

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 550**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2016 PCT/EP2016/073035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17055310**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2016 E 16775193 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.06.2021 EP 3355897**

54 Título: **Un derivado de exopolisacárido bacteriano marino antimetastásico y usos del mismo**

30 Prioridad:

28.09.2015 EP 15187107

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

23.12.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR
L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) (25.0%)
1625 Route de Sainte-Anne
29280 Plouzané, FR;
UNIVERSITÉ DE NANTES (25.0%);
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
NANTES (25.0%)**

72 Inventor/es:

**COLLIEC-JOUAULT, SYLVIA;
SINQUIN, CORINNE;
RATISKOL, JACQUELINE;
HEYMANN, DOMINIQUE;
RUIZ-VELASCO, CARMEN y
CHESNEAU, JULIE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 887 550 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

Un derivado de exopolisacárido bacteriano marino antimetastásico y usos del mismo

5 **Sector de la técnica**

El osteosarcoma es el tumor óseo primario maligno más frecuente que se produce principalmente en jóvenes, con un pico de incidencia observado a los 18 años de edad. A pesar de las recientes mejoras en quimioterapia y cirugía, el problema de insensibilidad a quimioterapia permanece y este mal pronóstico justifica nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la tasa global de supervivencia. El osteosarcoma se caracteriza por una alta potencia para formar metástasis, que es la causa principal de muerte (Ando *et al.*, *Sarcoma*, 2012, 2012: 523432-523432; Odri *et al.*, *BMC Cancer*, 2014, 14: 169-177).

15 **Estado de la técnica**

Estudios recientes han descrito los mecanismos moleculares de aparición de metástasis que pueden ayudar a identificar nuevas estrategias terapéuticas (Barkan *et al.*, *Europ. J. Cancer*, 2010, 46: 1181-1188). Los carbohidratos y, especialmente, la heparina y el sulfato de heparano, se consideran ahora buenos candidatos para tratar los cánceres, en particular para tratar la metástasis cancerosa. Sin embargo, su uso terapéutico está limitado porque ambos muestran actividad anticoagulante, por lo tanto, pueden inducir complicaciones hemorrágicas adversas. Otra desventaja de la heparina y el sulfato de heparano es su origen animal, que puede provocar un alto riesgo de contaminación cruzada de especie desconocida (Stevenson *et al.*, *Thrombosis Research*, 2007, 120: S107-S111; Velasco *et al.*, *Drug Discov. Today*, 2010, 15: 553-560). Por consiguiente, la exploración del potencial terapéutico de los miméticos de heparina está ahora en auge. Los oligosacáridos sulfatados se estudian actualmente, tal como una forma sulfatada de fosfomanopentaosa y fosfomanotetraosa denominada PI-88 (Ferro *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 2001, 332: 183-189); forma sulfatada de maltohexosa y maltotriosa sulfatada (Vismara *et al.*, *Molecules*, 2012, 17: 9912-9930). Recientemente, se describieron dos polisacáridos extraídos de *Prunella vulgaris* L. por su actividad antiadenocarcinoma pulmonar (Feng *et al.*, *Molecules*, 2010, 15: 5093-5103).

En los últimos años, ha habido un interés creciente en el aislamiento e identificación de nuevos polisacáridos microbianos que podrían tener nuevas aplicaciones en diversas industrias. Compiten con los polisacáridos de otras fuentes tales como algas marinas, crustáceos, animales o plantas. El interés en el cultivo en masa de microorganismos del entorno marino ha aumentado considerablemente, representando una estrategia innovadora al uso biotecnológico de recursos infraexplotados. Cuando están sulfatados, los polisacáridos de diferentes fuentes pueden compartir algunas propiedades biológicas con los glucosaminoglucanos (GAG), y especialmente sulfato de heparano o heparina, sin mostrar los mismos riesgos hemorrágicos y con un bajo riesgo de contaminarse por un agente transmisible no convencional tal como priones o virus emergentes debido a una gran "barrera de especie" (DeAngelis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 94: 295-305).

Las bacterias marinas asociadas con condiciones hidrotérmicas de la profundidad oceánica han demostrado su capacidad de producir, en un medio aeróbico basado en carbohidratos, polímeros extracelulares inusuales. Presentan características estructurales originales que pueden modificarse para diseñar compuestos bioactivos y mejorar su especificidad (Rehm *et al.*, *Rev. Microbiol.*, 2010, 8: 578-592; Collic-Jouault *et al.*, *Handbook of Exp. Pharmacol.*, 2012, 423-449). En particular, con el objetivo de promover actividades biológicas, se han emprendido modificaciones químicas (reacciones de despolimerización y sustitución) de un exopolisacárido (GY785 EPS) producido por una bacteria hidrotérmica de la profundidad oceánica denominada *Alteromonas infernus*. Se ha descrito la estructura del GY785 EPS natural (Roger *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 2004, 339: 2371-2380). Un exopolisacárido sobresulfatado (OS-EPS) de bajo peso molecular (LMW) de 24 kDa se ha aislado después de modificaciones químicas de su GY785 EPS natural. Se descubrió que este derivado LMW era menos eficaz (10 veces) que la heparina en ensayos de coagulación. En el tiempo de tromboplastina parcial activada, se obtuvo el mismo efecto anticoagulante con una concentración de 10 µg/ml de OS-EPS 24 kDa y con una concentración de 1,5 µg/ml de heparina, respectivamente (Collic-Jouault *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1528: 141-151).

El crecimiento y diferenciación de las células óseas está controlado por diversos factores que pueden modularse por sulfatos de heparano. Los efectos del OS-EPS 24 kDa sobre la biología ósea se ha estudiado previamente. El efecto de este derivado LMW altamente sulfatado (40 % de grupo sulfato) se ha comparado con el de un EPS LWM no sobresulfatado de 13 kDa (10 % de grupos sulfato). Los datos observados han mostrado diferentes niveles de regulación de la reabsorción ósea por GAG u OS-EPS, dando lugar la mayoría de ellos a efectos prorreabsorbentes (Velasco *et al.*, *Glycobiology*, 2011, 21: 781-795).

A pesar del progreso hecho en promover propiedades biológicas de los exopolisacáridos, aún hay una necesidad en la técnica de proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la tasa global de supervivencia en cáncer metastásico, en particular en osteosarcoma metastásico.

65

Objeto de la invención

Los autores de la presente invención han demostrado que un polisacárido sobresulfatado de bajo peso molecular obtenido de un exopolisacárido natural marino (EPS) de la cepa GY785 del género *Alteromonas* muestra propiedades antimetastásicas. De hecho, en experimentos *in vitro*, se compararon en primer lugar la actividad de tres polisacáridos sobresulfatados de bajo peso molecular con diferentes pesos moleculares (4 kD (GYS4), 8 kDa (GYS8) y 15 kDa (GYS15)) en líneas celulares de osteosarcoma (líneas celulares POS-1 de ratón y HOS humana), usando heparina como referencia. Se estudiaron análisis de proliferación, migración, ciclo celular y expresión en líneas celulares de osteosarcoma de metaloproteinasas de matriz tales como gelatinasas MMP-2 y MMP-9 y sus inhibidores TIMP-1 y TIMP-2. Después, GYS15, que mostró las propiedades más interesantes *in vitro*, se evaluó *in vivo* tanto sobre el crecimiento del tumor óseo maligno (modelo paratibial) y formación de metástasis pulmonares en un modelo de ratón de osteosarcoma, de nuevo usando heparina como referencia. Los resultados obtenidos mostraron que GYS15 era muy eficaz en inhibir la formación de metástasis pulmonares *in vivo*.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para su uso en la prevención o inhibición de la formación de metástasis en un sujeto, en el que dicho exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa se obtiene por un método que comprende las siguientes etapas:

(a) una etapa que consiste en despolimerización de radicales libres de un exopolisacárido natural marino (EPS) de la cepa GY785 del género *Alteromonas* para obtener un EPS despolimerizado que tiene un peso molecular de 5000 a 100 000 g/mol;

(b) una etapa posterior que consiste en la sulfatación del EPS despolimerizado para obtener un EPS despolimerizado sobresulfatado, que comprende añadir al EPS despolimerizado al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener un polisacárido sulfatado que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato entre un 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del EPS despolimerizado sobresulfatado; y

(c) una etapa posterior que consiste en aislar el exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa (GYS15) del EPS despolimerizado sobresulfatado.

En determinadas realizaciones, la etapa de aislar GYS15 del EPS despolimerizado sobresulfatado se realiza por fraccionamiento, en particular fraccionamiento realizado por cromatografía de exclusión por tamaño.

En determinadas realizaciones preferidas, el sujeto es un paciente con cáncer. Un paciente con cáncer puede padecer un cáncer, o puede haber experimentado previamente tratamiento para el cáncer. Cuando el paciente con cáncer padece un cáncer, el paciente con cáncer puede estar experimentando tratamiento para el cáncer.

El cáncer del paciente puede pertenecer al grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Por ejemplo, el cáncer puede pertenecer al grupo que consiste en cáncer óseo, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductores, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma de pituitaria.

En determinadas realizaciones, el cáncer es osteocarcinoma.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de GYS15 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención o inhibición de la formación de metástasis en un sujeto.

En determinadas realizaciones preferidas del método de la invención, el sujeto es un paciente con cáncer, como se describe anteriormente.

Estos y otros objetos, ventajas y características de la presente invención. Llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia tras leer la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

Definiciones

Como se usa en este documento, el término "**sujeto**" se refiere a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, ratón, rata, conejo y similares), que pueden desarrollar un cáncer, pero que puede o no padecer la enfermedad. Los sujetos no humanos pueden ser animales transgénicos o modificados de otro modo. En muchas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En dichas realizaciones, el sujeto a menudo se denomina "**individuo**" o "**paciente**". Estos términos no indican una edad particular y, por tanto, abarcan recién nacidos, niños, adolescentes y adultos. El término "**paciente**" se refiere más específicamente a un individuo que padece una enfermedad. Por tanto, la expresión "**paciente con cáncer**" se refiere a un individuo que padece un cáncer. Un paciente con cáncer puede haberse diagnosticado o no con cáncer. La expresión también incluye individuos que han experimentado previamente tratamiento para el cáncer.

Como se usa en este documento, el término "**cáncer**" se refiere a o describe la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado, ausencia de diferenciación y capacidad de invadir tejidos locales y metastatizar. El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano. Ejemplos de cánceres incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, ejemplos de dichos cánceres incluyen cáncer óseo, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductores, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma de pituitaria.

Los términos "**agresivo**" e "**invasivo**" se usan en este documento indistintamente. Cuando se usan en este documento para caracterizar un cáncer, se refieren a la proclividad de un tumor de expandirse más allá de sus límites en el tejido adyacente. El cáncer invasivo puede contrastarse con el cáncer confinado en órganos, en el que el tumor está confinado a un órgano particular. La propiedad invasiva de un tumor a menudo va acompañada por la elaboración de enzimas proteolíticas, tales como colagenasas, que degradan el material de la matriz y el material de la membrana basal para posibilitar que el tumor se expanda más allá de los confines de la cápsula, y más allá de los confines del tejido particular en que está localizado ese tumor.

El término "**metástasis**", como se usa en este documento, se refiere a la propagación de las células tumorales de un órgano o tejido a otra ubicación. El término también se refiere a tejido tumoral que se forma en una nueva ubicación como resultado de metástasis. Un "cáncer metastásico" es un cáncer que se propaga desde su ubicación original o principal y también puede denominarse "cáncer secundario" o "tumor secundario". En general, los tumores metastásicos se denominan para el tejido del tumor primario del que se originan. El proceso de metástasis tumoral es un acontecimiento de múltiples fases que implica la invasión local y destrucción de matriz intercelular, intravasación en vasos sanguíneos, vasos linfáticos u otros canales de transporte, supervivencia en la circulación, extravasación desde los vasos al sitio secundario y crecimiento en la nueva ubicación.

Como se usa en este documento, el término "**inhibir**" significa evitar que algo suceda, retardar la aparición de algo que sucede y/o reducir el grado o probabilidad de algo que sucede. Por tanto, las expresiones "inhibir la metástasis", "inhibir las metástasis" e "inhibir la formación de metástasis", que se usan en este documento indistintamente, pretenden abarcar prevención, retardo y/o reducción de la probabilidad de aparición de metástasis, así como reducción del número, tasa de crecimiento, tamaño, etc. de las metástasis.

El término "**tratamiento**" se usa en este documento para caracterizar un método o proceso que tiene como objetivo (1) retardar o evitar la aparición de una enfermedad o afección; (2) ralentizar o detener la progresión, agravamiento o deterioro de los síntomas de la enfermedad o afección; (3) conseguir mejora de los síntomas de la enfermedad o afección; o (4) curar la enfermedad o afección. Un tratamiento puede administrarse después del inicio de la enfermedad o afección, para una acción terapéutica. Como alternativa, un tratamiento puede administrarse antes de la aparición de la enfermedad o afección, para una acción profiláctica o preventiva. En este caso, se usa el término "**prevención**".

Una "**composición farmacéutica**" se define en este documento comprendiendo una cantidad eficaz del derivado de exopolisacárido sobresulfatado de bajo peso molecular (LMW) de la invención (es decir, OS-EPS de 15 kDa o GYS15), y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en este documento, la expresión "**cantidad terapéuticamente eficaz**" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto, agente o composición que sea suficiente para cumplir su propósito o propósitos pretendidos, por ejemplo, una respuesta biológica o medicinal deseada en una célula, tejido, sistema o sujeto.

La expresión "**vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un medio transportador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del uno o más ingredientes activos y que no es excesivamente tóxico para el hospedador a la concentración a la que se administra. La expresión incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18.ª Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad).

Los términos "**aproximadamente**" y "**alrededor de**", como se usan en este documento con referencia a un número, generalmente incluyen números que pertenecen a un intervalo de un 10 % en cualquier dirección del número (mayor o menor que el número) salvo que se indique otra cosa o sea evidente de otro modo a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

Descripción detallada de determinadas realizaciones preferidas

Como se menciona anteriormente, la presente invención proporciona un derivado de exopolisacárido sobresulfatado de bajo peso molecular (GYS15) que muestra propiedades antimetastásicas, y el uso de su derivado de exopolisacárido sobresulfatado de bajo peso molecular para la prevención de la formación de metástasis.

5

I - Derivados de exopolisacárido sobresulfatado de bajo peso molecular

La invención se refiere al uso de GYS15, un exopolisacárido sobresulfatado (OS-EPS) de bajo peso molecular (LMW) (15 kDa), que se preparó a partir de un exopolisacárido natural marino (EPS) de la cepa GY785 del género *Alteromonas* (*Alteromonas infernus*). El EPS natural marino de la cepa GY785 se ha descrito previamente (Guezennec *et al.*, Carbohydr. Polym., 1998, 37: 19-24).

10

Los procesos para obtener derivados de polisacárido sobresulfatado de bajo peso molecular a partir del exopolisacárido natural marino de acuerdo con la invención se describen completamente en la solicitud internacional WO 2006/003290, y también por Collic Jouault S. *et al.* en Biochim Biophys Acta 2001, 1528(2-3):pág.141-151, y por Guezennec J. *et al.* en Carbohydrate Polymers 1998, 37(1):pág. 19-24.

15

En la práctica de la presente invención, GYS15 se prepara usando un método que comprende:

20

(a) una etapa que consiste en despolimerización de radicales libres de un exopolisacárido natural marino (EPS) de la cepa GY785 del género *Alteromonas* para obtener un EPS despolimerizado que tiene un peso molecular de 5000 a 100 000 g/mol;

25

(b) una etapa posterior que consiste en la sulfatación del EPS despolimerizado para obtener un EPS despolimerizado sobresulfatado, que comprende añadir al EPS despolimerizado al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener un polisacárido sulfatado que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato entre un 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del EPS despolimerizado sobresulfatado; y
(c) una etapa posterior que consiste en aislar el exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa (GYS15) del EPS despolimerizado sobresulfatado.

30

En determinadas realizaciones, los derivados despolimerizados obtenidos después de la etapa (a) se liofilizan.

En otras realizaciones, la etapa (b) del proceso está seguida por una etapa de diálisis.

35

Durante la primera etapa de despolimerización, el EPS natural puede usarse en una forma líquida, es decir, como se excreta por las bacterias en el medio de cultivo. Preferiblemente, el medio de cultivo se centrifuga y se recoge solamente el sobrenadante que contiene el EPS natural y que está libre de desechos bacterianos. El EPS natural puede recogerse por cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo ultrafiltración en membrana, y después pueden liofilizarse opcionalmente tal cual o en forma de una sal de adición.

40

La etapa que consiste en despolimerización de radicales libres del EPS natural se realiza preferiblemente mediante adición de una solución de un agente oxidante a una mezcla de reacción que comprende el EPS natural, preferiblemente en presencia de un catalizador metálico. El agente oxidante se elige preferiblemente de peróxidos, en particular peróxido de hidrógeno, y perácidos, especialmente ácido peracético y ácido 3-cloroperbenzoico. La adición se realiza preferiblemente de manera continua y con agitación durante un periodo entre 30 minutos y 10 horas. La mezcla de reacción se mantiene preferiblemente a un pH entre 6 y 8, por ejemplo, mediante la adición de un agente basificante tal como hidróxido de sodio, y a una temperatura entre aproximadamente 30 °C y 70 °C en toda la duración de la reacción de despolimerización de radicales libres.

45

50

De acuerdo con una realización específica de la presente invención, en esta etapa, el EPS natural está presente en la mezcla de reacción a una concentración entre aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml de la mezcla de reacción.

55

En realizaciones preferidas, el agente oxidante es una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que tiene preferiblemente una concentración entre aproximadamente un 0,1 % y aproximadamente un 0,5 % en peso, preferiblemente del orden de un 0,1 % a un 0,2 % en peso, y se añade a un caudal de V1/1000 a V1/10 ml/minuto, preferiblemente V1/50 y V1/500 ml/minuto, y más preferiblemente del orden de V1/100 ml/minuto, en el que V1 es el volumen del medio de reacción que contiene un exopolisacárido marino (EPS) al que se añade una solución de peróxido de hidrógeno.

60

Los catalizadores metálicos que pueden usarse durante la etapa de despolimerización se eligen preferiblemente de iones Cu⁺⁺, Fe⁺⁺ y Cr⁺⁺⁺ y el anión Cr₂O₇²⁻, como se describe en particular en la solicitud de patente EP 0 221 977. De acuerdo con una realización específica, el catalizador metálico está presente en la mezcla de reacción a una concentración entre 10⁻³ M y aproximadamente 10⁻¹ M, y preferiblemente a una concentración entre aproximadamente 0,001 M y aproximadamente 0,05 M.

65

El proceso de despolimerización de radicales libres de acuerdo con la invención y como se describe anteriormente

hace posible obtener, en una sola etapa y con un buen rendimiento, derivados de polisacárido homogéneos de bajo peso molecular. En el contexto de la presente invención, la expresión "derivados homogéneos" pretende indicar derivados que, cuando se evalúan usando cromatografía por exclusión de tamaños de alto rendimiento, muestran un solo pico principal que representa una población predominante de cadenas de polisacárido que son homogéneas con respecto al tamaño, caracterizadas por un índice polidispersidad I (M_w/M_n) < 5 , donde M_w es el peso molecular promedio en peso y M_n es el peso molecular promedio en número.

En determinadas realizaciones, cuando la reacción de polimerización está terminada, los derivados de polisacárido obtenidos se reducen usando un agente reductor, para estabilizar las cadenas, cuyos extremos reductores son muy reactivos y, en particular, para evitar la hidrólisis de las cadenas por la reacción de "desprendimiento". La naturaleza de los agentes reductores que pueden usarse a este efecto no es esencial. En particular, el agente reductor puede ser borohidruro de sodio.

El catalizador metálico usado en la etapa de despolimerización puede eliminarse al final de la reacción de despolimerización, (o al final de la reacción de reducción si se realiza una etapa de reducción) usando cualquier método adecuado, por ejemplo por cromatografía de intercambio iónico, preferiblemente una resina de intercambio catiónico débil pasivada de antemano, o por tratamiento con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Los derivados de polisacárido resultantes de la despolimerización y/o de la reducción pueden recuperarse, si fuera necesario, por cualquier técnica adecuada bien conocida por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, ultrafiltración en membrana o diálisis. Después, se liofilizan y fraccionan mediante cromatografía de exclusión por tamaño para aumentar su pureza requerida para mejorar la posterior etapa de sulfatación. Finalmente, los derivados de polisacárido purificados se acondicionan en forma salina por adición de una base débil o fuerte que puede elegirse, por ejemplo, de piridina, trietilamina, tributilamina, hidróxido de tetrabutilamonio e hidróxido de sodio. Esta sal liofilizada puede prepararse, por ejemplo, por elución de una solución acuosa de los derivados de polisacárido a una concentración entre 1 y 8 mg/ml en una columna de resina de intercambio iónico tal como, por ejemplo, las vendidas con el nombre DOWEX® por la empresa Dow Chemical. El eluido se recoge siempre que el pH permanezca ácido, por ejemplo, menos de 5, entonces el pH se ajusta posteriormente hasta aproximadamente 6,5 con la base deseada como se define anteriormente. Los derivados de polisacárido en forma de sal entonces se ultrafiltran y liofilizan.

Los derivados de polisacárido liofilizados, posiblemente en forma de una sal de adición, se disuelven preferiblemente en un disolvente anhidro al inicio de la etapa de sulfatación. El disolvente se elige preferiblemente de dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), formamida y mezcla de los mismos. La cantidad de derivados de polisacárido presentes en el disolvente anhidro puede ser entre aproximadamente 1 y 10 mg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml e incluso más preferiblemente esta cantidad es aproximadamente 2,5 mg/ml. La disolución del EPS en el disolvente anhidro se realiza preferiblemente, con agitación, a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas y después a una temperatura entre 40 °C y 50 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 45 °C durante aproximadamente 2 horas en atmósfera de argón o nitrógeno con tamiz molecular.

El uno o más agentes químicos de sulfatación usados durante la etapa de sulfatación pueden añadirse a los EPS despolimerizados y/o reducidos que están en forma liofilizada o en forma de una solución.

Los agentes de sulfatación se eligen preferiblemente de complejos de sulfato de piridina (libre o acoplado a un polímero), de sulfato de dimetilformamida, sulfato de trietilamina y de sulfato de trimetilamina. El uno o más agentes químicos de sulfatación se añaden a la solución de derivados de polisacárido en una cantidad ponderal preferiblemente que preferiblemente representa de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 veces, e incluso más preferiblemente aproximadamente 5 veces, la masa de derivados de polisacárido en solución. La reacción química de sulfatación entonces se realiza preferiblemente con agitación durante un periodo entre 2 y 24 horas dependiendo del grado deseado de sulfatación. Cuando se alcanza el grado deseado de sulfatación, la reacción de sulfatación se detiene después de enfriar el medio de reacción:

- por precipitación en presencia de acetona saturada de cloruro de sodio o de metanol, y después disolución del precipitado en agua;
- o, preferiblemente, por adición de agua en una proporción preferiblemente igual a 1/10 del volumen de reacción y ajuste del pH del medio de reacción a 9 con un agente basificante tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio (3 M).

De acuerdo con determinadas realizaciones, la solución de derivados de polisacárido sulfatados se dializa preferiblemente para retirar las diversas sales, y después se liofiliza. El producto final (es decir, GYS15), típicamente con un peso molecular preciso y un bajo índice de polidispersidad, se obtiene por aislamiento del EPS despolimerizado de bajo peso molecular obtenido. El aislamiento puede realizarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente, el aislamiento se realiza por fraccionamiento realizado por cromatografía de exclusión por tamaño.

GYS15 de acuerdo con la presente invención tiene un bajo índice de polidispersidad de menos de 5, preferiblemente de 1,5 a 4, más preferiblemente de menos de 2. El índice de polidispersidad (PDI) de acuerdo con la invención es una

medida de la distribución de la masa molecular de los derivados. El PDI calculado es el peso molecular promedio en peso dividido por el peso molecular promedio en número. El PDI se mide típicamente por cromatografía de exclusión por tamaño.

- 5 GYS15 de acuerdo con la invención tiene un grado de sustitución de grupos sulfato entre 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del derivado de polisacárido sulfatado. En determinadas realizaciones, el grado de sustitución de grupos sulfato es entre un 10 % y un 40 %, entre un 20 % y un 45 % o entre un 20 % y un 40 %.

10 II - Usos del derivado de OS-EPS de bajo peso molecular

1 - Aplicaciones terapéuticas

A. Indicaciones

- 15 El derivado de GYS de la presente invención puede usarse en la prevención o inhibición de la formación de metástasis en un sujeto.

Los métodos de prevención de la presente invención pueden conseguirse usando GYS15 o una composición farmacéutica del mismo. Estos métodos en general comprenden la administración de una cantidad eficaz de GYS15 (como se define anteriormente) o una composición farmacéutica del mismo, a un sujeto que lo necesite. La administración puede realizarse usando cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia. En particular, GYS15, o una composición del mismo, puede administrarse por cualquiera de diversas vías incluyendo, aunque sin limitación, por aerosol, vía parenteral, oral o tópica.

- 25 En general, el sujeto es un paciente humano con cáncer. El paciente con cáncer puede padecer un cáncer o ha experimentado previamente tratamiento del cáncer.

En la práctica de la presente invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer desarrollado en cualquier tejido de cualquier órgano. Por tanto, el cáncer puede ser un carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos de cánceres incluyen, aunque sin limitación, cáncer óseo, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductores, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma de pituitaria. En determinadas realizaciones, el cáncer es osteocarcinoma.

En general, GYS15, o una composición del mismo, se administrará en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad que sea suficiente para cumplir su propósito pretendido. La cantidad exacta de GYS15, o composición farmacéutica, a administrar variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, el sexo, el peso y el estado de salud general del sujeto, la respuesta biológica o médica deseada y similares. En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz es una que evita, retarda y/o reduce la probabilidad de aparición de formación de metástasis y/o una que reduce el número, tasa de crecimiento, tamaño, etc. de las metástasis si ya están presentes metástasis en el sujeto. Los efectos de un tratamiento de acuerdo con la invención pueden supervisarse usando cualquiera de los ensayos de diagnóstico, pruebas y procedimientos conocidos en la técnica.

En determinadas realizaciones, GYS15, o una composición del mismo, se administra en solitario de acuerdo con un método de prevención de acuerdo con la presente invención. En otras realizaciones, GYS15, o una composición del mismo, se administra en combinación con al menos un agente terapéutico adicional o procedimiento terapéutico. GYS15, o una composición del mismo, puede administrarse antes de la administración del agente terapéutico o procedimiento terapéutico, simultáneamente con el agente terapéutico o procedimiento, y/o después de la administración del agente terapéutico o procedimiento.

Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con GYS15, o una composición del mismo, pueden seleccionarse entre una gran diversidad de compuestos biológicamente activos que son conocidos por tener un efecto beneficioso en el tratamiento del cáncer o para un paciente en general (por ejemplo, agente antineoplásicos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos y combinaciones de los mismos). Los procedimientos terapéuticos que pueden realizarse en combinación con la administración de GYS15, o una composición del mismo, incluyen, aunque sin limitación, cirugía, radioterapia y similares.

Los agentes antineoplásicos que pueden administrarse en combinación con GYS15, o una composición del mismo, incluyen fármacos clasificados convencionalmente en uno de los siguientes grupos: agentes alquilantes, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, alcaloides vegetales, antibióticos intercalantes, inhibidores de la aromatasas, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas,

inhibidores de la topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas y antiandrógenos. Ejemplos de dichos agentes antineoplásicos incluyen, aunque sin limitación, BCNU, cisplatino, gemcitabina, hidroxiurea, paclitaxel, temozolomida, topotecán, fluorouracilo, vincristina, vinblastina, procarbazona, decarbazina, altretamina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, fosfato de fludarabina, cladribina, pentostatina, citarabina, azacitidina, etopósido, tenipósido, irinotecán, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, dactinomicina, idarrubicina, plicamicina, mitomicina, bleomicina, tamoxifeno, flutamida, leuprolida, goserelina, aminoglutimida, anastrozol, amsacrina, asparaginasa, mitoxantrona, mitotano y amifostina.

Otros ejemplos de dichos agentes antineoplásicos incluyen anticuerpos terapéuticos usados en el tratamiento del cáncer, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos antiCD52 tal como alemtuzumab (CAMPATH™), que se usa en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica; anticuerpos antiVEGF incluyendo bevacizumab (AVASTIN™) que se usa en el tratamiento de cáncer colorrectal y cáncer de mama; anticuerpos antiCD33, incluyendo gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG™) que se usa en el tratamiento de leucemia mieloide aguda; anticuerpos antiCD20 incluyendo ibritumomab (ZEVALIN™) que se usa en el tratamiento de linfoma, rituximab (RITUXAN™) que se usa en el tratamiento de linfoma de Hodgkin, tositumomab (BEXXAR™) que se usa en el tratamiento de linfoma de Hodgkin y ofatumumab (ARZERRA™) que se usa en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica; anticuerpos antiEGFR tales como cetuximab (ERBITUX™) que se usa en el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y carcinoma escamocelular, panitumumab (VECTIBEX™) que se usa en el tratamiento de cáncer colorrectal; anticuerpos antiHer2, incluyendo trastuzumab (HERCEPTIN™) que se usa en el tratamiento de cáncer de mama y cáncer de estómago; anticuerpos antiCTLA4 incluyendo ipilimumab (YERVOY™) que se usa en el tratamiento de melanoma; adnectinas; y anticuerpos de dominio. Los fragmentos activos y fusiones de estos anticuerpos también encuentran uso en este documento.

B. Administración

GYS15 (opcionalmente después de formulación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados), en una dosificación deseada pueden administrarse a un sujeto que lo necesita por cualquier vía adecuada. Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden usarse para administrar el derivado de GYS de la presente invención, incluyendo comprimidos, cápsulas, soluciones inyectables, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, etc. Los métodos de administración incluyen, aunque sin limitación, vía dérmica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intralesional, intravenosa, subcutánea, intranasal, pulmonar, epidural, ocular y oral. GYS15, o una composición del mismo, puede administrarse por cualquier vía conveniente u otra vía apropiada, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. La administración parenteral puede estar dirigida a un tejido dado del paciente, tal como por cateterización. Como apreciarán los expertos en la materia, en realizaciones donde GYS15 se administra junto con un agente terapéutico adicional, GYS15 y el agente terapéutico pueden administrarse por la misma vía (por ejemplo por vía oral) o por diferentes vías (por ejemplo, por vía oral o intravenosa).

C. Dosificación

La administración de GYS15 (o una composición del mismo) de acuerdo con la presente invención será en una dosificación de modo que la cantidad suministrada sea eficaz para el uso pretendido. La vía de administración, formulación y dosificación administrada dependerán del efecto terapéutico deseado, la gravedad del trastorno que se esté tratando, de la presencia de cualquier infección, la edad, el sexo, peso y estado de salud general del paciente, así como la potencia, biodisponibilidad y semivida *in vivo* del GYS15, del uso (o no) de tratamientos concomitantes y de otros factores clínicos. Estos factores los determina fácilmente el médico de cabecera durante el transcurso del tratamiento. Como alternativa o adicionalmente, la dosificación a administrar puede determinarse a partir de estudios usando modelos animales. El ajuste de la dosis para conseguir la eficacia máxima basándose en estos u otros métodos es bien conocido en la técnica y pertenece a las capacidades de los médicos formados. Según se realicen estudios usando GYS15, surgirá información adicional sobre los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento.

Un tratamiento de acuerdo con la invención puede consistir en una sola dosis o en múltiples dosis. Por tanto, la administración de GYS15, o una composición del mismo, puede ser constante durante un determinado periodo de tiempo o periódica y a intervalos específicos, por ejemplo, por hora, diariamente, semanalmente (o en algún otro intervalo de múltiples días); mensualmente, anualmente (por ejemplo, en forma de liberación lenta). Como alternativa, el suministro puede producirse en múltiples momentos durante un periodo de tiempo dado, por ejemplo, dos o más veces a la semana, dos o más veces al mes y similares. El suministro puede ser suministro continuo durante un periodo de tiempo, por ejemplo, suministro intravenoso.

III - Composiciones farmacéuticas

Como se menciona anteriormente, el derivado de GYS de la invención puede administrarse *per se* o como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de GYS15 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En

algunas realizaciones, la composición comprende además uno o más agentes biológicamente activos adicionales.

GYS15, o composiciones farmacéuticas del mismo, puede administrarse en cualquier cantidad y usando cualquier vía de administración eficaz para conseguir el efecto profiláctico y/o terapéutico deseado. La formulación farmacéutica óptima puede variarse dependiendo de la vía de administración y dosificación deseada. Dichas formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de eliminación *in vivo* del ingrediente activo administrado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma farmacéutica unitaria", como se usa en este documento, se refiere a una unidad físicamente diferenciada para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que la dosificación diaria total de las composiciones la decidirá el médico especialista dentro del alcance del buen criterio médico.

15 **A. Formulación**

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico aceptable por vía parenteral, por ejemplo, como una solución en 2,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como solución o medio de suspensión. Para este propósito puede emplearse cualquier aceite fijo blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. También pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de formulaciones inyectables. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones en forma líquida estéril para administración parenteral.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o mediante incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso. Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles pueden administrarse por, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. La inyección puede ser mediante una sola embolada o por infusión gradual. Cuando sea necesario o se desee, la composición puede incluir un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Para prolongar el efecto de un ingrediente activo, a menudo es deseable ralentizar la absorción del ingrediente de inyección subcutánea o intramuscular. Retardar la absorción de un ingrediente activo administrado por vía parenteral puede conseguirse disolviendo o suspendiendo el ingrediente en un vehículo oleoso. Se preparan formas inyectables de efecto prolongado formando matrices microencapsuladas del ingrediente activo en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la relación de ingrediente activo respecto al polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la tasa de liberación del ingrediente. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de efecto prolongado también se preparan atrapando el ingrediente activo en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, aunque sin limitación, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. Además del derivado de GYS, la forma farmacéutica líquida puede contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otro disolvente, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes de suspensión, conservantes, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizadores u osmorreguladores. Ejemplos de vehículos líquidos adecuados para administración oral incluyen agua (que contiene potencialmente aditivos como anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, tales como solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos tales como glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de *Arachis*). Para composiciones presurizadas, el vehículo líquido puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el derivado de GYS innovador puede mezclarse con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y uno o más de: (a) rellenos o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma

arábica; (c) humectantes tales como glicerol; (d) agentes disgregantes tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (e) agentes retardadores de la solución tales como parafina; aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; e (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. Otros excipientes adecuados para formulaciones sólidas incluyen agentes modificadores de la superficie, tales como agentes modificadores de la superficie no iónicos y aniónicos. Ejemplos representativos de agentes modificadores de la superficie incluyen, aunque sin limitación, poloxámero 188, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetosteárico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, silicato de aluminio y magnesio y trietanolamina. En el caso de cápsulas, comprimidos y pastillas, la forma farmacéutica también puede comprender agentes tamponantes.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina de relleno blando y duro usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición tal que liberen el ingrediente o ingredientes activos única, o preferiblemente, en una parte determinada del tubo intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable administrar una composición innovadora de forma local a una zona específica. Esto puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un parche dérmico o *stent* u otro implante.

Para administración tópica, la composición se formula, preferiblemente, como un gel, una pomada, una loción o una crema que puede incluir vehículos tales como agua, glicerol, alcohol, propilenglicol, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres de ácidos grasos o aceite de vaselina. Otros vehículos tópicos incluyen petróleo líquido, palmitato de isopropilo, polietilenglicol, etanol (95 %), monolaurato de polioxietileno (5 %) en agua o laurilsulfato de sodio (5 %) en agua. Otros materiales tales como antioxidantes, humectantes, estabilizantes de la viscosidad y agentes similares pueden añadirse según sea necesario.

Además, en determinados casos, se espera que las composiciones innovadoras se puedan disponer dentro de dispositivos transdérmicos colocados sobre, en o debajo de la piel. Dichos dispositivos incluyen parches, implantes e inyecciones que liberan el ingrediente activo mediante mecanismos de liberación pasiva o activa. Las administraciones transdérmicas incluyen toda administración a través de la superficie del cuerpo y de los revestimientos interiores del paso corporal incluyendo tejidos epiteliales y mucosos. Dichas administraciones pueden realizarse usando las presentes composiciones en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones y supositorios (rectales y vaginales).

La administración transdérmica puede conseguirse a través del uso de un parche transdérmico que contiene un ingrediente activo (es decir, el derivado de GYS) y un vehículo que sea atóxico para la piel, y permita el suministro del ingrediente para absorción sistémica en el torrente sanguíneo a través de la piel. El vehículo puede adoptar multitud de formas, tales como cremas y pomadas, pastas, geles y dispositivos oclusivos. Las cremas y pomadas pueden ser emulsiones líquidas viscosas o semisólidas del tipo de aceite en agua o agua en aceite. Pueden ser adecuadas las pastas compuestas por polvos absorbentes dispersos en petróleo o petróleo hidrófilo que contienen el ingrediente activo. Puede usarse una diversidad de dispositivos oclusivos para liberar el ingrediente activo en el torrente sanguíneo, tal como una membrana semipermeable que cubre un depósito que contiene el ingrediente activo con o sin un vehículo, o una matriz que contiene el ingrediente activo.

Las formulaciones de supositorio pueden fabricarse a partir de materiales tradicionales, incluyendo manteca de cacao, con o sin la adición de ceras para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. Las bases de supositorio solubles en agua, tales como polietilenglicoles de diversos pesos moleculares, también pueden usarse.

Los materiales y métodos para producir diversas formulaciones se conocen en la técnica y pueden adaptarse para poner en práctica la invención objeto. Las formulaciones adecuadas para el suministro de anticuerpos pueden encontrarse, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18.^a Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA.

B. Agentes biológicamente activos adicionales

En determinadas realizaciones, GYS15 es el único ingrediente activo en una composición farmacéutica de la presente invención. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende además uno o más agentes biológicamente activos. Ejemplos de agentes biológicamente activos adecuados incluyen, aunque sin limitación, agentes

antineoplásicos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos y combinaciones de los mismos. Ejemplos de agentes antineoplásicos específicos, incluyendo anticuerpos antineoplásicos se han enumerado anteriormente.

- 5 En dichas composiciones farmacéuticas, el derivado de GYS y el al menos un agente terapéutico adicional pueden combinarse en una o más preparaciones para administración simultánea, separada o secuencial del derivado de GYS y uno o más agentes terapéuticos. Más específicamente, una composición innovadora puede formularse de tal modo que el derivado de GYS y el agente o agentes terapéuticos puedan administrarse conjuntamente o independientemente entre sí. Por ejemplo, el derivado de GYS y un agente terapéutico pueden formularse conjuntamente en una sola composición. Como alternativa, pueden mantenerse (por ejemplo, en diferentes composiciones y/o recipientes) y administrarse por separado.

C. Paquetes o kits farmacéuticos

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes (por ejemplo, viales, ampollas, tubos de ensayo, matraces o frascos) que contienen uno o más ingredientes de una composición farmacéutica innovadora, que permite la administración del derivado de GYS de la presente invención.

- 20 Los diferentes ingredientes de un paquete o kit farmacéutico pueden suministrarse en una forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Cada ingrediente en general será adecuado como alícuotas en su recipiente respectivo o se proporcionará en forma concentrada. Los paquetes o kits de acuerdo con la invención pueden incluir medios para la reconstitución de ingredientes liofilizados. Los recipientes individuales de los kits se mantendrán preferiblemente en confinamiento cercano para la venta comercial.

- 25 En determinadas realizaciones, un paquete o kit incluye uno o más agentes terapéuticos adicionales. Opcionalmente asociado con el recipiente o recipientes puede haber un aviso o prospecto en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración a seres humanos. El aviso del prospecto puede contener instrucciones para el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con métodos de tratamiento divulgados en estos documentos.

- 30 Un identificador, por ejemplo, un código de barras, radiofrecuencia, etiquetas ID, etc., puede estar presente en o sobre el kit. El identificador se puede usar, por ejemplo, para identificar de forma particular el kit con fines de control de calidad, control de inventario, seguimiento del movimiento entre puestos de trabajo, etc.

Aspectos y ventajas adicionales de esta invención se divulgarán en las siguientes figuras y ejemplos, que deben considerarse ilustrativos y no limitantes del alcance de esta solicitud.

40 D Descripción de las figuras

- Figura 1:** Comparación de los efectos de derivados de OS-EPS LMW con diferentes pesos moleculares sobre dos líneas celulares de osteosarcoma, la línea celular de ratón POS-1 y la línea celular humana HOS. **(A)** Proliferación de ambas líneas celulares después de 7 días de tratamiento. **(B)** Cinética de actividad biológica de dosis crecientes de GYS15 sobre la proliferación de células HOS. Se realizaron ensayos de proliferación por recuento celular con azul tripano para comparar la tasa de proliferación celular entre grupos. OS-EPS 15 kDa (GYS15), OS-EPS 8 kDa (GYS8), OS-EPS 4 kDa (GYS4), heparina (Hep) y control (CT). *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001.

- Figura 2:** Migración de células de la línea celular humana HOS en presencia de diferentes derivados de OS-EPS LMW (300 µg/ml): OS-EPS 15 kDa (GYS15), OS-EPS 8 kDa (GYS8), OS-EPS 4 kDa (GYS4), heparina (Hep) y control (CT).

- Figura 3:** Invasión de líneas celulares de osteosarcoma, la línea celular de ratón POS-1 y la línea celular humana HOS, en presencia de derivados de OS-EPS LMW con diferentes pesos moleculares: 25 µg/ml de OS-EPS 15 kDa (GYS15), 50 µg/ml de OS-EPS 8 kDa (GYS8), 50 µg/ml de OS-EPS 4 kDa (GYS4), 50 µg/ml de heparina (Hep) y control (CT). **(A)** Imágenes microscópicas de células HOS invasivas tratadas o no con GYS15 o heparina. **(B)** Las células que migran a través de las cámaras de Boyden se contaron en 5 campos microscópicos usando el programa informático Image J. *p < 0,05; *** p < 0,01.

- Figura 4:** Efecto del derivado de OS-EPS LMW 15 kDa (GYS15) (300 µg/ml) sobre el ciclo celular de líneas celulares de osteosarcoma. Se estudió la distribución del ciclo celular de células HOS humanas y POS-1 de ratón por citometría de flujo después de 24 horas o 48 horas de tratamiento con GYS15.

- Figura 5:** Efecto del derivado de OS-EPS LMW 15 kDa (GYS15) sobre la expresión de *MMP-2* y *MMP-9* y sus inhibidores (*TIMP-1* y *TIMP-2*) en comparación con heparina en células de la línea celular humana HOS. Las células de osteosarcoma se trataron 1 hora, 3 horas, 6 horas, 8 horas o 24 horas con GYS15 o heparina a una

concentración de 50 µg/ml o con PBS (control). La expresión celular de MMP y sus inhibidores en el sobrenadante de células de osteosarcoma se determinó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

5 **Figura 6:** Efecto del derivado de OS-EPS LMW 15 kDa (GYS15) sobre el crecimiento tumoral de osteosarcoma HOS *in vivo*. Se inocularon 22×10^6 células HOS en la zona paratibial de un modelo de ratón. Cuando el volumen tumoral alcanzó 100 mm³, se inyectó GYS15 (2 mg/kg al día o 6 mg/kg al día) por vía subcutánea cada día y se midió el crecimiento tumoral desde el día 5 hasta el día 35.

10 **Figura 7:** Efecto de derivado de OS-EPS LMW 15 kDa (GYS15) sobre la incidencia metastásica pulmonar. **(A)** Incidencia metastásica en animales tratados (GYS15 o heparina; s.c. 6 mg/kg al día) frente al control (PBS) en porcentaje. **(B)** Análisis histológicos del tejido pulmonar de animales tratados o animales de control (* focos metastásicos), aumento original: x400. **(C)** Tasa de supervivencia (%) de animales tratados (GYS15 o heparina) en comparación con el grupo de control (PBS), curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. N = 7 ratones/grupo; p < 0,05; p < 0,001.

15

Descripción detallada de la invención

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos para preparar y poner en práctica la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Además, salvo que la descripción en un ejemplo se presente en tiempo pasado, el texto, como el resto de la memoria descriptiva, no pretende sugerir que los experimentos se realizaran realmente o que los datos se obtuvieran realmente.

20

Materiales y métodos

25

General

Se produjo el exopolisacárido (EPS) GY785 bacteriano, se purificó y caracterizó como se describe previamente (Guezennec *et al.*, Carbohydr. Polym., 1998, 37: 19-24). La preparación, purificación y caracterización de los derivados de EPS sobresulfatados (OS) de bajo peso molecular (LMW) se realizaron como se presenta previamente (Ruiz Velasco *et al.*, Glycobiology, 2011, 21: 781-795; documento WO 2006/003290). En resumen, en primer lugar se despolimerizó EPS GY785 de alto peso molecular (HMW) natural usando un proceso de despolimerización de radicales libres para obtener derivados LMW con diferentes pesos moleculares. Los derivados de EPS GY785 LMW entonces se sulfataron en dimetilformamida (DMF) usando sulfato de piridina como agente de sulfatación dando lugar a derivados de OS-EPS LMW. Se determinaron los pesos moleculares (Mw) antes y después de la sulfatación por HPSECMALS y el contenido de azufre (% en peso de S) por cromatografía HPAEC. Se usaron ATR-FTIR y espectroscopia de RMN para evaluar la eficacia de la reacción de sulfatación. La sal sódica de heparina de mucosa intestinal porcina H4784 se adquirió de Sigma.

40

Ensayos de proliferación

Se cultivaron células de la línea celular POS-1 en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Biowhittaker) con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Hyclone, Francia). Se cultivaron células de la línea celular KHOS/NP (HOS, (ATCC, EE. UU.)) en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Biowhittaker) con FBS al 5 %. Las células, inicialmente sembradas a la concentración de 50×10^3 células/cm² se incubaron a 37 °C con atmósfera controlada de humedad saturada y 5 % de CO₂. En la confluencia, las células se desprendieron usando tripsina-EDTA (Biowhittaker, tripsina: 0,5 g/l; EDTA (ácido etilendiaminetetraacético): 0,2 g/l). La tripsina se neutralizó añadiendo medio que contenía FBS y las células se recogieron después de centrifugación a 400 g. Las células de las líneas celulares POS-1 y HOS se sembraron por triplicado a 2000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos con 500 µl de medio y se trataron en presencia de GYS4 o GYS8 o GYS15 (25, 50 o 100 µg/ml) o con PBS (control). Se realizaron ensayos de proliferación contando manualmente las células vivas usando una célula de Malassez con azul tripano para comparar la tasa de proliferación celular entre grupos.

55

Ensayos de migración

Las células sembradas (4×10^5) en placas de 6 pocillos por duplicado se trataron con mitomicina C (Sigma - 4 µg/ml durante 1 hora) para bloquear la proliferación celular y se evaluó la migración de las células en presencia de GYS4 o GYS8 o GYS15 (25 o 50 µg/ml) o con PBS (control). En la confluencia, las células se rasparon cuidadosamente para crear un hueco. Se adquirieron imágenes del hueco usando una cámara Olympus DP12-2 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) inmediatamente después de empezar la incubación y 24 horas, 48 horas y 72 horas después de empezar la incubación.

60

Ensayos de invasión

65 La invasión de las células cultivadas (POS-1 y HOS) se analizó usando cámaras de Boyden (poros de 8 µm, Becton Dickinson Labware) cubiertas con una membrana de tereftalato de polietileno con recubrimiento de MATRIGEL®

(2 µg/100 µl/pocillo en PBS frío) en placa de 24 pocillos (MULTIWELL™ 24, FALCON®). Los derivados de OS-EPS LMW de 4 u 8 o 15 kDa (25, 50, 100 o 200 µg/ml) se añadieron al Matrigel 30 minutos antes de la siembra de las células. Se sembraron células tratadas previamente con mitomicina C (Sigma - 4 µg/ml durante 1 hora) en el compartimiento superior de cubetas de 500 µl en medio de FBS al 1 % (2 x 10⁴ células POS-1 o 3 x 10⁴ células HOS) y se dejaron durante una incubación de 24 horas a 37 °C en atmósfera humidificada de 5 % de CO₂. Los pocillos inferiores en el sistema se llenaron con medio de FBS al 10 % (700 µl) como quimioatrayente. Al final del periodo de 24 horas, se retiraron las células no invasivas con hisopos de algodón y las células invasoras presentes en la superficie inferior de la membrana se fijaron con PFA (paraformaldehído) al 3 % y se tiñeron con azul de metileno. Después del secado, las células invasivas se contaron en 5 campos microscópicos usando el programa informático Image J (Leica). Todos los experimentos se realizaron 3 veces por duplicado. La invasión se expresa mediante el número medio de células/campo.

Análisis del ciclo celular

Las células se incubaron durante 24 horas, 48 horas o 72 horas en medio que contenía o no derivados de OS-EPS LMW. Después del periodo de incubación, las células tratadas con tripsina se incubaron en solución salina tamponada con fosfato que contenía Triton X-100 al 0,12 %, 0,12 mmol/l de ácido etilendiaminatetraacético y 100 µg/ml de RNasa A sin DNasa (Sigma). Después, se añadieron 50 µg/ml de yoduro de propidio, y las células se incubaron durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad. Se estudió la distribución del ciclo celular por citometría de flujo (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Roissy, Francia) basada en el contenido de ADN 2 N y 4 N y se analizó usando el programa informático DNA Cell Cycle Analysis (Phoenix Flow Systems, San Diego, Calif) (Kapp *et al.*, Expert Opin. Ther. Pat. 2013, 23: 1273-1295).

Expresión de metaloproteínasa de matriz

Las células se sembraron (5 x 10⁵) en placas de Petri (diámetro de 60 mm) en 3 ml de medio con FBS. En la confluencia, las células se trataron 1 hora, 3 horas, 6 horas, 8 horas o 24 horas con el derivado de OS-EPS LMW 15 kDa, GYS15, o heparina a 50 µg/ml o con PBS (control). Se determinó la expresión de la metaloproteínasa de matriz (MMP) e inhibidores de la metaloproteínasa (TIMP) por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). El ARN se extrajo usando NucleoSpin RNAII (Macherey Nagel, Duren, Alemania) y se usó para la síntesis de ADNc de primera hebra usando sistema de reacción en cadena de la polimerasa instantánea (RT-PCR) ThermoScript (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó con un instrumento Chromo4 (Biorad, Richmond, CA, EE. UU.) usando reactivos SYBR Green Supermix (Biorad).

Ética sobre animales

Todos los procedimientos que implicaban animales se realizaron de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y el Consejo de 22 de septiembre de 2010 sobre la protección de animales usados con fines científicos. Los protocolos presentados en este estudio los aprobó el comité ético francés (CEEA Pdl. 06) con el número de protocolo 2010.34 y bajo la supervisión de los investigadores autorizados. Ratones NMRI-atímicos macho de cuatro semanas de edad [n = 6] y ratones C3H/HeN macho de cuatro semanas de edad [n = 7] de Elevages Janvier (Le Genest Saint Isle, Francia) se mantuvieron en condiciones sin patógenos en la Unidad de Tratamiento Experimental (Facultad de Medicina, Nantes, Francia) de acuerdo con las directrices institucionales del comité ético francés (CEEA Pays de la Loire - 06).

Modelo de ratón de osteosarcoma

Ratones NMRI-atímicos macho de cuatro semanas de edad [n = 6 por grupo] se anestesiaron por inhalación de una mezcla de isoflurano/aire (1,5 %, 1 l/min) antes de recibir una inyección intramuscular de 2 x 10⁶ células HOS en la zona paratibial (en 50 µl de tapón PBS) (Moriceau *et al.*, Cancer, 2012, 118: 750-760). Asimismo, se inocularon 1,5 x 10⁶ células POS-1 [n = 6 por grupo] en ratones C57BL/6 hembra de cuatro semanas de edad (Ségaligny *et al.*, "Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment", Int. J. Cancer, 2015, en impresión). Aparecieron tumores en el sitio de inyección 8 días después. Se calculó el volumen tumoral (V) a partir de la medición de dos diámetros perpendiculares usando un calibre, de acuerdo con la siguiente fórmula: $V = 0,5 \times L \times (S)^2$, en la que L y S son, respectivamente, los diámetros más grande y más pequeño perpendiculares del tumor. Se realizó un protocolo curativo, cuando el volumen tumoral alcanzó 100 mm³, los ratones se trataron con PBS (control) o con el derivado de OS-EPS LMW. Los polisacáridos diluidos en tampón PBS (50 µl) se inyectaron por vía subcutánea cada día a 2 mg/kg o 6 mg/kg y se midió el crecimiento tumoral desde el día 5 hasta el día 35. Este modelo de ratón (modelo paratibial) se prefirió al modelo que usan inyección de células tumorales directamente en la tibia (modelo intratibial) porque las lesiones óseas eran muy similares al final del experimento en los dos modelos y porque los resultados eran más reproducibles en el primer modelo (es decir, el modelo paratibial). Además, el modelo paratibial imita más estrechamente las lesiones óseas observadas en seres humanos.

65

Modelo de ratón de metástasis pulmonar

Para estudiar el efecto de derivados de OS-EPS LMW sobre la capacidad metastásica de osteosarcoma, se inyectaron $1,5 \times 10^5$ células POS-1 usando la técnica de inyección retroorbitaria del seno venoso (Ory *et al.*, Cancer, 2005, 104: 2522-2529). Los ratones se anestesiaron por inhalación de una combinación de isoflurano/aire (1,5 %, 1 l/min) y recibieron buprenorfina después de la inyección de células tumorales (0,05 mg/kg; TEMGESIC®, Schering-Plough).

- 5 Se estableció un protocolo preventivo con ratones C3H/HeN macho de cuatro semanas de edad [n = 7 por grupo] divididos en 3 grupos de tratamiento: PBS, heparina y GYS15. Se realizó una primera inyección subcutánea (12 mg/kg de GYS15 o heparina en 50 μ l de PBS) 30 minutos antes de la inyección de células POS-1. Después, se realizaron 4 inyecciones subcutáneas diariamente a 6 mg/kg para GYS15 o heparina. Se sacrificó a los ratones cuando los ratones mostraron signos de desarrollo de metástasis (dificultad respiratoria, debilidad, pérdida de peso, cifosis dorsal). Se
- 10 recogieron los pulmones para análisis histológico y análisis macroscópico: los pulmones se clasificaron de acuerdo con el tamaño (grande o pequeño) de las metástasis.

Análisis estadístico

- 15 Todos los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces. Los números de células por recuentos medios de campo se compararon mediante un ensayo de Wilcoxon no paramétrico. Los volúmenes tumorales medios se compararon usando el ensayo de Kruskal-Wallis. La variable categórica de tamaño de las metástasis pulmonares se analizó por ensayo exacto de Fisher. La diferencia se consideró significativa a $p < 0,05$.

20 Resultados**Efecto *in vitro* de OS-EPS LMW en líneas celulares de osteosarcoma**

- 25 **Proliferación celular y viabilidad celular.** En comparación con los controles, solamente GYS4 y GYS15 inhibieron significativamente la proliferación celular tanto de POS-1 de ratón como de HOS humanas. Se descubrió que el derivado de OS-EPS LMW más potente para inhibir la proliferación de líneas celulares de osteosarcoma era GYS4 (figura 1A). GYS8 fue igual de potente que la heparina para inhibir la proliferación celular de POS-1, pero no actuaba tan eficazmente sobre células de la línea celular HOS (figura 1A). Aunque 3 días de tratamiento con GYS15 no provocó ningún efecto significativo sobre la proliferación celular de HOS, 25 μ g/ml de GYS15 disminuyó notablemente la
- 30 proliferación celular de HOS después de 7 días de tratamiento (figura 1B). En términos de viabilidad celular, no se observó diferencia significativa entre todos los compuestos ensayados en comparación con los controles (datos no mostrados). Basándose en estos resultados, puede elaborarse la hipótesis de que los derivados de OS-EPS LMW (GYS4 y GYS8) ejercen sus actividades a través de un efecto indirecto que requiere la liberación de un segundo mensajero biológico. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos con un OS-EPS de 24 kDa en células
- 35 osteoblásticas (Ruiz Velasco *et al.*, Glycobiology, 2011,21: 781-795).

- Migración celular.** Los autores de la presente invención han investigado los efectos de los derivados de OS-EPS LMW sobre la migración celular de osteosarcoma usando un ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*. Se descubrió que todos los compuestos evaluados (GYS4, GYS8, GYS15 y heparina) inhibían la migración de células murinas de
- 40 osteosarcoma POS-1 (datos no mostrados). En contraste con esta línea celular, solamente GYS4 y GYS15 mostraron la capacidad de inhibir la migración de células humanas de osteosarcoma HOS (figura 2), en particular, se descubrió que GYS15 ralentizaba fuertemente la migración de células HOS en comparación con los otros compuestos.

- Se admite que la heparina, que se administra en general como un anticoagulante, tiene una diversidad de actividades biológicas adicionales especialmente sobre células cancerosas (Laubli *et al.*, Cancer Invest., 2009, 27: 474-481; Falanga *et al.*, Semin. Thromb. Hemost., 2007, 33: 688-694). Las evidencias experimentales *in vitro* e *in vivo* demostraron que la heparina es un inhibidor eficaz de la migración celular, la adhesión y la metástasis (Laubli *et al.*, Cancer Invest., 2009, 27: 474-481). Pueden estar implicadas rutas moleculares comunes con la formación de trombos de plaquetas-células tumorales tales como la inhibición de heparanasa o P-/L-selectina en esta actividad (Fritze *et al.*,
- 50 Biochem. Pharmacol., 2006, 72: 474-485). En contraste con la heparina, los derivados de OS-EPS LMW evaluados en el presente trabajo inhibieron la migración celular de osteosarcoma, lo que sugiere un mecanismo de acción que es independiente de la heparanasa y selectina. Se pueden elaborar hipótesis sobre los mecanismos que asocian la inhibición de la actividad integrina (Kapp *et al.*, Expert Opin. Ther. Pat., 2013, 23: 1273-1295).

- 55 **Invasión celular.** Contrario a los otros compuestos, se descubrió que solamente GYS15 inhibía la capacidad de invasión de las células de osteosarcoma con una tasa de inhibición cercana a un 90 % después de 24 horas (figura 3A). Este efecto se observó tanto para la línea celular de ratón POS-1 como para la línea celular humana HOS a una concentración de 25 μ g/ml (figura 3B).

- 60 **Ciclo celular.** A la concentración de 300 μ g/ml, GYS15 no tuvo efecto significativo sobre el ciclo celular de las líneas celulares de ratón POS-1 y humana HOS (figura 4). La heparina no tuvo efectos sobre el ciclo celular a la misma concentración (datos no mostrados). Se obtuvieron datos similares después de 72 horas de tratamiento (datos no mostrados).

- 65 **Expresión en línea celular humana de osteosarcoma (HOS) de metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMP)**

Como se descubrió que GYS15 modulaba la migración e invasión de células humanas de osteosarcoma HOS, los autores de la presente invención analizaron la expresión de los principales reguladores clave de estos procesos, especialmente MMP y sus inhibidores TIMP. Como se esperaba, las células humanas de osteosarcoma HOS expresaban *MMP-2*, *MMP-9*, así como sus inhibidores *TIMP-1* y *TIMP-2* (figura 5). *MMP-2* y su inhibidor (*TIMP-2*) no se modularon por el tratamiento con GYS15 o con heparina. Por el contrario, la expresión de *MMP-9* se aumentó por GYS15 de una manera dependiente del tiempo. De hecho, 50 µg/ml de GYS15 indujeron un aumento de dos veces de la expresión de ARNm de *MMP-9* en comparación con las células no tratadas (figura 5). Simultáneamente, se descubrió que GYS15 modulaba por aumento la expresión de *TIMP-1*, que es un inhibidor natural de la actividad de *MMP-9*. La heparina moduló solamente la expresión de *TIMP-1* (figura 5).

Si *MMP-9* está ligada a la migración, proliferación y capacidad de invasión de las células de osteosarcoma (Zhang *et al.*, *Int. Immunopharmacol.*, 2015, 24: 50-58; Ma *et al.*, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2013, 17: 1102-1109), el uso de *MMP-9* como biomarcador de supervivencia en pacientes con osteosarcoma sigue siendo controvertido (Li *et al.*, *Tumour Biol.*, 2014, 5: 5487-5491; Zhang *et al.*, *Tumour Biol.*, 2015, 36: 35: 5-6). No obstante, las propiedades antiinvasiva y antimigradora de GYS15 pueden explicarse parcialmente por la modulación del equilibrio entre *MMP-9* y su inhibidor *TIMP-1* (Cottam y Rees, *Int. J. Oncol.*, 1993, 2: 861-872). GYS15 aumentó tanto *MMP-9* como *TIMP-1*; sin embargo, el equilibrio resultante entre la enzima y su inhibidor es a favor de la inhibición.

Estudios *in vivo*

Crecimiento de tumor óseo maligno primario. Se realizó un tratamiento curativo en un modelo de ratón (modelo paratibial) de osteosarcoma inducido por inoculación con células de la línea celular de ratón POS-1 o de la línea celular humana HOS. El tratamiento empezó cuando el volumen tumoral alcanzó 100 mm³ (día 0) y los ratones se dividieron en 3 grupos: 1-tratados con PBS (control); 2-tratados con GYS15 y 3-tratados con heparina. Los polisacáridos se inyectaron por vía subcutánea (50 µl) cada día a 2 mg/kg o 6 mg/kg y se midió el crecimiento tumoral desde el día 5 hasta el día 9. El crecimiento tumoral fue similar en los 3 grupos (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que tanto GYS15 como la heparina no tenían efecto sobre el tumor de osteosarcoma primario inducido por la línea celular de ratón POS-1 (datos no mostrados) o la línea celular humana HOS (figura 6). Ninguno de los dos polisacáridos pudo inhibir el crecimiento tumoral primario en modelos preclínicos de osteosarcoma en ratón. GYS15 no tuvo efecto proapoptótico sobre células de osteosarcoma, como se analiza por tinción con marcaje de extremos con mella por desoxinucleotidil transferasa dUTP terminal (TUNEL) (datos no mostrados).

Modelo de metástasis pulmonar a partir de osteosarcoma de ratón. Se concibió un tratamiento preventivo para estudiar el efecto de GYS15 sobre la capacidad metastásica de osteosarcoma mediante la técnica de inyección retroorbitaria del seno venoso en ratones (Cottam y Rees, *Int. J. Oncol.*, 1993, 2: 861-872). En este experimento, los ratones recibieron células POS-1, surgiendo las metástasis espontáneamente después de inyección de la línea celular POS-1. Los ratones tratados con GYS15 mostraron significativamente menos metástasis (una disminución de aproximadamente un 40 %) que los ratones no tratados o los tratados con heparina ($p < 0,001$) (figura 7A). Los análisis histológicos de tejido pulmonar mostraron que los ratones tratados con GYS15 no mostraban la presencia de focos metastásicos de forma similar a la heparina, en contraste con el grupo de control tratado con un vehículo (PBS) (figura 7C). Esta menor incidencia de metástasis pulmonares detectables estuvo acompañada de una mejora de la tasa de supervivencia de los animales, un 70 % de los animales tratados sobrevivieron 65 días después de la inyección de la línea celular POS-1, mientras que en el grupo de control solamente un 14 % de los animales sobrevivieron ese tiempo (figura 7C). Como se esperaba, la heparina disminuyó la incidencia metastásica pulmonar (Laubli *et al.*, *Cancer Invest.*, 2009, 27: 474-481; Falanga *et al.*, *Semin. Thromb. Hemost.*, 2007, 33: 688-694). No se observaron efectos adversos de GYS15 en ratones. Por lo tanto, GYS15 presenta actividad antimetastásica y su baja eficacia en ensayos de coagulación (Roger *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 2004, 339: 2371-2380; Ruiz Velasco *et al.*, *Glycobiology*, 2011, 21: 781-795), es claramente un valor terapéutico añadido.

Conclusiones

En el presente estudio, se demostró el interés terapéutico de tres exopolisacáridos bacterianos marinos de bajo peso molecular sobresulfatados. Con su baja eficacia en los ensayos de coagulación y su capacidad de reducir la invasividad *in vitro* de las células de osteosarcoma, así como el proceso metastásico, los OS-EPS LMW representan una nueva clase de polisacáridos con alto interés en oncología. En el presente estudio, solamente GYS15 pudo inhibir eficazmente tanto la migración como la capacidad de invasión de las células de osteosarcoma *in vitro*. Además, se descubrió que GYS15 era muy eficaz en inhibir la formación de metástasis pulmonares *in vivo*.

Dichos polisacáridos también podrían ser útiles para desarrollar nuevos sistemas de suministro para agentes quimioterápicos convencionales, incluso si su mecanismo de acción aún no es conocido (Arpicco *et al.*, *Molecules*, 2014, 19: 3193-3230).

REIVINDICACIONES

1. Un exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para su uso en la prevención o inhibición de la formación de metástasis en un sujeto, en el que dicho exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa se obtiene por un método que comprende las siguientes etapas:
 - (a) una etapa que consiste en despolimerización de radicales libres de un exopolisacárido natural marino (EPS) de la cepa GY785 del género *Alteromonas* para obtener un EPS despolimerizado que tiene un peso molecular de 5000 a 100 000 g/mol;
 - (b) una etapa posterior que consiste en la sulfatación del EPS despolimerizado para obtener un EPS despolimerizado sobresulfatado, que comprende añadir al EPS despolimerizado al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener un polisacárido sulfatado que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato entre un 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del EPS despolimerizado sobresulfatado; y
 - (c) una etapa posterior que consiste en aislar el exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa (GYS15) del EPS despolimerizado sobresulfatado.
2. El exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de aislar GYS15 del EPS despolimerizado sobresulfatado se realiza por fraccionamiento, en particular fraccionamiento realizado por cromatografía de exclusión por tamaño.
3. El exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el sujeto es un paciente con cáncer.
4. El exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el paciente con cáncer padece un cáncer, o ha experimentado previamente tratamiento para el cáncer.
5. El exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el paciente con cáncer que padece un cáncer está experimentando tratamiento para el cáncer.
6. El exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.
7. El exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer óseo, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductores, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma de pituitaria.
8. El exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el cáncer es osteocarcinoma.
9. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o inhibición de la formación de metástasis en un sujeto, comprendiendo la composición farmacéutica una cantidad terapéuticamente eficaz del exopolisacárido sobresulfatado de 15 kDa como se define en la reivindicación 1 o reivindicación 2 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el sujeto es un paciente con cáncer.
11. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el paciente con cáncer padece un cáncer o ha experimentado previamente tratamiento para el cáncer.
12. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11, en la que el paciente con cáncer que padece un cáncer está experimentando tratamiento para el cáncer.
13. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.
14. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer óseo, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de

5 útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductores, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma de pituitaria.

15. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que el cáncer es osteocarcinoma.

(A)

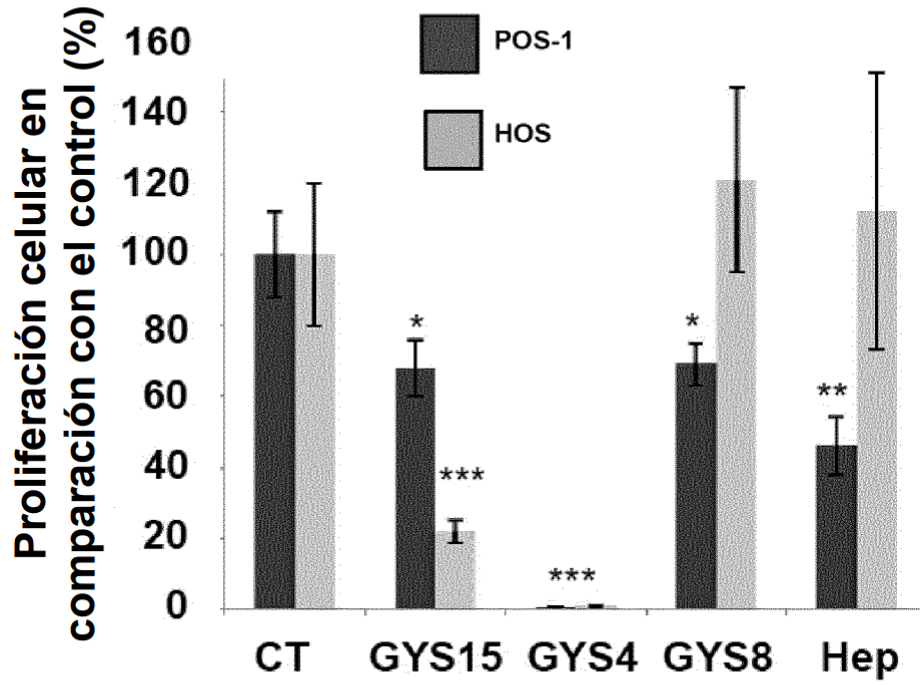


Figura 1 (A)

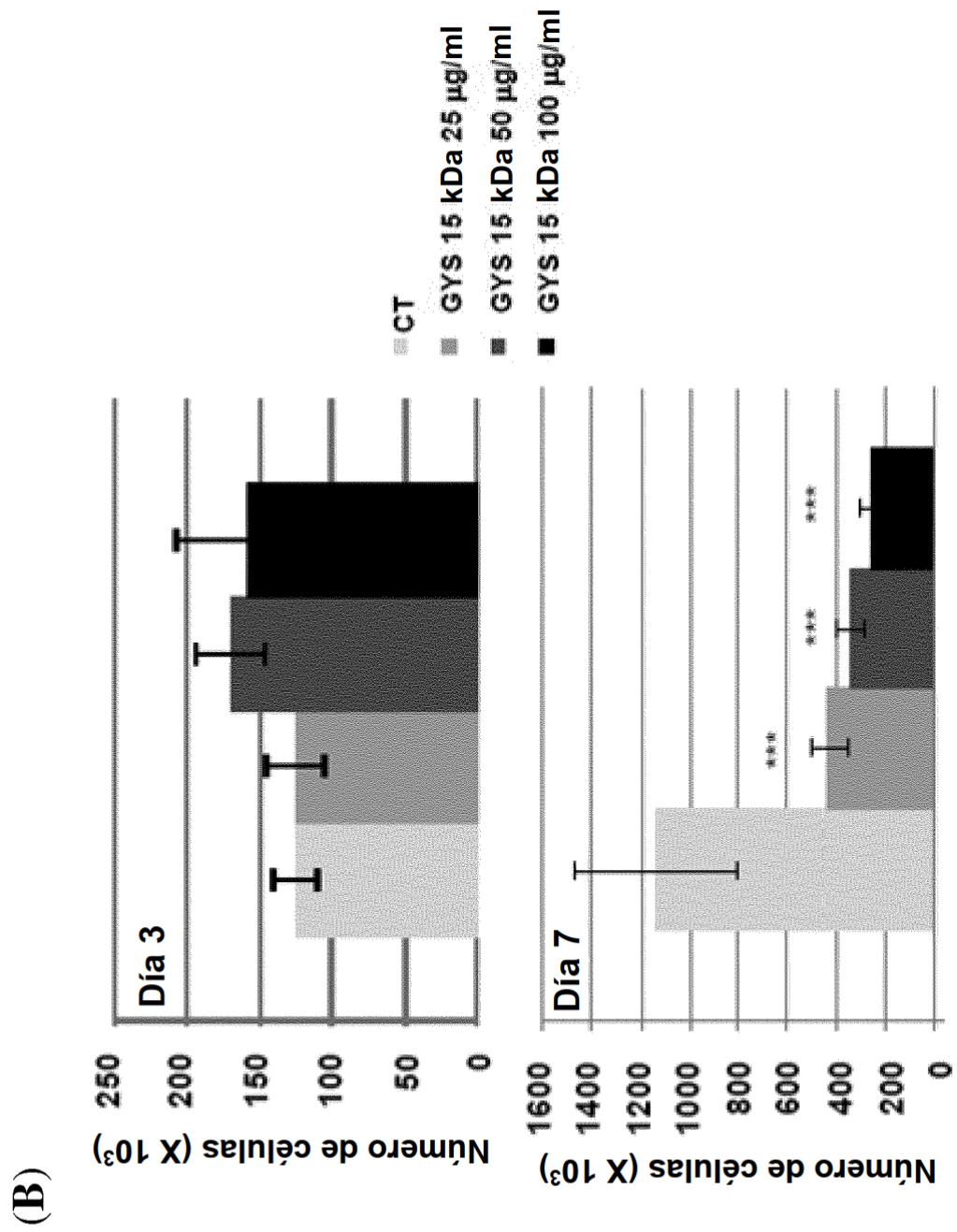


Figura 1(B)

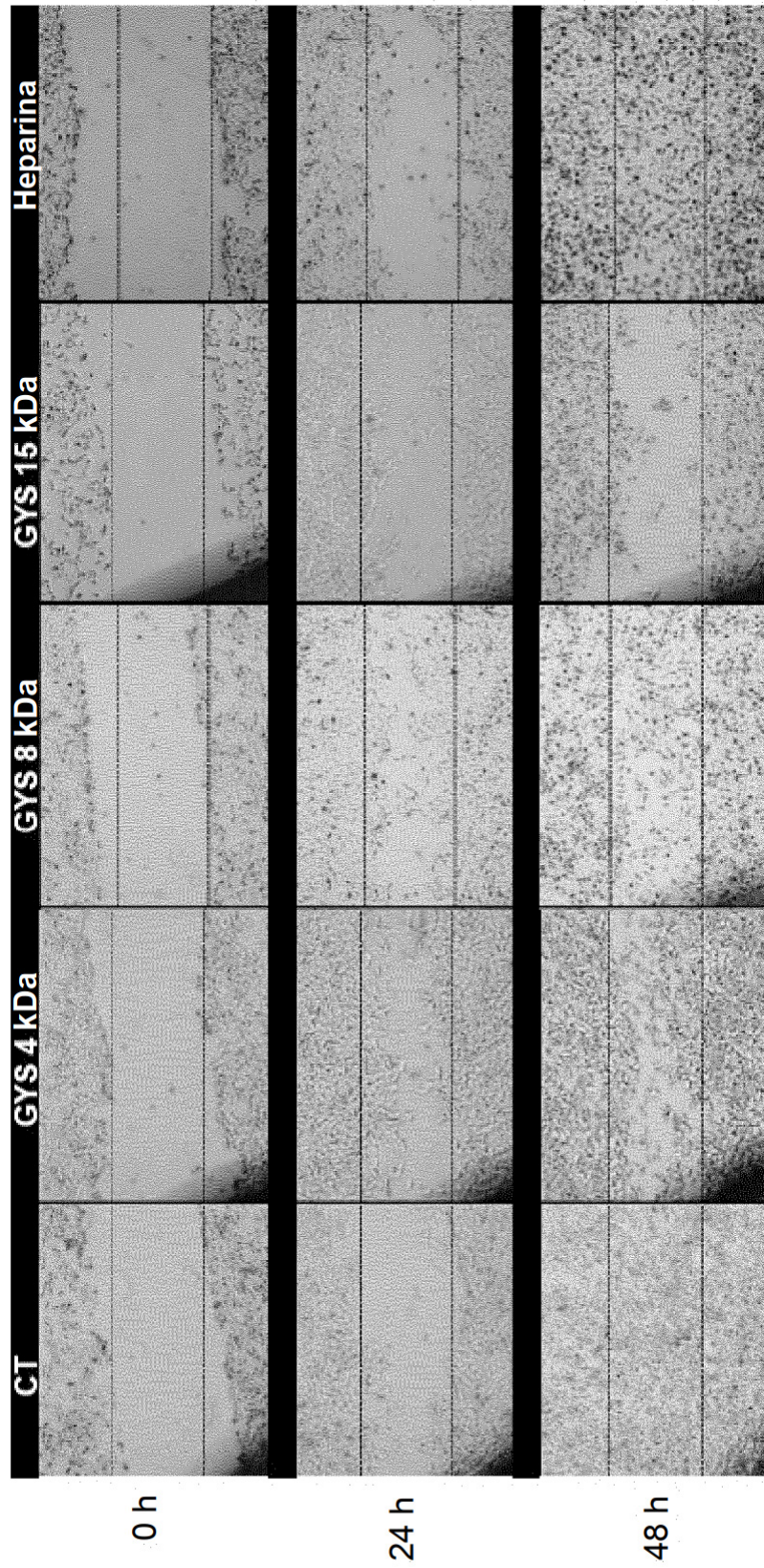
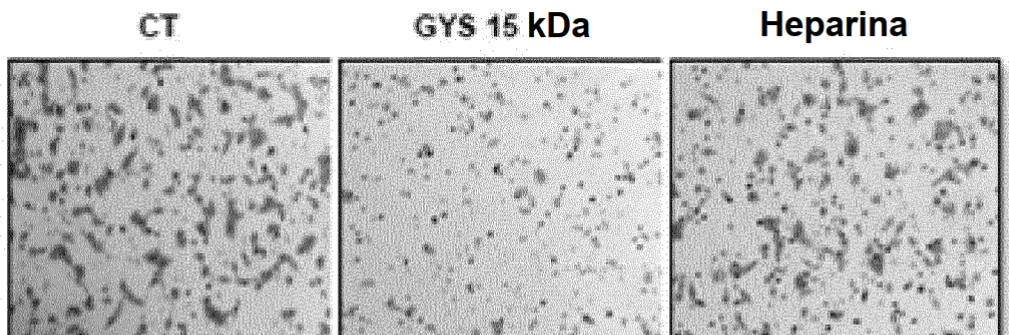


Figura 2

(A)



(B)

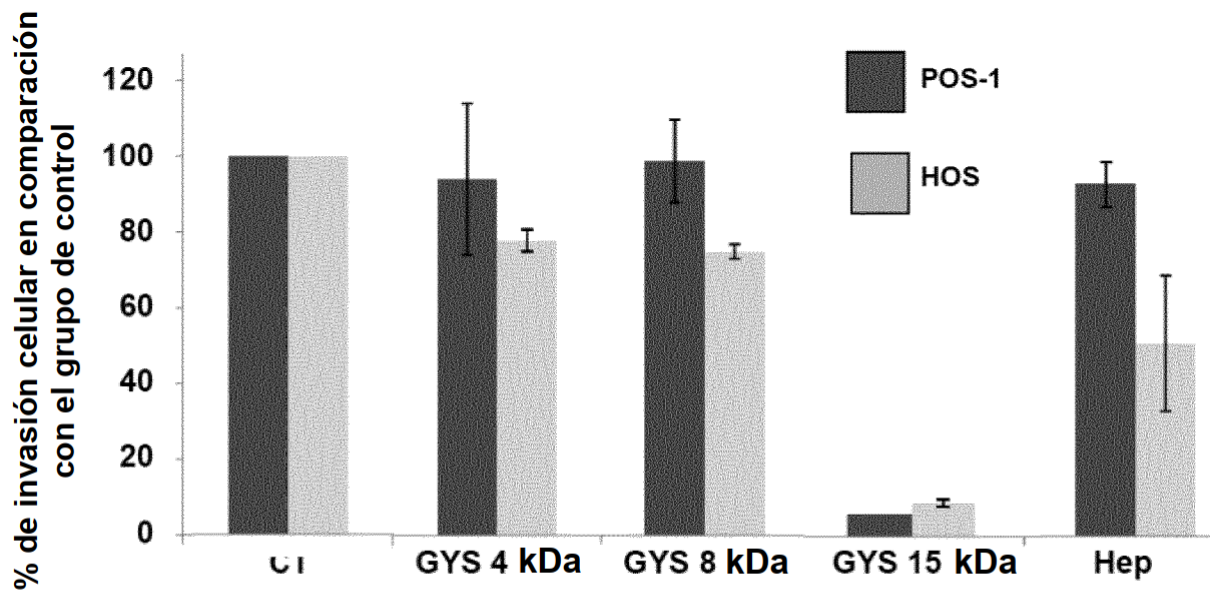


Figura 3(A)-(B)

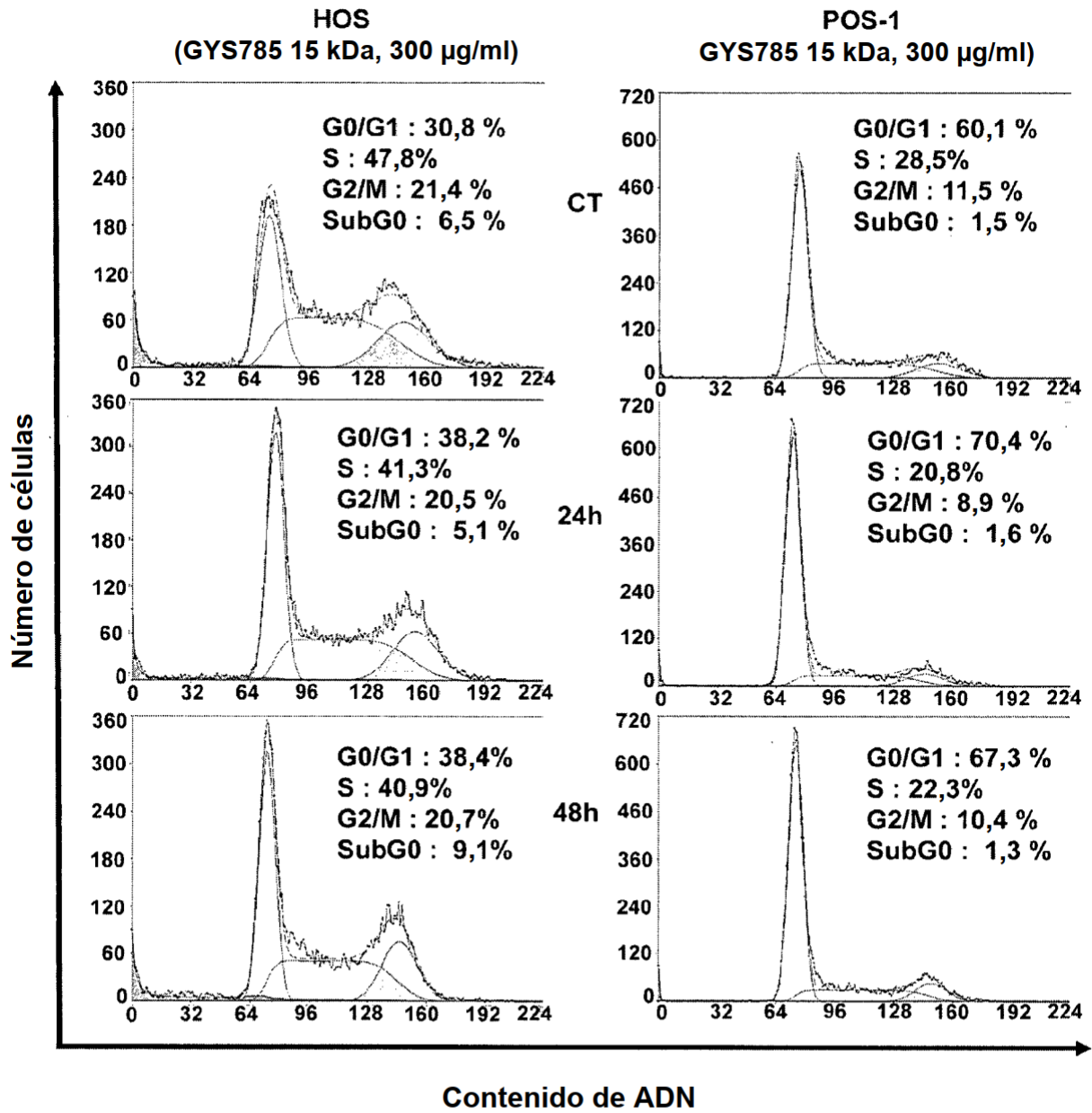


Figura 4

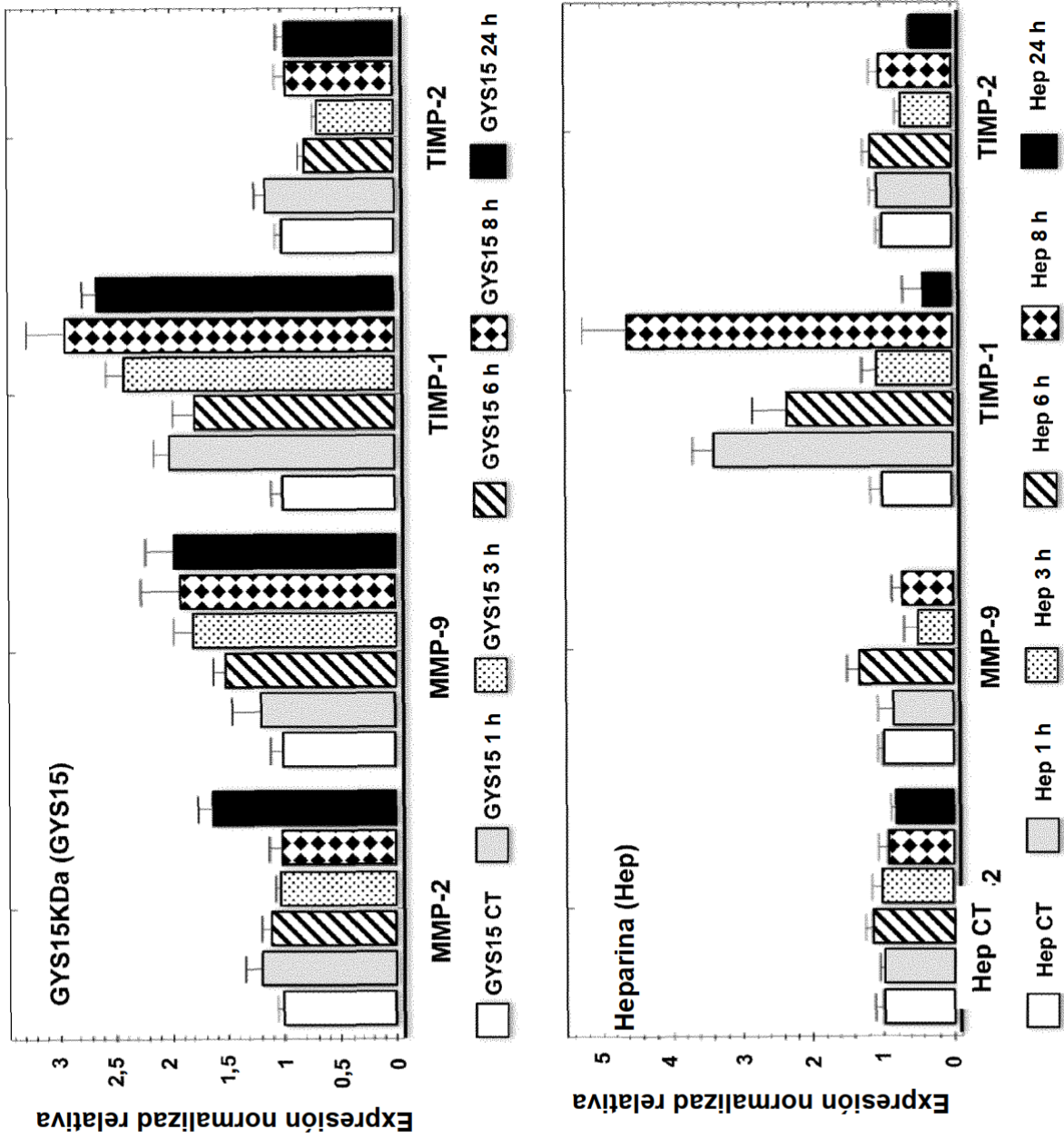


Figura 5

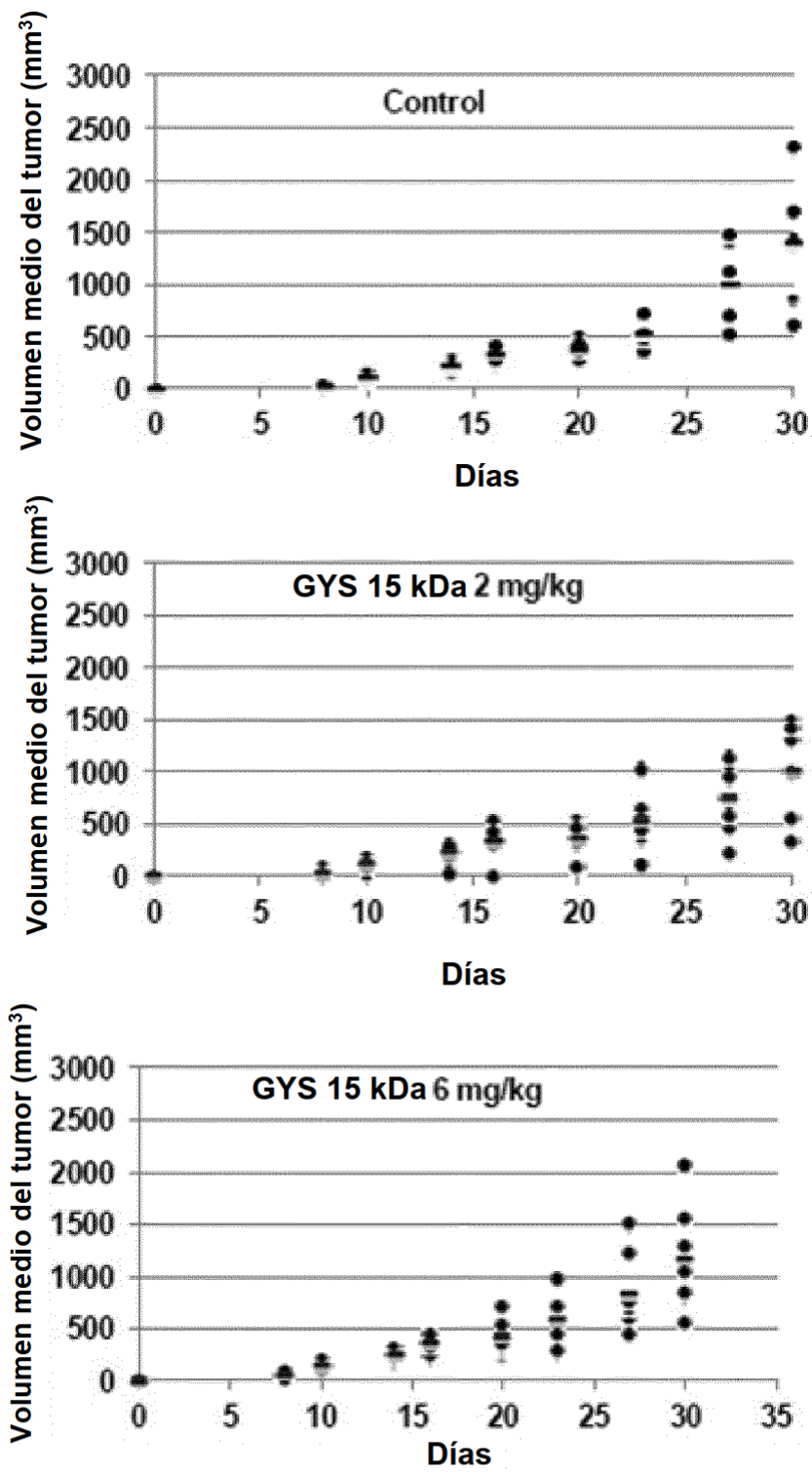
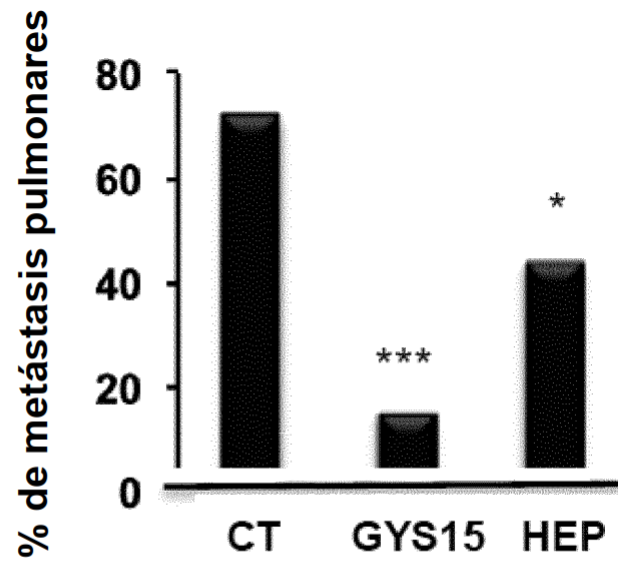


Figura 6

(A)



(B)

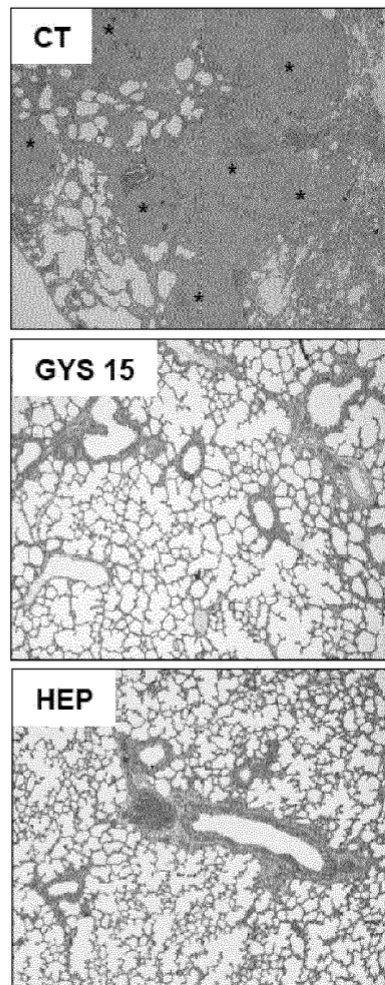


Figura 7(A)-(B)

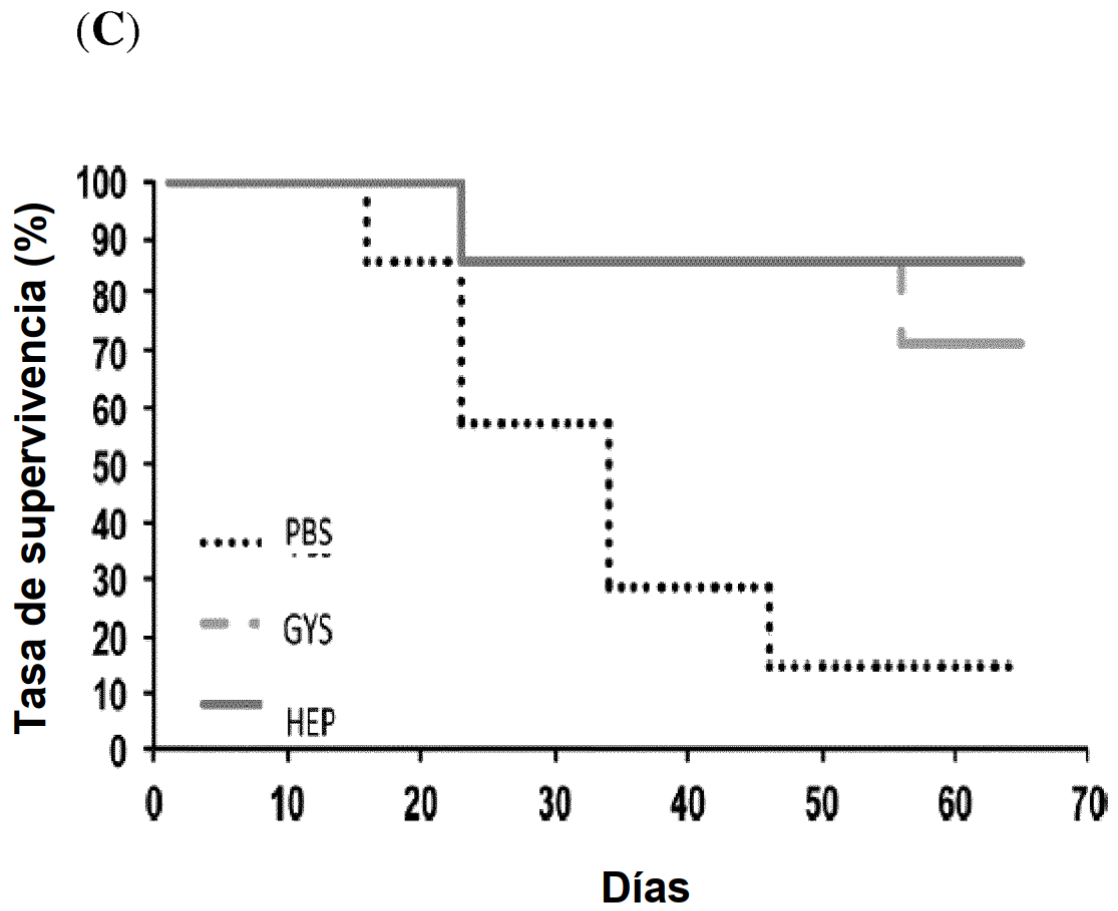


Figura 7(C)