

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2001.09.12	(73) Titular(es): SIGMA-TAU RESEARCH SWITZERLAND S.A. VIA ALLA CAMPAGNA 2A 6900 LUGANO CH
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.06.16	(72) Inventor(es): GIUSEPPE GIANNINI IT CLAUDIO PISANO IT B. CASU IT G. TORRI IT A. NAGGI IT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.06.08 175/2011	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS PARCIALMENTE DESSULFATADOS COMO INIBIDORES DA HEPARANASE, DOTADOS DE ACTIVIDADE ANTIANGIOGÉNICA E DESTITUÍDOS DE EFEITO ANTICOAGULANTE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS PARCIALMENTE DESSULFATADOS, PARTICULARMENTE A HEPARINA, E MAIS PARTICULARMENTE OS COMPOSTOS DE FÓRMULA (I), EM QUE OS GRUPOS U, R E R1 TÊM OS SIGNIFICADOS INDICADOS NA DESCRIÇÃO. OS REFERIDOS DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS SÃO DOTADOS DE ACTIVIDADE ANTIANGIOGÉNICA E INIBIDORA DA HEPARANASE E SÃO DESTITUÍDOS DE ACTIVIDADE ANTICOAGULANTE.

Resumo

**"DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS PARCIALMENTE
DESSULFATADOS COMO INIBIDORES DA HEPARANASE, DOTADOS DE
ACTIVIDADE ANTIANGIOGÉNICA E DESTITUÍDOS DE EFEITO
ANTICOAGULANTE"**

A presente invenção refere-se a derivados de glicosaminoglicanos parcialmente dessulfatados, particularmente a heparina, e mais particularmente os compostos de fórmula (I), em que os grupos U, R e R¹ têm os significados indicados na descrição. Os referidos derivados de glicosaminoglicanos são dotados de actividade antiangiogénica e inibidora da heparanase e são destituídos de actividade anticoagulante.

Descrição

**"DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS PARCIALMENTE
DESSULFATADOS COMO INIBIDORES DA HEPARANASE, DOTADOS DE
ACTIVIDADE ANTIANGIOGÉNICA E DESTITUÍDOS DE EFEITO
ANTICOAGULANTE"**

A invenção descrita diz respeito a heparinas parcialmente dessulfatadas, a processos para a sua preparação, ao seu uso como ingredientes activos para a preparação de medicamentos úteis em condições patológicas, como tumores, incluindo as suas formas metastáticas, e para qualquer indicação terapêutica que beneficie da inibição da heparanase, e a composições farmacêuticas que as contenham.

Antecedentes da invenção

Os estudos realizados na unidade Tumor Biological Research Unit, do Hadassah-Hebrew University Hospital-Israel (*Isr. Med. Assoc. J.* 2000, 2, 37-45; *J. Med. Chem.* 2000, 43, 2591-600; *Invasion Metastasis* 1994-95, 14, 290-302; *Exp. Cell Res.* 1992, 201, 208-15) centram-se no envolvimento de factores de crescimento ligados à heparina, sulfato de heparano e enzimas que decompõem sulfato de heparano (heparanase) na angiogénese e metástase tumoral. Estes estudos foram aplicados ao rastreio e à identificação de derivados de heparina e de miméticos de heparina/sulfato de heparano com forte actividade inibidora da heparanase (*Nature Med.* 1999, 5, 735-6; *Science*, 1999, 285, 33-4).

As células tumorais libertam a enzima heparanase, uma endo- β -D-glucuronidase que decompõe a cadeia

polissacarídica de proteoglicanos sulfato de heparano nas superfícies celulares e na matriz extracelular.

O envolvimento da angiogénese tumoral da heparanase foi correlacionado com a capacidade de libertar bFGF (FGF-2) e outros factores de crescimento do seu armazenamento no interior da MEC (matriz extracelular). Estes factores de crescimento providenciam um mecanismo para a indução da neovascularização em situações normais e patológicas.

A heparanase pode, assim, facilitar não apenas a invasão e a metástase das células tumorais mas também a angiogénese tumoral, ambos passos críticos na progressão tumoral.

Os inibidores específicos da enzima heparanase impedem a libertação e a activação dos factores de crescimento armazenados pelo sulfato de heparano bem como a ruptura da MEC, sendo vistos como uma abordagem muito promissória para o desenvolvimento de fármacos anticancro.

Assim sendo, uma das abordagens terapêuticas possíveis para um fármaco antiangiogénico é o desenvolvimento de um inibidor selectivo da heparanase potente.

Para uma discussão da angiogénese, pode fazer-se menção à patente de invenção WO 01/55221, no nome do actual requerente.

Um outro envolvimento importante da heparanase diz respeito tanto à inflamação como à auto-imunidade. Na verdade, a actividade da heparanase está correlacionada com a capacidade de as células activadas do sistema imunitário deixarem a circulação e induzirem respostas inflamatórias e auto-imunes. A interacção de plaquetas, granulócitos, linfócitos T e B, macrófagos e mastócitos com a MEC subendotelial está associada com a degradação do sulfato de

heparano pela actividade heparanase. A enzima é libertada dos compartimentos intracelulares (ou seja, lisossomas, grânulos específicos) em resposta a vários sinais de activação, sugerindo o seu envolvimento regulado e presença em locais inflamatórios e lesões auto-imunes. O tratamento de animais experimentais com inibidores da heparanase (ou seja, espécies não-anticoagulantes de heparina de baixo peso molecular) reduziu significativamente a incidência de encefalomielite auto-imune experimental (EAE), a artrite adjuvante e a rejeição de enxertos em animais experimentais, indicando que os inibidores da heparanase podem ser aplicados para inibir uma doença auto-imune e inflamatória.

Heparina

A heparina é uma mistura heterogénea de polissacarídeos naturais de vários comprimentos e vários níveis de sulfatação, dotada de actividade anticoagulante e segregada pelo tecido conjuntivo dos mastócitos presentes no fígado (de onde foram isoladas pela primeira vez), nos músculos, pulmões, timo e baço.

Para além da sequência regular, foi também identificada na heparina uma sequência correspondente ao local activo da actividade da antitrombina.

A actividade antitumoral e antimetastática da heparina e seus derivados deve-se à sua capacidade de inibir a heparanase, de bloquear os factores de crescimento e de regular a angiogénese.

Sulfatos de heparano (SH)

Os sulfatos de heparano (SH) são ligandos de proteínas ubíquas. As proteínas ligam-se às cadeias de SH para um conjunto de acções, que variam entre a simples imobilização ou protecção contra a degradação proteolítica e as modulações específicas de actividades biológicas como a angiogénese.

O esqueleto de hidrato de carbono, na heparina e nos sulfatos de heparano (SH), é composto numa alternância de D-glucosamina (GlcN) e ácidos hexurónicos (GlcA ou ldoA).

Na heparina, os resíduos de GlcN são essencialmente N-sulfatados, sendo que nos SH são N-sulfatados e N-acetilados, com um pequeno número de grupos NH_2 não substituídos.

Em média, o SH também é menos O-sulfatado do que a heparina.

O uso de heparina no tratamento de doenças da angiogénese, como tumores e, em especial, as metástases, é substancialmente limitado pela actividade anticoagulante da heparina.

Foram levadas a cabo modificações químicas à heparina de forma a reduzir a sua capacidade anticoagulante, preservando ainda assim as suas propriedades antitumorais.

A abertura de uma unidade de ácido glucurónico no local antitrombina reduz a afinidade da heparina pela antitrombina: desta forma, as heparinas podem ser usadas com poucos efeitos anticoagulantes, mas com propriedades antiangiogénicas.

Heparanases

As heparanases são enzimas da família das endoglicosidasas (uma endo- β -D-glucuronidase) que hidrolisam as ligações internas dos glicosídeos das cadeias de sulfatos de heparano (SH) e heparina.

Estas endoglicosidasas estão envolvidas na proliferação das células tumorais, nas metástases e na neovascularização dos tumores. Estas enzimas são alvos biológicos para a actividade antiangiogénica. Na literatura científica existe um grande número de estudos sobre a correlação estrutura/actividade (veja-se, por exemplo, Lapierre F. et al., *Glycobiology*, vol. 6 (3), 355-366, 1996). Embora ainda tenham de ser clarificados muitos aspectos, os estudos registaram a inibição de heparanases pela heparina e seus derivados, usando testes específicos que levaram à emergência de considerações de um tipo estrutural que pode servir como guia para a obtenção de derivados novos e mais selectivos.

Na obra supra mencionada de Lapierre et al., descrevem-se derivados de heparina obtidos por dessulfatação 2-O ou por *glycol-split* (oxidação com periodato e subsequente redução com borohidreto de sódio). Estes derivados, adiante definidos como "heparina 2-O-dessulfatada" e "heparina-RO), respectivamente, mantiveram parcialmente a actividade antiangiogénica da heparina, conforme avaliado através do teste CAM na presença de corticosteróides (ibid. página 360).

Os derivados N-acil da heparina, miméticos mais próximos do sulfato de heparano do que da heparina, provaram inibir a heparanase apenas um pouco menos do que

os derivados de N-sulfato (Irimira T., *Biochemistry* 1986, 25, 5322-5328; Ishai-Michaeli R. et al., *Biochemistry* 1992, 31, 2080-2088).

Heparinas e FGF

Os FGFs regulam múltiplos processos fisiológicos como o crescimento e diferenciação celular, mas também estão envolvidos em processos patológicos como a angiogénese tumoral.

Os FGFs são factores de crescimento (uma família de mais de 10 polipeptídeos, dos quais os FGFs ácidos (FGF-1) e básicos (FGF-2) têm sido os mais estudados) que requerem um co-factor polissacarídeo, heparina ou SH, para ligar ao receptor FGF (FGFR) e activá-lo.

Embora o mecanismo preciso através do qual a heparina e o SH activam os FGFs ainda seja desconhecido, sabe-se, contudo, que a heparina/FGF/FGFR formam um complexo "trimolecular" ou "ternário".

Um mecanismo postulado é de que a heparina e SH induzem a chamada dimerização em sanduíche do FGF, e este último, dimerizado, forma um complexo estável com FGFR.

Actividade antimetastática dos derivados de heparina

A capacidade de um tumor primário gerar células metastáticas é, talvez, o principal problema enfrentado pela terapia anticancro.

Os derivados de heparina com uma capacidade substancial de bloquear a heparanase parece ser igualmente capaz de inibir a angiogénese nos tumores primários e nas metástases.

Além disso, a inibição da heparanase reduz a capacidade migratória das células tumorais do tumor primário para outros órgãos.

A actividade antimetastática em modelos animais mostrou estar correlacionada com a capacidade da heparina e derivados de heparina inibirem a heparanase (Miao, H. Q. et al., *Int. J. Cancer* 1999, 83, 424-431 e referências ao mesmo). Os estudos sobre a dependência do peso molecular da actividade antimetastática indicaram que também as heparinas de peso molecular muito baixo (Sciumbata, T. et al., *Invasion Metastasis* 1996, 16, 132-143) e polissulfatos de oligossacarídeos (Parish, C. R. et al., *Cancer Res.* 1999, 59, 3433-3441) retêm uma significativa actividade antimetastática. Embora, no geral, a remoção dos grupos N-sulfato (N-dessulfatação) diminua o potencial antimetastático das heparinas, esta actividade é parcialmente repostada após N-acilação (N-acetilação, N-hexanoilação (Bitan M., 1995) e N-succinilação (Sciumbata T., 1996) dos resultantes grupos livres NH₂. A actividade antimetastática das heparinas provou ser inversamente correlacionada com os seus níveis de O-sulfação. (Bitan M., 1995). No entanto, a 2-O-dessulfatação selectiva dos resíduos de ácido idurónico não envolveram uma forte redução da actividade antimetastática da heparina (Lapierre F., *Glycobiology* 1996, 6, 355-366).

No geral, a actividade inibitória da heparanase e a actividade antimetastática das heparinas e outros polissacarídeos sulfatados diminui com a diminuição do peso molecular e do nível de sulfatação (Bitan M., 1995; Parish, C. R., 1999). No entanto, estas actividades também dependem da estrutura (*backbone*) hidrato de carbono do

polissacarídeo (tipo de resíduos e posição das ligações glicosídicas) (Parish, C. R., 1999). Tendo em conta que a estrutura tridimensional do local activo de heparanase ainda é desconhecido, é difícil prever quais as estruturas polissacarídicas e padrões de sulfatação que inibem a enzima com maior eficácia.

À luz destas conclusões, os requisitos estruturais de moléculas tipo heparina que favorecem a acção inibidora da angiogénese podem ser agrupados em duas categorias com base no alvo que se pretende bloquear:

- a) inibição da heparanase: embora esta enzima reconheça e provoque a clivagem das sequências de heparina e SH de, pelo menos, oito unidades de monossacarídeos contendo ácido N-acil-glucosamina-glucurónico (ou resíduos de glucosamina N-sulfatada, veja-se, por exemplo, D. Sandback-Pikas et al., *J. Biol. Chem.*, 273, 18777-18780 (1998) e referências citadas), a sua inibição pode ser eficazmente conseguida pelos fragmentos de heparina mais longos do que o tetradecassacarídeo (Bitan M., 1995) ou pelos oligossacarídeos mais curtos e extensivamente sulfatados como o sulfato de maltohexaose (MHS) e o sulfato fosfomanopentaose (PI-88) (Parish, C. R., 1999). No entanto, tanto os fragmentos de heparina longos como os oligossacarídeos altamente sulfatados são anticoagulantes, uma propriedade que deveria ser evitada para os potenciais fármacos antimetastáticos;

- b) inibição dos factores de crescimento angiogénicos (tipo de fibroblasto: FGF-1 e FGF-2; tipo de endotélio vascular: VEGF; tipo de permeabilidade vascular: VPF): para este fim, os compostos tipo heparina apresentam preferivelmente sequências com pelo menos cinco unidades de monossacarídeos, contendo ácido idurónico 2-sulfatado e glucosamina N,6-sulfatada (veja-se, por exemplo, M. Maccarana et al., *J. Biol. Chem.*, 268, 23989-23905 (1993)).

A literatura descreve pequenos péptidos (5-13 aminoácidos) com actividade antiangiogénica (patente de invenção norte-americana n.º 5 399 667 da Universidade de Washington) que actuam ligando-se a um receptor da trombospondina, ou a péptidos mais longos (aproximadamente 50 aminoácidos).

São conhecidos factores modificados derivados das plaquetas (patente de invenção EP 0 589 719, Lilly) com a capacidade de inibir a proliferação endotelial, com $IC_{50}=7$ nM.

Os fragmentos de oligossacarídeos com actividade antiangiogénica também foram amplamente descritos: concluiu-se que, na realidade, ao variar a sequência de hidrato de carbono, é possível aumentar a selectividade da interacção.

Além disso, pode usar-se heparina como veículo de substâncias que são, em si mesmas, antiangiogénicas, como alguns esteróides, explorando a afinidade da heparina em relação às células endoteliais; veja-se, por exemplo, a

patente de invenção WO 93/18793 da Universidade do Texas e Imperial Cancer Research Technology, na qual as heparinas são descritas como *linkers* lábeis ao ácido, como a hidrazina ácido adípico, ligada ao cortisol. O efeito antiangiogénico das moléculas conjugadas é maior do que aquele das moléculas não conjugadas, mesmo quando administradas em simultâneo.

Na obra *Biochim. Biophys. Acta* (1996), 1310, 86-96, as heparinas ligadas a esteróides (por exemplo, cortisol) são descritas com um grupo hidrazona em C-20 que apresentam uma maior actividade antiangiogénica do que as duas moléculas não conjugadas.

A patente de invenção EP 0 246 654 de Daiichi Sc. descreve polissacarídeos sulfatados com actividade antiangiogénica em estudos de Fase II. A patente de invenção EP 0 394 971 de Pharmacia & Upjohn - Harvard Coll. descreve hexa-sacarídeos - fragmentos de heparina - com baixa sulfatação, com a capacidade de inibirem o crescimento das células endoteliais e da angiogénese estimulado pelo FGF-1. A patente de invenção EP 0 618 234, de Alfa Wasserman, descreve um método para a preparação de glicosaminoglicanos semi-sintéticos com uma estrutura de heparina ou heparano com um grupo nucleofílico. A patente de invenção WO 95/05182 da Glycomed descreve vários oligossacarídeos sulfatados com actividade anticoagulante, antiangiogénica e anti-inflamatória. A patente US 5 808 021 da Glycomed descreve um método de preparação de heparina substancialmente não-despolimerizada 2-O, 3-O dessulfatada com uma percentagem de dessulfatação nas posições 2 do ácido idurónico (1, 2-O) e nas posições 3 da unidade glucosamina (A, 3-O)

variando aproximadamente entre 99% e entre aproximadamente 75% da percentagem original. Este método prevê uma dessulfatação levada a cabo na presença de um catião de um metal ambivalente, exemplificado por cálcio ou cobre, seguida de liofilização do produto obtido. As heparinas dessulfatadas são dotadas de actividade antiangiogénica. A patente de invenção EP 0 251 134, de Yeda Res. & Dev Co Ltd et al., descreve o uso de doses subcoagulantes de heparina ou seus derivados para a prevenção da rejeição de enxertos e no tratamento de doenças auto-imunes. A actividade da heparina ocorre através da inibição da heparanase. A patente de invenção WO 88/05301, Univ. Australian Nat., descreve composições antimetastáticas e/ou anti-inflamatórias contendo um polissacarídeo sulfatado, que é inibidor da heparanase. São providenciados heparina, fucoidano, sulfato de pentosano, sulfato de dextrano. A patente de invenção WO 92/01003, Univ. Texas Systems, descreve o uso de um derivado da heparina, destituído de actividade de anticoagulação, como inibidor da heparanase. Estes derivados possuem grupos sulfamino ou O-sulfato, com peso molecular entre 1000-15000 e cada unidade monomérica terminal é uma unidade monomérica repetida com um átomo do terminal O ligado a um grupo bloqueador. As patentes de invenção WO 94/14851 e WO 96/06867, Glycomed, proporcionam heparina mucosal 2-O, 3-O-dessulfatada ou fragmentos da mesma, sendo pelo menos 96,7% dessulfatada na posição 2-O e pelo menos 75% dessulfatada na posição 3-O úteis como inibidores não-anticoagulantes da heparanase. A patente de invenção WO 95/09637 e WO 96/09828, Glycomed, descreve compostos

maltooligossacarídeos altamente sulfatados com propriedades semelhantes à heparina. A patente de invenção WO 95/30424, Glycomed, proporciona heparina 6-O-dessulfatada ou fragmentos da mesma provida de actividade inibidora da heparanase. A patente de invenção WO 96/33726, Univ. Australian Nat., descreve oligossacarídeos sulfatados enquanto miméticos de heparano com actividade inibidora da heparanase. A patente de invenção WO 01/35967, Knoll AG, proporciona um método para o tratamento da insuficiência cardíaca e problemas associados através da administração de um inibidor da heparanase, sendo que a heparina possui grupos COOH parcialmente reduzidos ou é, pelo menos, parcialmente N-dessulfatada e N-acetilada ou é pelo menos parcialmente N,O-dessulfatada e N-ressulfatada ou é O-acetilada.

O objectivo da invenção descrita consiste em encontrar estruturas óptimas de glicosaminoglicanos para geração de uma actividade antiangiogénica com base na inibição de mecanismos de inibição da heparanase e/ou inibição do factor de crescimento FGF. Um objectivo adicional da invenção descrita consiste em proporcionar um medicamento com actividade antiangiogénica essencialmente destituído dos típicos efeitos secundários dos derivados da heparina, como, por exemplo, a actividade anticoagulante.

A patente de invenção WO 01/55221, no nome do requerente, descreve glicosaminoglicanos, em particular uma heparina dessulfatada, com um grau de dessulfatação não superior a 60% de unidades urónicas totais. Estes derivados são providos de uma actividade antiangiogénica e destituídos de actividade anticoagulante. Os referidos

compostos exercem a sua actividade antiangiogénica com base na inibição do FGF. Não se prevê qualquer actividade para a inibição da heparanase.

Em termos gerais, a patente de invenção WO 01/55221 também proporciona uma heparina modificada, contendo resíduos de glicosamina com diferentes graus de N-dessulfatação e subsequente acetilação total ou parcial opcional. As conclusões gerais da referida referência não descrevem de forma explícita a N-dessulfatação e os passos da subsequente acetilação total ou parcial opcional.

Resumo da invenção

A dessulfatação levada a cabo nas condições descritas na presente invenção também produz a formação de unidades idurónicas com um anel oxirânico na posição 2,3. A abertura do anel oxirânico nas condições descritas na presente invenção dá origem a unidades L-idurónicas ou L-galacturónicas.

Constitui um objectivo da invenção descrita proporcionar uma heparina modificada contendo resíduos de glicosamina com diferentes graus de N-dessulfatação e subsequente N-acetilação alcançável através do processo aqui descrito.

Os compostos que são o objecto da invenção aqui descrita caracterizam-se pelo elevado poder de inibirem a heparanase com interessantes propriedades antiangiogénicas sendo, por conseguinte, úteis enquanto ingredientes activos para a preparação de medicamentos para o tratamento de patologias que beneficiem da

inibição da heparanase, de patologias baseadas numa angiogénese anómala e, em particular, para o tratamento de metástases.

Os compostos de acordo com a presente invenção também inibem os FGFs.

Vantajosamente, os compostos de acordo com a presente invenção apresentam propriedades anticoagulantes reduzidas, e não mesmo inexistentes, evitando ou reduzindo, assim, os efeitos secundários típicos das heparinas. Uma outra vantagem advém do facto de os compostos de acordo com a invenção poderem caracterizar-se com técnicas instrumentais analíticas, como a espectroscopia RMN, permitindo, assim, o controlo do processo que é absolutamente desejável do ponto de vista industrial.

Nas heparinas modificadas, o peso molecular (PM) detém uma função muito importante aquando da produção de inibidores da angiogénese. Sabe-se, de facto, que uma redução no peso molecular (PM) até valores correspondentes a unidades pentassacarídicas não conduz à perda de actividade antiangiogénica. Por outro lado, concluiu-se que, enquanto que para lá de um determinado comprimento, as cadeias de heparina favorecem em vez de inibirem a activação do FGF, sendo inibidores da heparanase ainda melhores do que as cadeias curtas. No entanto, o comprimento óptimo da cadeia para inibição da heparanase depende da estrutura do inibidor (estrutura do hidrato de carbono, ligações posicionais, padrão de sulfatação) e deverá ser definido para todos os novos tipos de potenciais inibidores.

Descrição minuciosa da invenção

Os compostos de acordo com a presente invenção contendo resíduos de glicosamina com diferentes graus de N-dessulfatação e subsequente acetilação são especificamente descritos e reivindicados enquanto novos compostos.

O que se entende por grau de dessulfatação é a percentagem de ácidos idurónicos não sulfatados em relação aos ácidos urónicos totais originalmente presentes na heparina de origem. Um intervalo inicial preferido para a percentagem de dessulfatação é de entre aproximadamente 40 e entre aproximadamente 60%.

Um primeiro composto preferido é uma heparina parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada com um peso molecular (PM) de 11200, um índice de polidispersão de 1.3, um grau de dessulfatação de 1.6 (expresso sob a forma de razões molares entre $\text{SO}_3^-:\text{COO}^-$, uma percentagem de ácidos urónicos modificada comparada aos ácidos urónicos totais de aproximadamente 30%. Os resíduos de glicosamina apresentam um grau de N-acetilação de 50%. O referido composto é também designado por ST1518.

Um segundo composto preferido é uma heparina de baixo peso molecular parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada com um peso molecular de $M_n = 4780$, $M_p = 10000$, um índice de polidispersão de 2.092, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de N-acetilação de 50%. O referido composto é também designado por ST2168.

Um terceiro composto preferido é uma heparina parcialmente dessulfatada e N-reacetilada, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de acetilação de 27%. O referido composto é adiante designado por ST2185.

Um quarto composto preferido é uma heparina parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de acetilação de 39%. O referido composto é adiante designado por ST2186.

Um quinto composto preferido é uma heparina parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de N-acetilação de 64%. O referido composto é adiante designado por ST2187.

No que diz respeito aos glicosaminoglicanos N-dessulfatados e N-acetilados de acordo com a presente invenção, estes podem ser preparados submetendo a heparina ao processo composto pelos seguintes passos:

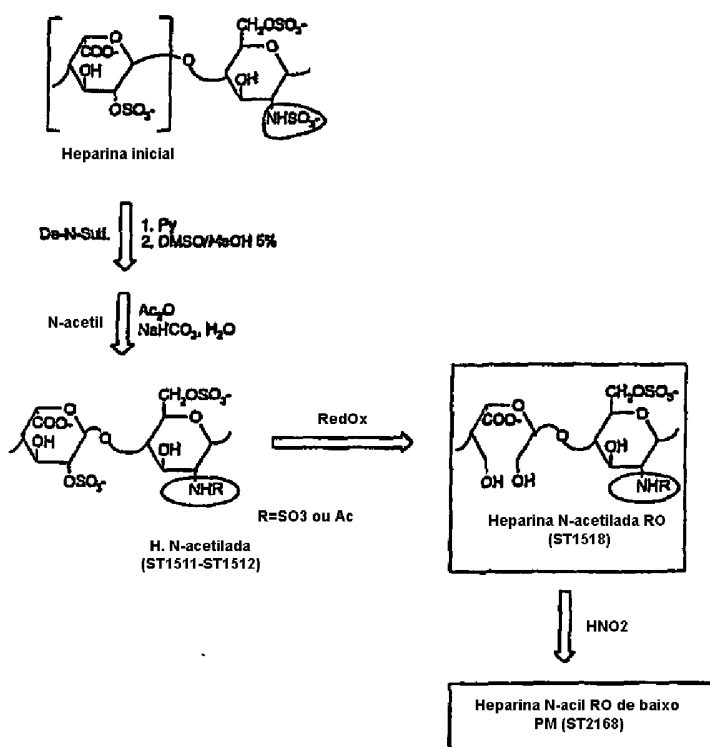
- a) N-dessulfatação através de hidrólise solvolítica dos resíduos sulfamino em DMSO:H₂O 95:5 v:v à temperatura ambiente durante um intervalo de tempo entre 0,5 e entre 8 horas, e ainda mais preferivelmente durante aproximadamente 2 horas, para resultar numa eliminação total ou parcial dos grupos sulfato na posição 2 dos resíduos glucosamina;

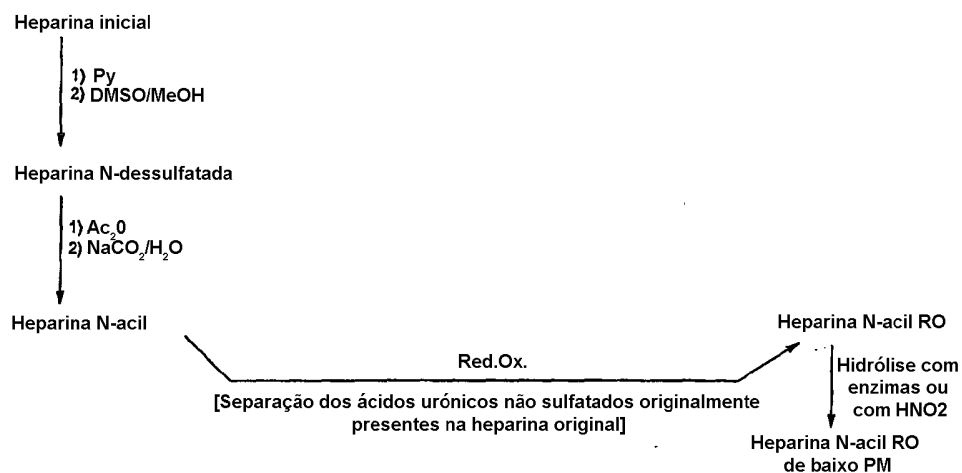
- b) N-acetilação dos referidos grupos total ou parcialmente dessulfatados na posição 2 dos resíduos glucosamina através de tratamento em solução aquosa alcalina (pH 8-9) com um agente acetilante, como o anidrido acético, para resultar em grupos total ou parcialmente acetilados na posição 2 dos resíduos glucosamina;
- c) oxidação dos dióis com periodato de sódio, para resultar na abertura do anel glicosídeo e na formação de dois grupos aldeído por resíduo modificado;
- d) redução dos referidos grupos aldeído para um álcool primário;
- e) hidrólise ácida opcional dos compostos obtidos no passo d) para obter oligossacarídeos correspondentes às sequências regulares, preferivelmente através de desaminação com ácido nitroso. Esta reacção, geralmente aplicada para se obter heparina de baixo peso molecular através de clivagem da ligação entre os resíduos glucosamina N-sulfato e o ácido urónico seguinte, gera um composto de baixo peso molecular com um resíduo na extremidade não redutora composto por um ácido urónico e um resíduo de anidromanose na extremidade redutora, sendo que esta última pode ser modificada para anidromanitol através de redução como borohidreto. Os compostos de baixo peso molecular obtidos contêm, pelo menos, um

resíduo de ácido idurónico *glycol-split*, ou, em alternativa

- f) submeter os produtos obtidos no passo d) a hidrólise enzimática parcial com uma enzima seleccionada entre o grupo constituído por liase, heparinase, heparitinase ou equivalentes, para gerar oligossacarídeos, preferivelmente tetra- ou octassacarídeos, com o resíduo do terminal não redutor composto por ácido urónico não saturado, o resíduo redutor composto por um N-sulfoglucosamina e contendo pelo menos um resíduo de ácido idurónico aberto.

O processo de acordo com a presente invenção é também ilustrado pelos seguintes esquemas:





De acordo com a invenção aqui descrita, os compostos preferidos são:

- N-acetil heparina (50%), obtida através do processo supra descrito, em que o passo a) é realizado durante 2 horas à temperatura ambiente e o passo b) é realizado durante 2 horas a 4°C, o passo c) é realizado a 4°C durante uma noite, o passo d) é realizado durante 3 horas à temperatura ambiente e com um peso molecular (PM) de 11200, um índice de polidispersão D de 1.3, um grau de dessulfatação de 1.6 (expresso sob a forma da razão molar de SO₃-COO-), uma percentagem de ácidos urônicos modificados comparada com os ácidos urônicos totais de aproximadamente 30% (adiante designado por ST1518).

- heparina N-acetil de baixo peso molecular (50%) obtida através do processo supra descrito, em que o passo a) é realizado durante 2 horas à temperatura ambiente e o passo b) é realizado durante 2 horas a 4°C, o passo c) é realizado a 4°C durante uma noite, o passo d) é realizado durante 3 horas à temperatura ambiente e o passo c) é realizado através de desaminação por ácido nitroso a 4°C

durante 17 minutos, seguida de redução dos grupos aldeído com borohidreto à temperatura ambiente durante 3 horas, e com um peso molecular de 4780, $M_n = 10000$, um índice de polidispersão D de 2.092, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% (adiante designado por ST2168).

Os pesos moleculares são determinados através de HPLC-GPC (cromatografia líquida de alta resolução - cromatografia de permeação por gel). O grau de dessulfatação é determinado através de conductimetria e a percentagem de ácidos urónicos modificados através de ^{13}C -RMN.

O PM refere-se ao peso molecular, e D indica o índice de polidispersão expresso sob a forma de PM/M_n .

De acordo com a invenção descrita, os produtos de origem são heparinas naturais. Também é possível usar heparinas quimicamente modificadas com um teor percentual de N,6 dissulfato entre 0 e 100%. A partir de produtos com um teor diferente de glucosamina 6-O sulfatada, é possível modular o comprimento das sequências regulares entre um ácido idurónico aberto e outro. As heparinas de acordo com a invenção, que apresentam uma abertura do anel glicosídeo são convencionalmente designadas por derivados de RO pelos especialistas, significando com isso que o anel glicosídeo foi aberto através de uma acção de oxidação, seguido por uma redução (redução-oxidação - RO). Esta abertura do anel glicosídeo também é convencionalmente designada por *glycol-split*, devido à formação dos dois hidróxi primários presentes no anel

aberto. Os compostos mencionados também são designados por derivados RO ou *glycol-split*.

As heparinas da invenção também podem ser usadas como veículos para outros tipos de medicamentos, através de ligação adequada com a porção da heparina capaz de proporcionar uma ligação estável em condições normais de produção e armazenamento de um medicamento que, contudo, liberta o medicamento transportado no organismo, preferivelmente nas imediações do órgão-alvo. Exemplos de medicamentos que podem ser transportados são medicamentos anti-inflamatórios esteróides e não-esteróides, corticosteróides e outros medicamentos com uma acção antimetastática, sendo que em todos os casos existirá uma optimização vantajosa do efeito antimetastático resultante da soma das actividades intrínsecas separadas dos compostos de acordo com a invenção e do agente antimetastático ligado aos mesmos, com as vantagens associadas a uma maior selectividade alvo e menor toxicidade sistémica. Exemplos destes medicamentos são os inibidores metaloproteinase. Outros medicamentos que podem ser beneficemente transportados são aqueles que actuam a nível endotelial.

No caso de os compostos de acordo com a invenção derivarem da heparina, estes são preparados a partir da heparina, através de N-dessulfatação seguida de N-acilação usando as técnicas conhecidas pelos especialistas técnicos. Por exemplo, a N-dessulfatação é realizada através de solvólise em solução de DMSO:H₂O 95:5 v:v à temperatura ambiente durante um período de tempo entre 0,5 e entre 8 horas, seguida de N-acilação em condições alcalinas com, por exemplo, acil-anidridos (ou

seja, acetil, hexanoil, succinil, pivaloil). As heparinas da invenção podem ainda ser decompostas com agentes ácidos em condições de pH adequadas, por exemplo, com um pH 4, para dar origem a uma mistura de oligossacarídeos que mantêm as propriedades antiangiogénicas.

Os objectos da invenção descrita são composições farmacêuticas contendo como ingrediente activo pelo menos uma heparina modificada aqui descrita. O ingrediente activo de acordo com a presente invenção estará presente numa mistura com veículos e/ou excipientes adequados vulgarmente usados na tecnologia farmacêutica, como, por exemplo, aqueles descritos na obra "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", última edição. As composições de acordo com a presente invenção contêm uma dose terapeuticamente eficaz do ingrediente activo. As doses serão determinadas pelos especialistas, por exemplo, o médico ou especialistas de cuidados primários de acordo com o tipo de doença a tratar e com a condição do paciente, ou concomitantemente com a administração de outros ingredientes activos. Com intuito exemplificativo, podem indicar-se doses entre 0,1 e entre 100 mg/kg.

Exemplos de composições farmacêuticas incluem aquelas que podem ser administradas por via oral ou parentérica, por via intravenosa, intramuscular, subcutânea, transdérmica ou sob a forma de sprays nasais ou orais. As composições farmacêuticas adequadas para este fim são comprimidos, cápsulas duras ou moles, pós, soluções, suspensões, xaropes e formas sólidas para preparações líquidas extemporâneas. As composições para administração parentérica são, por exemplo, todas as formas injectáveis intramusculares, intravenosas e subcutâneas, bem como

soluções, suspensões e emulsões. Também podem mencionar-se as formulações lipossomais. Os comprimidos também incluem formas para libertação prolongada do ingrediente activo sob formas de administração oral, comprimidos revestidos por camadas adequadas, pós microencapsulados, complexos com ciclodextrinas, formas depot (depósito), por exemplo, formas subcutâneas como por exemplo injeções ou implantes depot.

Os compostos de acordo com a invenção aqui descritos são dotados de uma actividade anti-heparanase e antiangiogénica. Esse facto torna-os adequados para a preparação de medicamentos úteis no tratamento de indivíduos, geralmente mamíferos, e em particular seres humanos, que sofrem de angiogénese alterada ou indivíduos que necessitam de um tratamento inibidor da actividade da heparanase.

Exemplos de doenças tratadas com o medicamento objecto da presente invenção são os tumores primários, metástases, retinopatias diabéticas, psoríase, fibroplasia retrolenticular, restenose após angioplastia, *bypass* coronário, inflamação, artrite, doenças auto-imunes, rejeição de enxertos, doenças cardiovasculares, doença fibro-proliferativa, doenças provocadas pela agregação anómala das plaquetas, doenças provocadas pela proliferação no músculo liso, síndrome de Goodpasture, glomerulonefrite aguda, hipertensão pulmonar neonatal, asma, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar adulta, hipertensão vascular renal, retinopatias proliferativas, encefalomielite auto-imune experimental, esclerose múltipla, diabetes insulino-dependente, doença

intestinal inflamatória, colite ulcerativa, doença de Crohn.

Vantajosamente, os compostos de acordo com a presente invenção são substancialmente destituídos dos efeitos secundários típicos da heparina. Em particular, os compostos de acordo com a presente invenção são substancialmente destituídos de actividade anticoagulante. A expressão "substancialmente destituídos de tal actividade" significa que não existe qualquer um apenas uma actividade insignificante do ponto de vista da utilização clínica.

A actividade inibidora da heparanase foi determinada de acordo com um método definido pelo grupo de Vlodavsky (Bitan M. et al, 1995). O método é baseado na avaliação do nível de fragmentação das cadeias de sulfato de heparano dos proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) provocado pela heparanase. A matriz extracelular (MEC) marcada por sulfato é mais vulgarmente usada como fonte de HSPG. A MEC marcada por sulfatado é incubada com heparanase recombinante num pH 6.2 na ausência e na presença de concentrações crescentes do composto do teste. A fim de avaliar a ocorrência de degradação do proteoglicano, recolhe-se o meio de incubação e aplica-se para filtração por gel em colunas Sepharose 6B (0,9 x 30 cm). Eluem-se fracções (0,2 ml) com PBS a uma velocidade de fluxo de 5 ml/h e conta-se a radioactividade. Marca-se o volume excluído (V_0) com azul de dextrano e o volume total incluído (V_t) com vermelho de fenol. Os fragmentos da degradação das cadeias laterais do SH são eluídas da Sepharose 6B a $0,5 < K_{av} < 0,8$ (pico II). Sob as condições experimentais registadas, bons inibidores da heparanase

inibem a fragmentação do SH em concentrações de 10 µg/ml ou menos.

Os resultados são apresentados no Quadro 1, em baixo.

Quadro 1

Inibição da heparanase em doses entre 25 µg/ml e entre 5 µg/ml				
		Inibição		
	Dose	25 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml
	Heparina	100%	n.d.	>100%
ST1516*	Heparina 40% RO	100%	n.d.	>85%
ST1514*	Heparina ~50% RO	100%	100%	>85%
ST1515*	Heparina 27,5% RO	100%	100%	100%
ST1518	50% NAc heparina 30% RO	100%	100%	>85%
*Composto de referência descrito na patente de invenção WO 01/55221				

Digno de menção, o ST1518 possui uma elevada actividade inibitória, mesmo numa concentração de 1 µg/ml.

Os compostos de acordo com a presente invenção, e em particular o novo composto, foram testados quanto à sua actividade no que respeita aos factores de crescimento FGF, com o mesmo modelo experimental descrito na patente de invenção WO 01/55221 e apresentaram uma actividade comparável com os compostos descritos na referência citada.

Os seguintes exemplos ilustram adicionalmente a invenção.

EXEMPLO 1

ST1518

Adicionou-se um excesso de piridina a uma solução aquosa de 1 g de heparina, previamente eluída de uma coluna de Amberlite IR 120. Evaporou-se a solução sob pressão reduzida; dissolveu-se o sal de piridina

resultante da heparina em 50 ml de uma mistura de DMSO/H₂O 95:5 e agitou-se a 20°C durante 2 horas, a fim de se obter um grau de dessulfatação de cerca de 50%.

De seguida, diluiu-se a solução com um volume equivalente de uma solução saturada de NaHCO₃. A solução foi dialisada em água destilada em membranas (*cut-off* 1000-2000D). Isolou-se o produto final através de evaporação sob pressão reduzida.

Preparou-se a heparina N-acetilada através de N-acetilação de 50% da heparina N-dessulfatada. Dissolveu-se 1 g de heparina em 10 ml de água destilada; arrefeceu-se a solução a 4°C e saturou-se com carbonato de hidrogénio de sódio; adicionou-se 625 µl de anidrido acético a esta solução e agitou-se a mistura durante 2 horas a 4°C. Durante a reacção, controlou-se o pH e manteve-se em cerca de 8 adicionando carbonato de hidrogénio de sódio. De seguida, dialisou-se a solução obtida em água destilada em membranas (*cut-off* 2000-1000 D).

Dissolveu-se 1 g de heparina 50% de heparina N-acetilada em 25 ml de água destilada e arrefeceu-se até 4°C. Após a adição de 25 ml de uma solução de NaIO₄ 0,2 M, deixou-se agitar a solução no escuro durante 20 horas e deteve-se a reacção adicionando etilenoglicol e eliminaram-se os sais através de ultrafiltração tangencial. Subdividiram-se 400 mg de NaBH₄ em várias porções e adicionaram-se à solução dessalinizada. Deixou-se a solução agitada durante 3 horas à temperatura ambiente e neutralizou-se com HCl diluído e dessalinizado através de ultrafiltração tangencial.

O espectro da ^{13}C RMN do composto é apresentado na figura 1.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 0155221 A [0008] [0041] [0042] [0070] [0072]
- US 5399667 A [0034]
- EP 0589719 A, Lilly [0035]
- WO 9318793 A [0037]
- EP 0246654 A [0039]
- EP 0394971 A [0039]
- EP 0618234 A [0039]
- WO 9505182 A [0039]
- US 5808021 A [0039]
- EP 0251134 A [0039]
- WO 8805301 A [0039]
- WO 9201003 A [0039]
- WO 9414851 A [0039]
- WO 9606867 A [0039]
- WO 9509637 A [0039]
- WO 9609828 A [0039]
- WO 9530424 A [0039]
- WO 9633726 A [0039]
- WO 0135967 A, Knoll AG [0039]

Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição

- Isr. Med. Assoc. J., 2000, vol. 2, 37-45 [0002]
- J. Med. Chem., 2000, vol. 43, 2591-600 [0002]
- Invasion Metastasis, 1994, vol. 14, 290-302 [0002]
- Exp. Cell Res., 1992, vol. 201, 208-15 [0002]
- Nature Med., 1999, vol. 5, 735-6 [0002]
- Science, 1999, vol. 285, 33-4 [0002]
- **Lapierre F. et al.** *Glycobiology*, 1996, vol. 6 (3), 355-366 [0021]
- **Irimira T.** *Biochemistry*, 1986, vol. 25, 5322-5328 [0023]
- **Ishai-Michaeli R. et al.** *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 2080-2088 [0023]
- **Bitan M. et al.** *Isr. J. Med. Sci.*, 1995, vol. 31, 106-108 [0031]
- **Miao, H. Q. et al.** *Int. J. Cancer*, 1999, vol. 83, 424-431 [0031]
- **Sciumbata, T. et al.** *Invasion Metastasis*, 1996, vol. 16, 132-143 [0031]
- **Parish, C.R. et al.** *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 3433-3441 [0031]
- **Bitan M.** *N-acetylation, N-hexanoylation*, 1995 [0031]
- **Sciumbata, T.** *N-succinylation*, 1996 [0031]
- **Lapierre, F.** *Glycobiology*, 1996, vol. 6, 355-366 [0031]
- **D. Sandback-Pikas et al.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 18777-18780 [0033]
- **M. Maccarana et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268,

23989-23905 [0033]

- Biochim. Biophys. Acta, 1996, vol. 1310, 86-96

[0038]

- Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook

[0064]

- Bitan M. et al. *Vlodavsky's group*, 1995 [0069]

REIVINDICAÇÕES

1. Heparina modificada contendo resíduos de glicosamina com diferentes graus de N-dessulfatação, sendo a subsequente N-acetilação obtida submetendo a heparina ao processo composto pelos seguintes passos:

- a) N-dessulfatação através de hidrólise solvolítica dos resíduos sulfamino em DMSO:H₂O 95:5 v:v à temperatura ambiente durante um intervalo de tempo entre 0,5 e entre 8 horas, para resultar numa eliminação total ou parcial dos grupos sulfato na posição 2 dos resíduos glucosamina;
- b) N-acetilação dos referidos grupos total ou parcialmente dessulfatados na posição 2 dos resíduos glucosamina através de tratamento em solução aquosa alcalina (pH 8-9) com um agente acetilante, para resultar em grupos total ou parcialmente acetilados na posição 2 dos resíduos glucosamina;
- c) oxidação dos dióis com periodato de sódio, para resultar na abertura do anel glicosídeo e na formação de dois grupos aldeído por resíduo modificado;
- d) redução dos referidos grupos aldeído para um álcool primário;
- e) hidrólise ácida opcional dos compostos obtidos no passo d) para obter oligossacarídeos correspondentes às sequências regulares, ou, em alternativa,

- f) submeter os produtos obtidos no passo d) a hidrólise enzimática parcial com uma enzima seleccionada entre o grupo constituído por liase, heparinase, heparitinase ou equivalentes, para gerar oligossacarídeos, com o resíduo do terminal não redutor composto por ácido urónico não saturado, o resíduo redutor composto por um N-sulfoglucosamina e contendo pelo menos um resíduo de ácido idurónico aberto.

2. Heparina de acordo com a reivindicação 1 seleccionada entre o grupo constituído por:

- heparina parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada com um peso molecular (PM) de 11200, um índice de polidispersão de 1,3, um grau de dessulfatação de 1,6 (expresso sob a forma de razões molares entre $\text{SO}_3^-:\text{COO}^-$), uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada aos ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e os resíduos de glicosamina com um grau de N-acetilação de 50%;

- uma heparina de baixo peso molecular parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada com um peso molecular de $M_n = 4780$, $P_m = 10000$, um índice de polidispersão de 2,092, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de N-acetilação de 50%;

- uma heparina parcialmente dessulfatada e N-reacetilada, uma percentagem de ácidos urónicos

modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de N-acetilação de 27%;

- uma heparina parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de N-acetilação de 39%;

- uma heparina parcialmente N-dessulfatada e N-reacetilada, uma percentagem de ácidos urónicos modificados comparada com os ácidos urónicos totais de aproximadamente 30% e resíduos de glicosamina com um grau de N-acetilação de 64%.

3. Uso dos compostos da reivindicação 1 ou 2 para a preparação de um medicamento dotado de actividade inibidora da heparanase.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, em que o referido medicamento é dotado de actividade antiangiogénica.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-4, em que o referido medicamento é útil para o tratamento de inflamações.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-5, em que o referido medicamento é útil para o tratamento de doenças auto-imunes.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-6, em que a doença a tratar é seleccionada entre o grupo constituído por tumores primários, metástases, retinopatias diabéticas, psoríase, fibroplasia retrolenticular, restenose após angioplastia, *bypass* coronário, inflamação, artrite, doenças auto-imunes, rejeição de enxertos, doenças cardiovasculares, doença fibro-proliferativa, doenças provocadas pela agregação anómala das plaquetas, doenças provocadas pela proliferação no músculo liso, síndrome de Goodpasture, glomerulonefrite aguda, hipertensão pulmonar neonatal, asma, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar adulta, hipertensão vascular renal, retinopatias proliferativas, esclerose múltipla, encefalomielite auto-imune experimental, diabetes insulino-dependente, doença intestinal inflamatória, colite ulcerativa, doença de Crohn.

8. Composição farmacêutica contendo pelo menos um composto da reivindicação 1 ou 2 como ingrediente activo numa mistura com veículos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

FIGURA 1
ESPECTRO DE ^{13}C RMN

