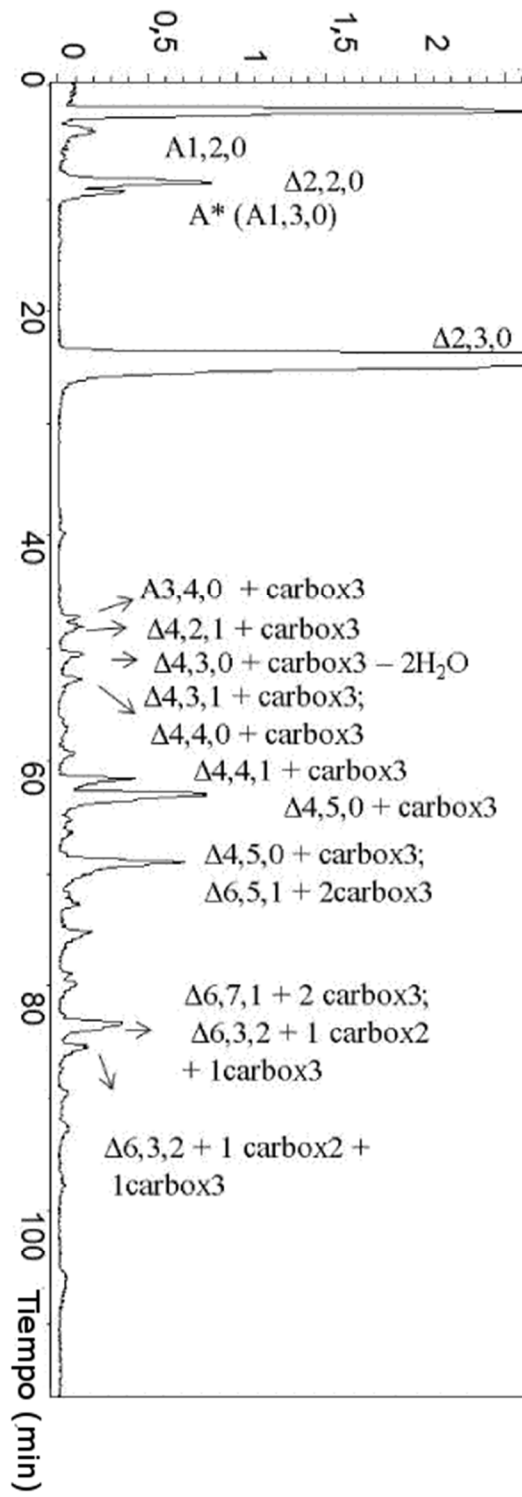


Figura 3

