

ÖZET**GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN KARBOKSİLATLI TÜREVLERİ VE BUNLARIN
İLAÇ OLARAK KULLANIMI**

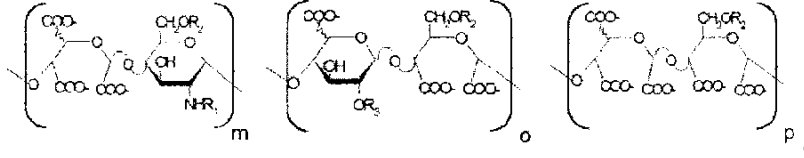
5

Buluş glikozaminoglikan tortularının en azından bir kısmının 2 ve 3 pozisyonlarında karboksilat grupları taşıyan, heparanaz inhibe edici aktivite ve antitümör aktivite ile donatılmış glikozaminoglikan türevleri ve bunların hazırlanmasına yönelik prosesle ilgilidir.

- 10 Bu buluşun glikozamoglikan türevleri, isteğe bağlı olarak kimyasal olarak veya enzimatik olarak modifiye edilmiş doğal veya sentetik glikozaminoglikanlardan başlayarak üretilir.

İSTEMLER

1. Bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş bir türevi olup, özelliği; sözü edilen türevin aşağıdaki yapıları içermesi:



5 burada R_1 'in SO_3 ya da Ac olması; R_2 'nin SO_3 ya da H olması; ve R_3 'ün SO_3 olması ile karakterize edilir.

2. İstem 1'e göre glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; karboksillenmiş türevin türetildiği başlangıç glikozaminoglikanının heparin, düşük molekül ağırlıklı heparin ve heparan sülfattan seçilmiş olmasıdır.

10 3. İstem 2'ye göre glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; burada

(a) heparinin 2-O- ve isteğe bağlı olarak 2-N-desülfatlanmış heparin olması, ve/veya

15 (b) düşük moleküler ağırlıklı heparinin 2-O- ve isteğe bağlı olarak 2-N-desülfatlanmış düşük moleküler ağırlıklı heparin olmasıdır.

4. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; karboksillenmiş türevin elde edildiği başlangıç glikozaminoglikanın, burada tanımlandığı gibi iletken timetrik titrasyon ile belirlendiği üzere 0.8 ila 2.8 ya da 0.9 ila 2.5 arasında bir sülfatlaşma derecesine (20 SO_3^-/COO^-) sahip olmasıdır.

5. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevinin, burada tanımlandığı gibi iletken timetrik titrasyon ile belirlendiği üzere 0.82 ila 1.92 arasında bir sülfatlaşma derecesine (SO_3^-/COO^-) sahip olmasıdır.

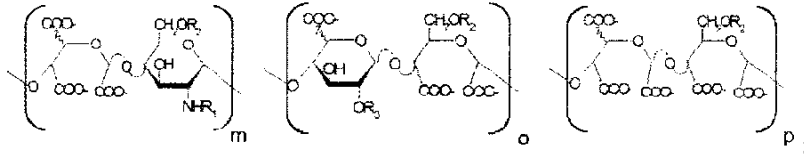
25 6. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; sözü edilen türevin (a) 8000 ila 30,000 Da, (b) 3000 ila 20000 Da ya da (c) 3500 ila 12000 Da arasından seçilen bir moleküler ağırlığa sahip olmasıdır.

7. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; sözü edilen türevin heparanaz inhibe edici aktiviteye sahip olmasıdır.

8. İstemler 1-7'den herhangi birine göre glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; bir ilaç olarak kullanım için olmasıdır.

9. İstemler 1-7'den herhangi birine göre bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi olup, özelliği; heparanazın inhibisyonundan fayda sağlayan bir endikasyon tedavisinde kullanım için olmasıdır.

10. İstemler 1-7'den herhangi birine göre bir glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevinin enzimatik ya da kimyasal kısmi depolimerizasyonu ile elde edilen oligosakarit bileşikler olup, özelliği; burada oligosakarit bileşiklerinin en azından aşağıdaki yapılardan birini içermesi:



15 burada R₁'in SO₃ ya da Ac olması; R₂'nin SO₃ ya da H olması; ve R₃'ün SO₃ olmasıdır.

11. İstem 10'a göre oligosakarit bileşikler olup, özelliği; bir ilaç olarak kullanım için olmasıdır.

12. İstem 8'e göre kullanım için glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi ya da istem 11'e göre kullanım için oligosakarit bileşikler olup, özelliği; sözü edilen ilaçların antimetastatik ya da antitümoral ilaçlar olmasıdır.

13. İstem 8'e göre kullanım için glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevi ya da istem 11'e göre kullanım için oligosakarit bileşikler olup, özelliği; sözü edilen ilaçların antimyeloma ilaçları olmasıdır.

25 14. Farmasötik bir kompozisyon olup, özelliği, istemler 1-7'den herhangi birine göre glikozaminoglikanın karboksillenmiş türevini, isteğe bağlı olarak en az bir başka etken madde ile kombinasyon halinde içermesidir.

TARİFNAME

GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN KARBOKSİLATLI TÜREVLERİ VE BUNLARIN İLAÇ OLARAK KULLANIMI

5

TEKNİK ALAN

Buluş glikozaminoglikan tortularının en azından bir kısmının 2 ve 3 pozisyonlarında karboksilat grupları taşıyan, heparanaz inhibe edici aktivite ve antitümör aktivite ile donatılmış glikozaminoglikan türevleri ve bunların hazırlanmasına yönelik prosesle ilgilidir.

10

TEKNİĞİN BİLİNER DURUMU

Multipl miyelom, ikinci en yaygın hematolojik malignitedir ve her yıl yaklaşık 20.000 yeni vaka ve % 50'den daha büyük bir ölüm oranı ile Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm hematolojik kanserlerin % 10'undan fazlasını oluşturmaktadır (Graham-Rowe D., 2011, Multiple myeloma outlook. Nature 480, s34-s35).

15

Son yıllarda, proteazom inhibitörünün (Velcade), bifosfonatların ve diğerlerinin arasında talidomidin uygulanması gibi umut verici terapiler geliştirilmiştir. Bu ajanların etkinliği, en azından kısmen, miyelom tümörünün mikro-çevresi üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır.

20

Söz konusu ajanların miyeloma karşı etkinliği gösterilmiş olsa da, miyelom ve diğer tümörleri tedavi etmek için yeni ve geliştirilmiş ilaçlara ihtiyaç devam etmektedir.

Heparanaz, syndecan-1 gibi HS-proteoglikanların heparan sülfatını (HS) bölen ve böylece HS'ye bağlı büyüme faktörlerini serbest bırakan endo- β -glukuronidazdır.

25

İnsanlarda, HS'yi parçalayabilen tek bir dominant fonksiyonel heparanaz enzimi var gibi görünmektedir. Heparanaz çoğu insan tümöründe ekspres edilmekte olup burada tümör hücrelerinin hem anjiyojenik hem de metastatik potansiyelini önemli ölçüde arttırmaktadır. Yüksek heparanaz seviyeleri aslında birçok tümör tipinin aşırı ilerleme ve metastazı ile ilişkilidir. Örneğin, yüksek bir heparanaz seviyesi, ameliyat sonrası daha kısa sağkalım süresi ile ilişkilidir. Yeni inhibitörlerimizin test

30

edildiği Vlodavskiy ve Sanderson laboratuvarlarında, heparanazın tümör metastazı üzerindeki doğrudan rolü gösterilmiştir.

HS'ye bağlı büyüme faktörlerinin serbest bırakılmasını ve hücre dışı matrisin (ECM) degradasyonunu içeren enzimatik fonksiyonlarına ek olarak, heparanaz ayrıca tümör davranışını ve mikro-çevreyi etkileyebilen enzimatik olmayan bir fonksiyona da sahiptir. Miyelomda heparanaz ve syndecan-1 çalışmasına öncülük eden Sanderson grubu, heparanazın miyelomda agresif tümör fenotipinin ana regülatörü olarak görev yaptığını ortaya koymuştur. Bu da tümör büyümesini, metastatik ve osteolitik kemik yıkımını birlikte uyaran VEGF ve MMP-9'un yukarı regülasyonunu teşvik ederek gerçekleşmektedir. Aslında, *in vivo* olarak, heparanazın, miyelom tümörlerinin büyümesini ve kemiğe spontan metastazı teşvik ettiği ve tümör hücreleri tarafından heparanaz ekspresyonunun, en azından kısmen RANKL ekspresyonunun yukarı regülasyonundan dolayı, yaygın osteolizi tetiklediği kanıtlanmıştır. Heparanazın etkisini destekleyen osteoliz, kemik parçalanırken kemiğe bağlı büyüme faktörleri salındığı için büyük önem taşıyabilir. Buna ilaveten, osteoklastlar HGF gibi tümör büyümesini teşvik edici faktörleri salabilirler. Bu faktörler birlikte kemik iliği içinde tümör hücrelerinin yuvalanmasını sağlayan ve daha sonra büyümesini destekleyen nişlerin kurulmasına yardımcı olabilir (Fux, L. ve ark. , 2009, "Heparanase: busy at the cell surface." Trends Biochem Sci, 34 (10): 511-519; Sanderson R.D. and Yang Y., 2008, "Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment." Clin Exp Metastasis 25:149-59; Ilan N. ve ark. , 2006, "Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis." Int J Biochem Cell Biol, 38: 2018-2039). Buna bağlı olarak heparanazın inhibisyonu, insanlarda tek bir enzimatik açıdan aktif heparanaz olduğu ve normal dokulardaki ekspresyonunun nadir olması gerçeğiyle desteklenen miyelom tedavisinin uygulanabilir bir hedefidir. Buna ilaveten, heparanaz nakavt farelerin canlı olduğu ve görünür bir bozukluk sergilemediği gösterilmiştir. Bu ise çok az (ya da hiç) yan etkinin heparanaz inhibisyon stratejisinden kaynaklanabileceğini göstermektedir (Casu B., ve ark. 2008. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. Pathophysiol Haemost Thromb. 36: 195-203; Vlodavsky I., ve ark. 2007. Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. Curr Pharm Des. 13: 2057-2073; Naggi A., ve ark.

2005. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded N-Acetylation, and Glycol Splitting. *J. Biol. Chem.* 280: 12103-12113).

Heparin, antikoagülan ve antitrombotik aktivite ile donatılmış, glikozaminoglikan ailesinin lineer çoğul dağılımlı sülfatlanmış bir polisakaritidir. Heparinin sakarit zincirleri, değişken üronik asit ve D-glukosaminden oluşmaktadır. Temel yinelenen birim 2-O-sülfatlanmış L-iduronik asit (IdoA2S) α (1→4) ve N-, 6-O-disülfatlanmış D-glukozamindir (GlcN6S). Küçük bileşenler, N-asetil D-glukozamin ve N-, 3-O-, 6-O-trisülfatlanmış D-glukozamin ile birlikte sülfatlanmamış L-iduronik ve D-glukuronik asittir (Casu B., 2005. "Structure and active domains of heparin." In: *Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate*. Amsterdam: Elsevier. 1-28; Casu B. and Lindahl U., 2001, "Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate." *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 57: 159-206). Yapısal olarak HS'ye benzer olan Heparin, heparanazı etkili bir biçimde inhibe edebilir, ancak bir heparanaz inhibisyon stratejisinde heparinin yüksek dozlarda kullanımı antikoagulan aktivitesi nedeniyle imkansızdır.

İlginç bir biçimde, heparinden daha fazla biyoyararlanımlı ve daha az antikoagülan olan düşük moleküler ağırlıklı heparinlerin (LMWH), muhtemelen tümör büyümesi ve metastaz üzerindeki doğrudan etkisi ile kanserli hastaların yaşamlarını uzattığı görülmektedir. Bu, en azından kısmen, heparanaz enzim aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olabilir (Zacharski L.R., and Lee, A.Y. 2008. Heparin as an anticancer therapeutic. *Expert Opin Investig Drugs* 17:1029-1037).

Heparanazın enzimatik aktivitesinin etkili inhibitörleri tekniğin bilinen durumunda, çoğu bir glikosaminoglikan kalıntısının karbonları 2 ve 3 arasındaki bağın yarılmasıyla (glikol bölünmesi) glukosidik halkanın açılmasıyla modifiye edilen sülfatlanmamış üronik asit kalıntıları içeren antikoagülan olmayan heparinler tarafından gerçekleştirilen heparanaz inhibisyonu incelenerek seçilmiştir. Bahsedilen inhibitörler, O-sülfatlaşma modellerinde, N-asetilasyon derecesinde ve önceden var olan sülfatlanmamış üronik asit kalıntılarının ve basamaklı 2-O-desülfasyon ile üretilenlerin glikol ayrışması açısından farklılık sergilemektedir (Naggi A., 2005. "Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative." In: *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Amsterdam: Elsevier

461-481; Yang Y. ve ark. , 2007, "The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy." Blood, 110:2041-2048).

Özellikle "glikol bölünmesi" terimi (gs) geleneksel olarak, her biri bir hidroksil grubu taşıyan iki bitişik karbon arasında bir bağlantının kopması (glikol bölünmesi) nedeniyle bazı monosakarit kalıntılarının açılmasını sağlayan polisakaritleri ifade etmektedir. Bir birinci jenerasyon glikol bölünmüş heparinler, yani diğer bir deyişle "indirgenmiş oksiheparinler" (RO-heparinler), önce dialdehitlere oksitlenen ve sonra alkollere indirgenen, orijinal zincir boyunca mevcut olan sülfatlanmamış glukuronik asit / iduronik asit kalıntılarına karşılık gelen, bazen glikol bölünmüş kalıntılar tarafından kesilen modifiye edilmemiş polisülfatlanmış bloklardan oluşmaktadır (Naggi A., 2005, "Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative." In: Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Amsterdam: Elsevier 461-481).

WO 01/55221, toplam üronik asit birimlerinin % 60'ından büyük olmayan 2-O-desülfasyon derecesine sahip glikozaminoglikanları açıklamaktadır. Sözü edilen glikozaminoglikanlar, antikoagülan aktivitesinden yoksundur ve FGF'lerin inhibisyonuna dayanan antianjiyogenik aktivite sergilemektedir. Heparanazın inhibisyonu için herhangi bir aktivite öngörülmemiştir.

US 2008/0051567 numaralı patent, % 100 N-asetillenmiş ve % 25 glikol bölünmüş heparine karşılık gelen, çok az (ya da hiç) antikoagülan aktivite veya hücre dışı matristen büyüme faktörlerinin salınımını sergileyen bir bileşiği açıklamaktadır. Sözü edilen bileşiğin, Sanderson'un miyelom modeli (Yang Y., ve ark. 2007. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. Blood 110:2041-2048) dahil olmak üzere deneysel hayvan modellerinde heparanaz, tümör büyümesi, anjiyogenez ve inflamasyonu önlediği bulunmuştur.

Buna rağmen, heparanaz afinitesi yüksek olan, yüksek seçicilik ve gelişmiş biyoyararlanıma sahip olan, miyelom ve diğer tümörler gibi heparanaz ile ilişkili patolojilerin tedavisi için uygun olan geliştirilmiş bileşiklerin sağlanmasına hala ihtiyaç vardır.

BULUŞUN TANIMI

Bu buluşun glikozamoglikan türevleri, isteğe bağlı olarak kimyasal olarak veya enzimatik olarak modifiye edilmiş doğal veya sentetik glikozaminoglikanlardan başlayarak üretilir. Özellikle sözü edilen glikozaminoglikan türevleri glikozaminoglikanın oksidasyonunun iki adımı ile elde edilebilmektedir. Birinci oksidasyon (a) ile, tercihen periyodat ile, bitişik dioller ve isteğe bağlı olarak glikozaminoglikan kalıntılarının OH/NH₂'si aldehitlere dönüştürülür ve ikinci oksidasyon (b) ile sözü edilen dialdehitler karboksilat gruplarına dönüştürülür. Mevcut buluşa göre, 2-O sülfatlanmamış kalıntıların tercihen % 10 ila % 100'ü, daha tercihen % 25 ila % 100'ü isteğe bağlı olarak glikozaminoglikanın 2N-, 3-O-sülfatlanmamış kalıntıları, bitişik diolleri ve isteğe bağlı olarak OH/NH₂'yi aldehitlere dönüştürmek için etkili koşullar altında birinci oksidasyon adımı (a) okside edilmektedir.

Birinci oksidasyon tercihen oksitlenebilen kalıntıların halkasının C₂-C₃ bağlantısının bölünmesine yol açmaktadır. Tercihen, glikozaminoglikan isteğe bağlı olarak 2-O- ve/veya 2-N-desülfatlanmış, 0.8 ila 2.8 arasında, tercihen 0.9 ila 2.5 arasında bir sülfatlaşma derecesine (SO₃⁻/COO⁻ molar oranı) sahip olan bir doğal ya da sentetik glikozaminoglikandır. Sülfatlaşma derecesi (SO₃⁻/COO⁻ molar oranı) burada, Casu B. ve Gennaro U., 1975, Carbohydr Res 39, 168-176'ya göre iletken timetrik titrasyon ile belirlendiği şekildedir. Yukarıda tarif edilen buluş prosesi ile elde edilebilen di/trikarboksilatlı glikozaminoglikan türevleri, 1.2 ila 2.2 arasında bir karboksil artışı sergilemekte olup burada karboksil artışı, başlangıç malzemesinin sülfatlaşma derecesinin (SO₃⁻/COO⁻ molar oranı) di/trikarboksilatlı türevinin sülfatlaşma derecesine (SO₃⁻/COO⁻ molar oranı) oranı (burada tanımlandığı gibi iletken timetrik titrasyon ile belirlenmiştir) olarak hesaplanmaktadır. Daha spesifik olarak, başlangıç glikozaminoglikanın sülfatlaşma derecesi, NaBH₄ ile indirgemedten sonra birinci oksidasyon adımı (a) ile elde edilen glikozaminoglikan ara maddesinin bir numunesi üzerinde belirlenmektedir.

Tercihen mevcut buluşun glikozaminoglikan türevleri herhangi bir hayvan ya da organ kaynağından elde edilen doğal heparinlerden ya da isteğe bağlı olarak kimyasal ya da enzimatik olarak modifiye edilmiş sentetik heparinlerden başlayarak elde edilmektedir. Daha tercihen, başlangıç materyali fraksiyone olmayan heparin, düşük moleküler ağırlıklı heparinler (3.500 ila 8.000 Da

moleküler ağırlığa sahip LMWH'ler), heparan sülfat (HS) veya bunların türevleridir. En çok tercih edilen glikozaminoglikan türevleri ise fraksiyone olmayan heparinlerden ya da LMWH'den (isteğe bağlı olarak 2-O ve/veya 2-N-desülfatlanmış) elde edilebilenlerdir.

- 5 Buluş ayrıca, söz konusu glikozaminoglikan türevlerinin hazırlanması için bir işleme ve ayrıca isteğe bağlı olarak bilinen ilaçlar veya tedavilerle kombinasyon halinde, ilaçların aktif bileşenleri olarak kullanımları ile ilgilidir. Özellikle mevcut buluş, metastatik formları dahil olmak üzere, multipl miyelom ve diğer neoplaziler (yani sarkomlar, karsinomlar, hematolojik maligniteler) gibi patolojik durumların
- 10 tedavisi için ilaç olarak kullanılmak üzere sözü edilen glikozaminoglikan türevlerine yöneliktir.

- Buna ilaveten mevcut buluş heparanazın inhibisyonundan yararlanan herhangi bir terapötik endikasyonda (yani, diyabetik nefropati, enflamatuvar barsak hastalığı, kolit, artrit, sedef hastalığı, sepsis, ateroskleroz) sözü edilen glikozaminoglikan
- 15 türevlerinin kullanımıyla da ilgilidir. Buluş ayrıca, sözü edilen di/trikarboksilatlı glikozaminoglikan türevlerini içeren farmasötik kompozisyonlarla, özellikle de aktif madde olarak di/trikarboksilatlanmış heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) türevlerini içeren farmasötik kompozisyonlarla ilgilidir. İsteğe bağlı olarak, sözü edilen farmasötik kompozisyonlar ayrıca en az bir farklı aktif madde, tercihen
- 20 en az bir farklı antitümöral ajan içermektedir.

Çizimler

- Şekil 1: mevcut buluşun prosesiyle üretilmiş yaygın yapılar. (1) hidroksil gruplarının (R_3 ve R_4) her birinin veya her ikisinin bir sülfat grubu ile ikame edilebildiği veya ikame edilmediği bir üronik asit (iduronik ve/veya glukronik) ve bir
- 25 glukosamin (2-N-asetillenmiş, 2-N-ikame edilmemiş ve/veya 2-N-sülfatlanmış) içeren bir glikosaminoglikan polimerinin disakkaridik birimi. (2, 3, 4) 2-sülfatlanmamış heparin kalıntılarının halkasının oksidatif bölünmesiyle ve ardından tri- veya di-karboksilatlanmış kalıntılara daha fazla oksidasyon ile oluşturulan temsili yapılar (yeni varlıklar).

- 30 Şekil 2: MS saptaması ile elde edilen bir kromatogram örneği. Moleküler ağırlığın ölçülen değerlerine atfedilen üronik asit di- ya da tri-karboksilat kalıntılarını içeren

oligosakaritlere karşılık gelen piklerin varlığı, grafikte sırasıyla "+ karboks2" ya da "+ karboks3" kodlarıyla vurgulanmaktadır.

Şekil 3: MS saptaması ile elde edilen bir kromatogram örneği. Moleküler ağırlığın ölçülen değerlerine atfedilen üronik asit di- ya da tri-karboksilat kalıntılarını içeren oligosakaritlere karşılık gelen piklerin varlığı, grafikte sırasıyla "+ karboks2" ya da "+ karboks3" kodlarıyla vurgulanmaktadır.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLANMASI

Mevcut buluş, heparanaz inhibe edici aktiviteye sahip, kimyasal olarak modifiye edilmiş glikozaminoglikan türevlerinin yeni bir sınıfına ilişkindir. Mevcut buluş özellikle karboksillenmiş glikozaminoglikan türevleriyle ilgili olup burada kalıntıların en azından bir kısmı, üç (ya da ayırık kalıntı bir glukozamin ise, iki) karboksilat grubu içeren ayırık kalıntılardır.

Mevcut buluşun glikozaminoglikan türevleri, tercihen, heparanazın heparan sülfat degradasyon aktivitesini kuvvetle inhibe eden "di/trikarboksilatlanmış heparinler" olarak tasarlanmış heparin türevleridir. ATIII için bağlama bölgesinde bulunan glukuronik asit tortusunu modifiye eden heparine yapılan kimyasal modifikasyonlar, yüksek dozların kullanılmasını sağlayacak şekilde heparin antikoagülan aktivitesini ortadan kaldırmaktadır.

Mevcut buluşun glikozaminoglikan türevleri, tercihen periyodat ile glikozaminoglikanın 2-sülfatlanmamış kalıntılarının bitişik diollerin ve isteğe bağlı olarak glikozaminoglikanın OH/NH₂'sinin aldehitlere dönüştürülmesinde etkili koşullar altında oksidasyonu ve ardından sözü edilen dialdehitleri karboksilat gruplarına dönüştürmek için uygun koşullar altında oksitlenmiş glikozaminoglikanın oksidasyonu ile elde edilebilirler. Özellikle mevcut buluşun glikozaminoglikan türevleri tercihen, 0.8 ila 2.8, tercihen de 0.9 ila 2.5 arasında bir sülfatlaşma derecesine (SO₃⁻/COO⁻ molar oran) sahip olan bir glikozaminoglikandan başlayarak elde edilebilirler. Sülfatlaşma derecesi (SO₃⁻/COO⁻ molar oranı) burada, Casu B. ve Gennaro U., 1975, Carbohydr Res 39, 168-176'ya göre iletken timetrik titrasyon ile belirlendiği şekildedir. Yukarıda tarif edilen buluş prosesi ile elde edilebilen di/trikarboksilatlı glikozaminoglikan türevleri, 1.2 ila 2.2 arasında bir karboksil artışı sergilemekte olup burada sözü edilen karboksil artışı, başlangıç malzemesinin sülfatlaşma

derecesinin ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ molar oranı) birinci oksidasyon adımından sonra di/trikarboksilatlı türevinin sülfatlaşma derecesine ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ molar oranı) oranı (burada tanımlandığı gibi iletken timetrik titrasyon ile belirlenmiştir) olarak hesaplanmaktadır. Daha spesifik olarak, birinci oksidasyon adımından sonra
 5 başlangıç materyalinin sülfatlaşma derecesi, NaBH_4 ile indirgemedten sonra birinci oksidasyon adımı (a) ile elde edilen glikozaminoglikan ara maddesinin bir numunesi üzerinde belirlenmektedir.

Tercihen, bu buluşun glikozaminoglikan türevleri, doğal veya sentetik (kimyasal veya enzimatik olarak elde edilmiş) glikozaminoglikanlardan, daha tercihen 2-O-
 10 ve/veya 2-N-desülfatlanmış glikozaminoglikanlardan elde edilmiştir. Tercih edilen bir düzenlemede, sözü edilen doğal ya da sentetik glikozaminoglikan fraksiyone olmamış heparin, LMWH ya da isteğe bağlı olarak 2-O- ve/veya 2-N-desülfatlanmış heparan sülfattır.

Daha tercihen glikozaminoglikan türevleri doğal ya da sentetik heparinler ya da
 15 LMWH'ler, 2-O- ve isteğe bağlı olarak 2-N- desülfatlanmış olanlardan elde edilmektedir.

Bir örnek olarak, heparin zincirleri doğal olarak yaklaşık % 5 ila % 35 arasında 2-O-sülfatlanmamış üronik asit kalıntıları, % 0 ila % 50 arasında N-asetillenmiş glukozamin kalıntıları ve yaklaşık % 0 ila % 6 arasında N-ikame edilmemiş (ne N-sülfatlanmış ne de N-asetillenmiş) glukozamin kalıntıları içerebilirler. Farklı sülfatlaşma dereceleri heparinin kaynağına (hayvan türleri, organ kaynakları) ve ekstraksiyon prosedürlerine bağlıdır. Glikozaminoglikanın 3-O-sülfat ikame edicileri taşımayan her 2-O- ya da 2N-sülfatlanmamış kalıntıları halka açıklığı (ayrık) ile oksidasyona ve visinal diollerin ve OH/NH_2 'nin aldehitlere dönüşmesine
 20 karşı duyarlıdır. İsteğe bağlı olarak, başlangıç glikozaminoglikanlarının dereceli 2-O-desülfasyonu, glukozamin/üronik asit bölünmüş kalıntılarının oranını değiştirmeye olanak tanımaktadır.

Buluş ayrıca, söz konusu karboksillenmiş glikozaminoglikan türevlerinin hazırlanması için bir işlemle ve ayrıca bunların tek aktif bileşen olarak veya diğer
 30 ilaçlarla kombinasyon halinde patolojik durumların tedavisi için aktif ilaç bileşenleri olarak kullanımlarıyla ilgilidir. Sözü edilen patolojik durumlar, metastatik formları da dahil olmak üzere, multipl miyelom ve diğer neoplastik hastalıkları

içermektedir. Buna ilaveten buluş heparanazın inhibisyonundan fayda sağlayan herhangi bir terapötik endikasyonda kullanım için sözü edilen karboksillenmiş glikozaminoglikan türevleriyle ilgilidir. Buluş ayrıca, isteğe bağlı olarak en az bir başka etken madde ile kombinasyon halinde sözü edilen karboksillenmiş glikozaminoglikan türevlerini içeren farmasötik kompozisyonlarla da ilgilidir.

Buluşun karboksillenmiş glikozaminoglikan türevlerini hazırlamak için proses şunları içermektedir: bitişik diollerin ve isteğe bağlı olarak bitişik OH/NH₂'nin aldehidlere dönüştürülmesinde etkili koşullar altında bir glikozaminoglikanın duyarlı sülfatlanmamış kalıntısının tercihen periyodat (veya benzer reaktiviteye sahip oksitleyici reaktiflerin kullanılmasıyla) ile oksidasyonu, bunun ardından da karşılık gelen aldehit gruplarından iki yeni karboksilat grubu elde etmek için gerekli koşullar altında birinci oksidasyondan kaynaklanan glikozaminoglikanın oksidasyonu gerçekleşir.

Mevcut buluşun prosesi buna bağlı olarak, bitişik diolleri ve isteğe bağlı olarak bitişik OH/NH₂'yi aldehitlere dönüştürmek için etkili koşullar altında, tercihen periyodat ile, bir glikozaminoglikanın 2-O- ve isteğe bağlı olarak 2N-, 3-O-sülfatlanmamış kalıntılarının % 10 ila % 100'ünün, tercihen % 25 ila % 100'ünün oksidasyonunu; daha sonra da sözü edilen dialdehitleri karboksilat gruplarına dönüştürmede etkili koşullar altında oksitlenmiş glikozaminoglikanın oksidasyonunu içermektedir.

Tercihen, başlangıç glikozaminoglikanı doğal veya sentetik bir glikozaminoglikandır; daha tercihen, heparin, düşük molekül ağırlıklı heparinler veya heparan sülfattan seçilmektedir; en çok tercihen, 2-O- ve isteğe bağlı olarak 2-N-desülfatlanmış heparin ve LMWH'ler arasından seçilmektedir.

Tercihen, başlangıç glikozaminoglikanı, burada tanımlandığı gibi iletken timetrik titrasyona göre, 0.8 ila 2.8, daha tercihen 0.9 ila 2.5 arasında bir sülfatlaşma derecesine (SO₃⁻/COO⁻) sahiptir.

Buluşa ait prosesin ilk oksidasyonu tercihen 3 ila 10 arasında değişen bir pH'ta, daha tercihen 4.5 ila 8 arasında değişen bir pH'ta gerçekleştirilmiştir. Tercih edilen bir düzenlemede, buluşa ait prosesin birinci oksidasyonu sülfatlanmamış üronik asit kalıntılarının sadece C₂-C₃ bağlantısını kesmek ve bu sırada da yan reaksiyonlardan kaçınmak için 3 ila 5 arasında bir pH'ta gerçekleştirilmektedir.

Tercih edilen bir diğer düzenlemede, buluşa ait prosesin birinci oksidasyonu hem 2-O-sülfatlanmamış üronik asit ve hem de N-sülfatlanmamış glukozamin kalıntılarının C₂-C₃ bağlantısını kesmek için 5.5 ila 10 arasında bir pH'ta gerçekleştirilmektedir.

- 5 Tercih edilen bir düzenlemede, ilk oksidasyon, hem 2-O- sülfatlanmamış üronik asitlerin ve hem de 2-N-, 3-O- sülfatlanmamış glukozaminlerin C₂ ve C₃'leri arasındaki bağı ayırma koşulları altında gerçekleştirilmektedir.

- İsteğe bağlı olarak buluşun yenilikçi prosesi depolimerleşmeyi azaltmak için kullanılan bir şelatlayıcı ve sekestrasyon ajanı olan NTA (nitrilotriasetik asit) 10 varlığında, reaksiyon çözeltisini alkalileştirmek için NaHCO₃ veya piridin varlığında ya da NTA ile ya da NTA'sız MnCl₂ varlığında gerçekleştirilmektedir. Daha ileri dialdehit oksidasyonu, tercihen NaClO₂ kullanılarak ya da TEMPO (2,2,6,6 Tetra Metil-1-Piperidinil-Oksi) gibi benzer oksitleyici özelliklere sahip ajanların kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir.

- 15 Tercihen, mevcut buluşun glikozaminoglikan türevlerindeki karboksillenmiş üronik asit kalıntıları, glikozaminoglikanın toplam karboksillenmiş kalıntılarının toplam kalıntılarının % 25 ila % 100, daha tercihen % 50 ila % 100, en çok tercihen % 60 ila % 90'ı oranındadır.

- Yukarıda söz edilen proseslerle elde edilebilen karboksillenmiş glikozaminoglikan 20 türevleri, proses koşullarına ve kullanılan başlangıç glikozaminoglikanına bağlı olarak tercihen 8000 ila 30.000 Da arasında bir molekül ağırlığına sahiptir. Tercih edilen bir düzenlemede, daha tercihen fraksiyone olmayan heparin başlangıç glikozaminoglikan olarak kullanıldığında, yukarıdaki işlemler ile elde edilebilen karboksilatlı glikozaminoglikan türevi, tercihen 3,000 ila 20,000 Da, tercihen 3,500 25 ila 12,000 Da arasında bir moleküler ağırlığa sahiptir.

- Mevcut buluşun prosesi ile elde edilebilen yeni glikosaminoglikan türevleri, her biri iki ilave karboksilat grubu içeren, bölünmüş kalıntıların varlığı ile karakterize edilen yeni bir heparin benzeri polisakarit sınıfını temsil etmektedir. Bir doğal karboksilat grubu taşıyan kalıntıların, mevcut buluşun işlemi ile trikarboksilatlı kalıntıya 30 dönüştürüldüğü unutulmamalıdır. Sözü edilen yeni di/trikarboksilatlı glikozaminoglikan türevlerinin beklenmedik bir şekilde in vitro olarak güçlü

heparanaz inhibitörleri oldukları ve hayvan modellerinde miyelomu inhibe ettikleri gösterilmiştir.

Ana glikosaminoglikandan daha az sülfatlanmış iki veya üç karboksilat grubu taşıyan kalıntılar içeren glikozaminoglikan türevleri, daha az karboksilik gruba sahip olan analoglarından daha iyi farmakokinetik özellikler sergilemektedir.

Mevcut buluş ayrıca ilaç olarak kullanmak üzere yukarıda tarif edilen proseslerle elde edilebilen bileşiklerle ilgilidir.

Özelde, mevcut buluş, tek başına ya da en az bir başka etken maddeyle birlikte, antitümör olarak kullanım için, tercihen antimyeloma ilaçları olarak kullanım için yukarıda tarif edilen proseslerle elde edilebilen bileşiklerle ilgilidir.

Mevcut buluşa göre hazırlanmış olan heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparin türevleri çoklu bir miyelom deneysel modelinde hem in vitro hem de in vivo olarak heparanaz aktivitesinin etkili bir biçimde inhibisyonunu sergilemiştir.

Örnekler

Bileşiklerin hazırlanması

İletken timetrik titrasyon ile farklı derecelerdeki sülfatlaşma ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) ile donatılan fraksiyone edilmemiş veya fraksiyone heparin numuneleri bilinen yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirilen periyodik oksidasyona (bölünmüş dialdehit üniteleri vermek için) tabi tutulmuştur. Fraksiyone olmamış heparinlerin (UFH) kademeli 2-O-sülfattan arındırılması bilinen yöntemlerin modifikasyonunun ardından gerçekleştirilmiştir (Jaseja M. ve ark., 1989, "Novel regio- and stereo-selective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence." Canad J Chem, 67, 1449-1455; R.N. Rej and A.S. Perlin, 1990, "Base-catalyzed conversion of the α -L-iduronic acid 2-sulfate unit of heparin into a unit of α -L-galacturonic acid and related reactions." Carbohydr. Res. 200, 25, 437-447; Casu B. ve ark. , 2004, "Undersulfated and Glycol-Split Heparins Endowed with Antiangiogenic Activity." J. Med. Chem., 47, 838-848). Bazik koşullar altında, 2-O-desülfatlanmış (doğal veya kimyasal olarak indüklenmiş) L-iduronik asit üniteleri, 2,3-epoksi türevlerine ve son olarak da L-galakturonik asit ünitelerine dönüştürülmektedir.

Üronik asit ünitelerinden ve isteğe bağlı olarak glukozaminlerden kaynaklanan dialdehitler tercihen ve kısa sürede dikarboksilatlarla oksitlenmektedir.

In vitro test

Bisio ve arkadaşlarının (Bisio A. ve ark. 2007, High-performance liquid chromatographic /mass spectrometric studies on the susceptibility of heparin specie to cleavage by heparanase. Sem Thromb hemost 33 488-495) daha önceki çalışmalarına dayanarak, heparanaz inhibe edici aktivite, Hammond ve arkadaşları (Hammond ve ark. 2010, Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening. Anal Biochem. 396, 112-6) tarafından tarif edilen yöntemle göre, İsrail'deki Haifa Üniversitesinden Prof. Vlodavsky'nin grubu tarafından in vitro olarak belirlenmiştir. Kısacası heparanaz yapısal olarak heparinin antitrombin bağlanma bölgesine karşılık gelen bir antitrombotik ilaç olan sentetik pentasakarit Fondaparinux'u bölebilir. Heparanaz bölünmesinden sonra, bir trisakarit ve bir indirgeyici disakarit elde edilmiştir. Bunlardan ikincisi heparanaz aktivitesini değerlendirmek için kolayca ölçülebilir. Mevcut örneklerde, analiz çözeltisi (100ul), inhibitör numunesi olan veya olmayan 40 mM sodyum asetat tamponu pH 5.0 ve 100 mM Fondaparinux (GlaxoSmithKline) içermektedir. Analizi başlatmak üzere heparanaz, 140 pM'lik nihai bir konsantrasyona ilave edilmiştir. Plakalar yapışkan bant ile kapatılmış ve 37°C sıcaklıkta 2-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Analiz 0.1M NaOH içerisinde 100uL 1.69 mM 4-[3-(4-iodofenil)-1H-5 tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat (WST-1, Aspep, Melbourne, Avustralya) çözeltisinin eklenmesi ile durdurulmuştur. Plakalar yapışkan bant ile yeniden kapatılmış ve 60°C sıcaklıkta 60 dakika boyunca geliştirilmiştir. Absorbans 584 nm'de ölçülmüştür (Fluostar, BMG, Labtech). Her plakada, indirgeyici şeker standardı olarak D-galaktoz ile oluşturulan bir standart eğri aynı tamponda ve 2 ila 100 uM aralığında bir hacimde hazırlanmıştır. IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Bu analiz, tek bir bölünme noktasına sahip homojen bir substrat içerdiğinden, enzimin kinetiği ve biyokimyasal parametreleri güvenilir bir biçimde karakterize edilebilir. Yukarıda tarif edilen kolorimetrik analiz kullanılarak elde edilen sonuçlar, substrat olarak sülfat etiketli hücre dışı matris (ECM) kullanılarak doğrulanmıştır. Kısacası ECM substratı kültürlenmiş korneal endotel hücreleri tarafından biriktirilmekte ve bu nedenle kompozisyonunda, biyolojik fonksiyonunda ve bariyer özelliklerinde

subendotelyal bazal membrana yakından benzemektedir. Sülfat etiketli ECM hazırlama ve bunun heparanaz analizi için kullanımı hakkında detaylı bilgi Vlodavsky, I., Current Protocols in Cell Biology, Chapter 10: Unit 10.4, 2001'de bulunabilir. Analiz çok hassastır, daha çok in vivo koşullara benzer, ancak biyolojik doğası gereği yarı niceliksel ve biyokimyasal parametreler açısından sınırlıdır.

In vivo test

In vivo antimyeloma aktivitesi esasen Yang Y ve ark.'da (Yang Y., ve ark. 2007, The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. Blood 110:2041-2048) tarif edilen prosedür izlenerek test edilmiştir. Kısaca, 5-6 haftalık CB17 scid/scid fareleri, Arlan'dan (Indianapolis, IN) ya da Charles River Laboratories'den (ABD) tedarik edilmiştir. Fareler Birmingham'daki Alabama Üniversitesi hayvan tesislerinde barındırılmış ve takip edilmiştir. Tüm deneysel prosedürler ve protokoller, Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu (Institutional Animal Care and Use Committee) tarafından onaylanmıştır. 1×10^6 heparanaz ekspres eden CAG miyelom hücreleri (yüksek ya da düşük ekspresyon) her farenin sol böğrüne subkütanöz bir biçimde enjekte edilmiştir. Tümör hücrelerinin enjeksiyonundan 10 gün sonra, farelerin sağ böğürlerine Alzet ozmotik pompaları (Durect Corporation, Cupertino, CA) implante edilmiştir. Pompalar ya test bileşiklerinin çözeltisini (yeni heparin türevleri) ya da kontrol olarak PBS içermekteydi. Çözelti 14 gün boyunca aralıksız olarak verilmiştir. 14 gün sonra hayvanlar öldürülmüş ve subkütanöz tümörlerin ıslak ağırlığı ve ortalama sera kappa seviyesi analiz edilmiş ve log-rank testi ile deney grupları arasında karşılaştırılmıştır ($p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir).

Haftalık lusiferaz biyoluminesans görüntüleme primer tümörler hakkında kantitatif veriler sağlar ve kemik ve yanı sıra yumuşak dokulardaki metastazın takibini gerçekleştirir. Dikkate değer bir biçimde, SCID-hu modeli insan tümör hücrelerinin doğrudan SCID farelerine deri altından implante edilmiş küçük insan fetal kemiği parçalarına enjekte edilmesi, böylece insan miyelomunu yakından tekrarlaması bakımından eşsizdir.

NMR analizi genel prosedürü

Spektrumlar, 25 mm'de 5 mm'lik bir TCI dondurma sondası veya 10 mm'lik bir BBO sondasına sahip bir Bruker Avance 500 spektrometresinde (Karlsruhe, Almanya) kaydedilmiştir. Pik hacimlerinin spektrumlara entegrasyonu, standart Bruker TopSpin 2.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dikarboksilatlanmış üronik asit kalıntılarının yapısı, trikarboksilat kalıntılarının varlığını doğrulayan ve kimyasal kaymalarının belirlenmesine olanak tanıyan iki boyutlu heteronükleer deneylerle belirlenmiştir. Aşağıdaki tabloda, proton ve karbonların dikarboksilatlanmış kalıntının, glukosamin ve 2-O sülfatlanmış iduronik asidin 1, 4, 5 pozisyonunda atanmış kimyasal kaymaları rapor edilmiştir.

Kalıntı pozisyonuna karşılık gelen sinyaller	¹ H PPM	¹³ C ppm
C5-Üronik asit gsox	4.97	81.65
C4-Üronik asit gsox	4.59	81.22
C1-Üronik asit gsox	5.01	103.71
C4	3.63	79.14
C1-Glukozamin NS (ANS)	5.40	99.17
(Gsox) ile bağlantılı C1-ANS	5.03	100.19
C1-İduronik asit 2S	5.17	102.11

10

Karboksil gruplarının artışının hesaplanması için genel prosedür

Dikarboksillenmiş heparin türevlerinin üronik asit kalıntılarındaki karboksil gruplarının artışı, başlangıç materyalinin (fraksiyone edilmemiş heparin veya en azından kısmen desülfatlanmış heparinler ve LMWH'ler) ve dikarboksillenmiş türevlerin molar oranının $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ ilgili değerlerinden başlanarak hesaplanmış ve iletken timetrik titrasyon ile değerlendirilmiştir (Casu B. and Gennaro U., 1975, Carbohydr Res 39, 168-176). Özellikle başlangıç materyalinin sülfatlaşma

15

derecesi, birinci oksidasyon adımından sonra, indirgenmiş bir glikosaminoglikan okside edilmiş ara ürün numunesi üzerinde belirlenmekte (bakınız örnek 4-7) ve nihai glikozaminoglikan karboksillenmiş türevinin sülfatlaşma derecesi de ikinci oksidasyon adımından sonra belirlenmektedir (bkz. örnekler 8-11, 13-14).

$$\text{SO}_3^- / \text{CO}_2^- = A \text{ (başlangıç materyallerinde oran)} \quad \text{SO}_3^- = A / \text{CO}_2^-$$

$$\text{SO}_3^- / \text{CO}_2^- = B \text{ (dikarboksilatlanmış türevlerdeki oran)} \quad \text{SO}_3^- = B / \text{CO}_2^-$$

- 5 Sülfat gruplarının sayısının iki oksidasyon adımında değişmediği göz önünde bulundurulduğunda, karboksil gruplarının artışı (CO_2^- (dikarboksilatlanmış türevler) / CO_2^- (başlangıç materyalleri)), bireysel molar oranları A ve B'nin oranına eşittir. Karboksil artışı (C.I.) = $A/B = \text{CO}_2^-$ (dikarboksilatlanmış türevler) / CO_2^- (başlangıç maddeleri).

Heparinlerin ve karboksillenmiş türevlerinin enzimatik bölünmesi ve

HPLC/MS analizleri

- 7.7 mg/ml'lik bir çözelti elde etmek amacıyla substrat (2-3 mg), 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 7.0) ve 10 mM kalsiyum asetatın 1:1'lik (h/h) bir karışımında çözülmüştür. Enzimatik bölünmeyi gerçekleştirmek üzere 100 mM sodyum asetat ve 10 mM kalsiyum asetatın (1: 1) 144 µl karışımı ve 3 ul heparinaz karışımı (heparinli yazı I, II ve III) (her bir liyazın 1 µl'si, 2mU/µl enzim çözeltisi) 13 ul heparin çözeltisine ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta karıştırılmıştır (Thermo-Shaker TS-100, Biosan). Reaksiyon, 3 µl % 3'lük HCOOH ilave edilerek durdurulmuştur. Her numune iki kez su ile seyreltilmiş ve IPRP-HPLC/ESI-TOF (microTOF-Q, Bruker) ile analiz edilmiştir. 10 mM DBA-CH₃COOH ile A fazını (pH 6.25) ve B fazını (pH 7.95) kullanan bir C18 kineteki ve gradyanı (0'-%17 B, 15'-%20 B, 55'-%40 B, 100' %50 B, 115' %90 B), 100 µL/dakikalık bir akış hızında kullanılmıştır.

ÖRNEK 1 (G7669)

- 1M NaOH (32 ml) içerisinde bir UFH numunesi (2.5 g lot. G5842) 30 dakika boyunca 60 °C'de ısıtılmıştır. Çözelti oda sıcaklığında soğutulduktan ve 2N HCl ile nötrleştirildikten sonra oda sıcaklığında 3 gün boyunca membranlarda damıtılmış suya karşı diyaliz edilmiştir (kesme: 3500 Da). Düşük basınç altında konsantre hale getirme ve dondurularak kurutma, ¹³C-NMR ile belirlendiği şekilde epoksit

grubu taşıyan toplam üronik asit kalıntılarının % 13'ü ile 2.15 g (verim=% 80(a/a)) ara madde vermiştir. Numune daha sonra su (32 ml) içinde çözülmüş ve epoksi gruplarını hidrolize etmek için 2 gün boyunca 70 °C sıcaklıkta karıştırılmaya devam edilmiştir. Konsantrasyon ve dondurarak kurutmadan sonra G7669 elde edilmiştir.

ÖRNEK 2 (G8661)

27 ml 1N NaOH içerisindeki bir UFH numunesi (2.11 g lot. G3378) 30 dakika boyunca 60°C'de karıştırılmıştır. Nötralizasyon, oda sıcaklığında soğutma ve diyaliz, konsantrasyon ve dondurarak kurutma (Örnek 1'de tarif edildiği gibi) ara ürün G8637'yi (1.5 g) vermiştir. ¹³C-NMR spektrumu epoksi gruplarının varlığını gösterdiğinden beri G8637 (1.5 g) su (32 ml) içinde çözülmüş ve epoksi gruplarını hidrolize etmek için 2 gün boyunca 70 °C sıcaklıkta karıştırılmaya devam edilmiştir. Konsantrasyon ve dondurarak kurutmadan sonra G8661 elde edilmiştir (1.5 g).

ÖRNEK 3 (G8699)

Bir UFH (2.01 g lot. G3378) numunesi, ara madde epoksi içeren türev G8638'i vermek üzere Örnek 2'de tarif edildiği gibi proses edilmiştir. Bir G8638 numunesi (1.4 g), su (32 ml) içerisinde çözülmüş ve konsantre hale getirildikten ve dondurarak kurutulduktan sonra 1.3 g G8699 vermek üzere 24 saat 70 °C'de karıştırılarak ısıtılmıştır.

FRAKSİYONE OLMAYAN HEPARİN VE 2-O-DESÜLFATLANMIŞ TÜREVLERİN PERİYODAT OKSİDASYONU

ÖRNEK 4 (G7731)

Su (52 ml) içindeki Örnek 1'in numune G7669'undan (1.8 g,% 13 2-O-desülfasyon) başlayarak, çözelti 4 °C'de soğutulmuş, karanlıkta karıştırılmış ve 52 ml 0.2 M NaIO₄ eklenmiştir. 16 saat sonra, periyodatın fazla miktarı, etilen glikol (5.2 ml) ilave edilerek söndürülmüş ve 1 saat sonra 4 °C'de reaksiyon karışımı, 4 °C'de 16 saat boyunca diyaliz ile tuzdan arıtılmıştır. İndirgenmiş basınç altında konsantre edildikten ve dondurularak kurutulduktan sonra, dialdehit taşıyan G7731 (1.5 g) elde edilmiştir, verim =% 83. Numunenin küçük bir kısmı, iletken

timetrik titrasyon ile $MW = 8,242$ Da ve $SO_3^-/COO^- = 2.46$ 'yı ölçmek üzere $NaBH_4$ ile indirgenmiştir.

ÖRNEK 5 (G8425)

Bir UFH numunesinden başlayarak (0.25 g, lot. G3378) ve Örnek 4'te tarif edilen
5 ile aynı prosedürü izleyerek, % 96 verimle dialdehit taşıyan G8425 (0.24 g) elde edilmiştir.

ÖRNEK 6 (G8678)

Örnek 2'nin bir G8661 numunesinden başlayarak (1.5 g) ve Örnek 4'te tarif edilen
ile aynı prosedürü gerçekleştirerek dialdehit taşıyan G8678 (1.5 g) elde edilmiştir.
10 Numunenin küçük bir kısmı, iletken timetrik titrasyon ile $SO_3^-/COO^- = 1.96$ 'yı ölçmek üzere $NaBH_4$ ile indirgenmiştir.

ÖRNEK 7 (G8710)

Örnek 3'ün bir G8699 numunesinden başlayarak (0.56 g) ve Örnek 4'te tarif edilen
ile aynı prosedürü izleyerek dialdehit taşıyan G8710 (0.56 g) elde edilmiştir.
15 Numunenin küçük bir kısmı, iletken timetrik titrasyon ile $SO_3^-/COO^- = 1.51$ 'i ölçmek üzere $NaBH_4$ ile indirgenmiştir.

DİALDEHİDİK ÜRONİK ASİT ARA MADDELERİNİN KARŞILIK GELEN DİKARBOKSİLATLARA OKSİDASYONU

ÖRNEK 8 (G7927)

Örnek 4'teki G7731'in bir numunesi (0.3 g) suda (29 ml) çözülmüş, çift boyunlu
yuvarlak tabanlı bir şişede 0 °C'de soğutulmuş ve azot atmosferi altında
karıştırılarak, $NaClO_2$ (0.362 g) içeren sulu bir çözelti (6 ml) ile işleme tabi
tutulmuştur. PH 4.0'e ulaşmak üzere damla damla buzlu asetik asit (0.118 ml)
ilavesinden sonra, reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır. Oda
25 sıcaklığında 3 saat daha karıştırmadan sonra N_2 'nin flukslanması ile renksiz bir
çözelti elde edilmiştir. Reaksiyon karışımı 0.5N NaOH ile nötrleştirilmiş ve Örnek
4'te tarif edildiği gibi diyaliz ile tuzdan arındırılmıştır. Konsantrasyon ve
dondurarak kurutma % 76 verimle (a/a) G7927 (0.228 g) vermiş olup G7927 şu
özelliklere sahiptir:

30 Mol. Ağırl. = 6,450 Da;

$$\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1.23;$$

Karboksil artışı (C.I.) = 2.

İn vitro h inhibisyon analizi şu sonuçları vermiştir: $\text{IC}_{50} = 10 \text{ ng/ml}$.

5 **ÖRNEK 9 (G8437)**

Sadece heparin zincirinde (% 18) doğal olarak bulunan sülfatlanmamış üronik asitlerin (% 18) örnek 8'de tarif edilen prosedürün aynısı izlenerek oksitlendiği, Örnek 5'in G8425 numunesinden (0.25 g) başlayarak G8437 (0.21 g), reaksiyon karışımının nötrleştirilmesinden önce N_2 akışını 1.5 saate düşürerek elde edilmiş olup, şunları içermektedir:

Mol. Ağırl. = 12,100 Da;

$$\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1.62;$$

Karboksil artışı (C.I.) = 1.43.

İn vitro h inhibisyon analizi şu sonuçları vermiştir: $\text{IC}_{50} = 10 \text{ ng/ml}$.

15 **ÖRNEK 10 (G8767)**

Örnek 6'nın G8678 numunelerinden başlayarak (1 g) ve Örnek 8'de tarif edilen prosedürü izleyerek aşağıdakileri içeren G8767 (1.05 g) elde edilmiştir:

Mol. Ağırl. = 8,800 Da;

$$\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1.27;$$

20 Karboksil artışı (C.I.) = 1.55.

İn vivo antimyeloma aktivitesi analizi (14 gün boyunca 60 mg/kg gün) şunları vermiştir: % 52 serum inhibisyonu ve % 20 serum K inhibisyonu.

ÖRNEK 11 (G8733)

25 Örnek 7'nin G8710 numunesinden başlayarak (0.56 g) ve Örnek 8'de tarif edilen prosedürü izleyerek, % 80 (a/a) verimle aşağıdakileri içeren G8733 (0.453 g) elde edilmiştir:

Mol. Ağırl. = 5,540 Da;

$$\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 0.97;$$

Karboksil artışı (C.I.) = 1.56.

İn vivo antimyeloma aktivitesi analizi (14 gün boyunca 60 mg/kg gün) şunları vermiştir: % 53 tümör inhibisyonu.

ÖRNEK 12 (G9685)

- 5 Bir UFH numunesinden (lot G3378) başlayarak ve Örnek 4'te tarif edilen prosedürü izleyerek dialdehit türevi elde edilmiştir. Örnek 8'in prosedürü izlenerek dialdehit türevi ayrıca sodyum klorit varlığında daha da oksitlenerek karboksillenmiş türev G9685 elde edilmiştir, Mol. Ağır.=11,700 Da. İn vitro h inhibisyon analizi şu sonuçları vermiştir: $IC_{50}=10$ ng/ml; İn vivo antimyeloma
- 10 aktivitesi analizi (14 gün boyunca 60 mg/kg gün) şunları vermiştir: % 68 tümör inhibisyonu.

ÖRNEK 13 (G7897)

- Örnek 4'ün bir G7731 numunesi (0.3 g) suda (3 ml) çözünmüş ve % 4'lük HCl ile pH 8.2-8.5'e 1.36 ml $NaClO_2$ ile muamele edilmiştir. Daha sonra 1 mg TEMPO
- 15 ilave edilmiş ve pH, 24 saat boyunca NaOH 1M ile 7-7.5 arasında korunmuştur. Reaksiyon karışımı diyaliz ile tuzdan arındırılmış, konsantre hale getirilmiş ve % 63 (a/a) verimle G7897 (0.190 g) vermek üzere dondurularak kurutulmuş olup şunlara sahiptir:

$SO_3^-/COO^- = 1.92$;

- 20 Karboksil artışı (C.I.) = 1.28.

ÖRNEK 14 (G9585)

- Bir 2-O-desülfatlanmış heparin (G9416, $SO_3^-/COO^- = 1.39$) numunesinden başlayarak ve Örnek 4'te tarif edilen prosedürü izleyerek dialdehit türevi G9577 elde edilmiştir. G9577'nin suda (21 ml) çözölmüş bir numunesi (0.242 g), çift
- 25 boyunlu yuvarlak tabanlı bir şişede 0 °C'de soğutulmuş ve azot atmosferi altında karıştırılarak, $NaClO_2$ (0.128 g) içeren sulu bir çözelti (1 ml) ile işleme tabi tutulmuştur. PH 4.0'e ulaşmak üzere damla damla buzlu asetik asit (0.084 ml) ilavesinden sonra, reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 3 saat daha karıştırmadan sonra N2'nin flukslanması ile renksiz bir
- 30 çözelti elde edilmiştir. Reaksiyon karışımı 0.5N NaOH ile nötrleştirilmiş ve Örnek 4'te tarif edildiği gibi diyaliz ile tuzdan arındırılmıştır. Konsantrasyon ve

dondurarak kurutma % 61 verimle (a/a) G9585 (0.148 g) vermiş olup G9585 şu özelliklere sahiptir:

Mol. Ağırl. = 4,700 Da;

$\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 0.82$;

5 Karboksil artışı (C.I.) = 1.69.

İn vitro h inhibisyon analizi şu sonuçları vermiştir: $\text{IC}_{50} = 44 \text{ ng/ml}$.

Burada açıklananlar ayrıca aşağıdaki maddelerde (bu tarifnamenin bir parçasını teşkil eden ancak Avrupa Patent Ofisi Temyiz Kurulunun J15/88 kararına göre istem olarak kabul edilmeyen maddeler) de tanımlanmış olan hususlardır:

10 1. Heparanazı inhibe eden bir glikozaminoglikan türevinin hazırlanması için bir proses olup şunları içermektedir:

a) bitişik diolleri ve isteğe bağlı olarak bitişik OH/NH_2 'yi dialdehitlere dönüştürmek için etkili koşullar altında bir glikozaminoglikanın 2-O-, ve isteğe bağlı olarak 2-N-, 3-O- sülfatlanmamış kalıntılarının % 10 ila % 100'ünün oksidasyonu;

15 b) sözü edilen dialdehitleri karboksilat gruplarına dönüştürmede etkili koşullar altında oksitlenmiş glikozaminoglikanın oksidasyonu.

2. Madde 1'e göre proses olup burada glikozaminoglikan tercihen heparin, düşük molekül ağırlıklı heparinler, heparan sülfat, isteğe bağlı olarak 2-O- ve/veya 2-N-desülfatlanmış arasından seçilen, daha tercihen fraksiyone olmayan heparin veya
20 LMWH, isteğe bağlı olarak 2-O ve/veya 2-N-desülfatlanmış arasından seçilen bir doğal ya da sentetik glikozaminoglikandır.

3. Madde 1 ve 2'ye göre proses olup burada glikozaminoglikan, burada tanımlandığı gibi iletken timetrik titrasyon ile belirlendiği üzere 0.8 ila 2.8 arasında bir sülfatlaşma derecesine ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) sahiptir.

25 4. Madde 3'e göre proses olup burada glikozaminoglikan, burada tanımlandığı gibi iletken timetrik titrasyon ile belirlendiği üzere 0.9 ila 2.5 arasında bir sülfatlaşma derecesine ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) sahiptir.

5. Önceki maddelerden herhangi birine göre proses olup burada glikozaminoglikan türevi, burada tanımlandığı gibi 1.2 ila 2.2 arasında bir karboksil
30 artışına sahiptir.

6. Madde 1-5'in prosesi olup özelliği a) adımıda oksidasyonun periyodat ile gerçekleştirilmesidir.
7. 1-6. maddelere göre proses olup özelliği a) adımıda 2-O-, ve isteğe bağlı olarak 2N-, 3-O-, sülfatlanmamış glikozaminoglikan kalıntılarının % 25 ila % 100'ünün oksitlenmiş olmasıdır.
8. Önceki maddelerin herhangi birinin prosesi ile elde edilebilen bileşikler.
9. 8. maddenin 3000 ila 20000 Da arasında moleküler ağırlığa sahip olan bileşikler.
10. 8. maddenin 3500 ila 12000 Da arasında moleküler ağırlığa sahip olan bileşikler.
11. 8-10. maddelerin bileşiklerinin enzimatik ya da kimyasal kısmi depolimerizasyonu ile elde edilebilen oligosakarit bileşikler.
12. İlaç olarak kullanım için 8-11. maddelerin bileşikler.
13. Antimetastatik veya antitümöral ilaçlar olarak kullanım için 8-11. maddelerin bileşikler.
14. Antimiyeloma ilaçları olarak kullanım için 8-11. maddelerin bileşikler.

TANIMLAMADA BELİRTİLEN REFERANSLAR

Başvuran tarafından belirtilen bu referanslar listesi yalnızca okuyucu için bir kolaylık sağlaması içindir. Avrupa patent dokümanının bir parçasını teşkil etmez. Referansların derlenmesinde büyük bir özen gösterilmiş olmakla birlikte hatalar veya eksiklikler olabilir ve EPO bu anlamda hiçbir sorumluluk üstlenmemektedir.

Tarifnamede Atıfta Bulunulan Patent Belgeleri

WO 0155221 A
US 20080051567 A

Tarifnamede Atıfta Bulunulan Patent Dışı Literatürler

CASU B. ; GENNARO U. Carbohydr Res, 1975, vol. 39, 168-176
GRAHAM-ROWE D. Multiple myeloma outlook. Nature, 2011, vol. 480, s34-s35

FUX, L. et al. Heparanase: busy at the cell surface. Trends Biochem Sci, 2009, vol. 34 (10), 511-519

SANDERSON R.D.; YANG Y. Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. Clin Exp Metastasis, 2008, vol. 25, 149-59

- 5 **ILAN N. et al.** Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol, 2006, vol. 38, 2018-2039

CASU B. et al. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. Pathophysiol Haemost Thromb., 2008, vol. 36, 195-203

- 10 **VLODAVSKY I. et al.** Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. Curr Pharm Des., 2007, vol. 13, 2057-2073

NAGGI A. et al. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded N-Acetylation, and Glycol Splitting. J. Biol.

- 15 Chem., 2005, vol. 280, 12103-12113 Structure and active domains of heparin.

CASU B. Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate. Elsevier, 2005, 1-28

CASU B. ; LINDAHL U. Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. Adv Carbohydr Chem Biochem, 2001, vol. 57, 159-206

- 20 **ZACHARSKI L.R. ; LEE, A.Y.** Heparin as an anti-cancer therapeutic. Expert Opin Investig Drugs, 2008, vol. 17, 1029-1037

Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative. **NAGGI A.** Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Elsevier, 2005, 461-481

- 25 **YANG Y. et al.** The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. Blood, 2007, vol. 110, 2041-2048

JASEJA M. et al. Novel regio- and stereo-selective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence. Canad J Chem, 1989, vol. 67, 1449-1455

- 30 **R.N. REJ ; A.S. PERLIN.** Base-catalyzed conversion of the α -L-iduronic acid 2-sulfate unit of heparin into a unit of α -L-galacturonic acid and related reactions. Carbohydr. Res., 1990, vol. 200 (25), 437-447

CASU B. et al. Undersulfated and Glycol-Split Heparins Endowed with Antiangiogenic Activity. J. Med. Chem., 2004, vol. 47, 838-848

BISIO A. et al. High-performance liquid chromatographic /mass spectrometric studies on the susceptibility of heparin species to cleavage by heparanase. Sem

5 Thromb hemost, 2007, vol. 33, 488-495

HAMMOND et al. Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening. Anal Biochem., 2010, vol. 396, 112-6

VLODAVSKY, I. Current Protocols in Cell Biology

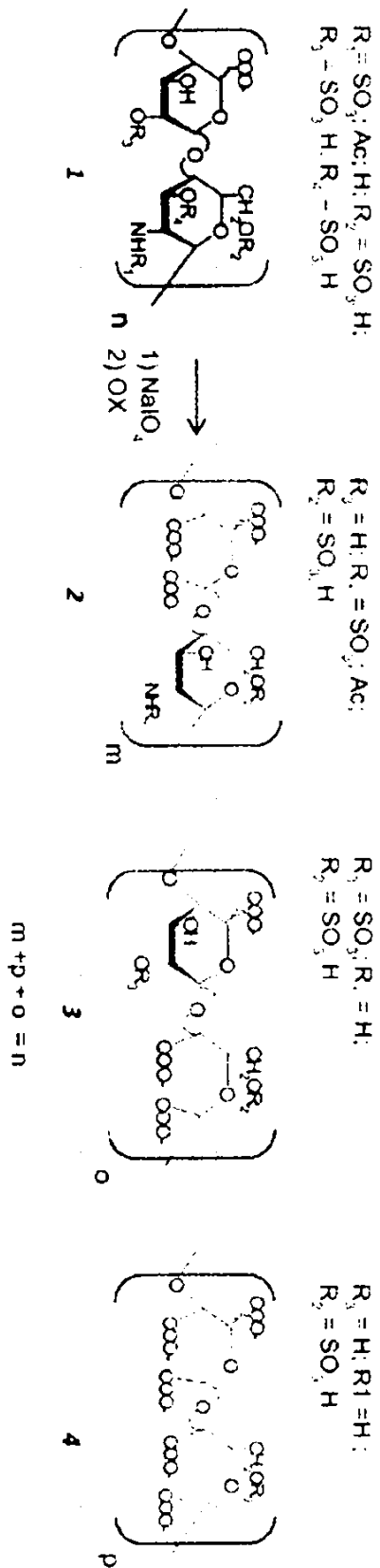
10

15

20

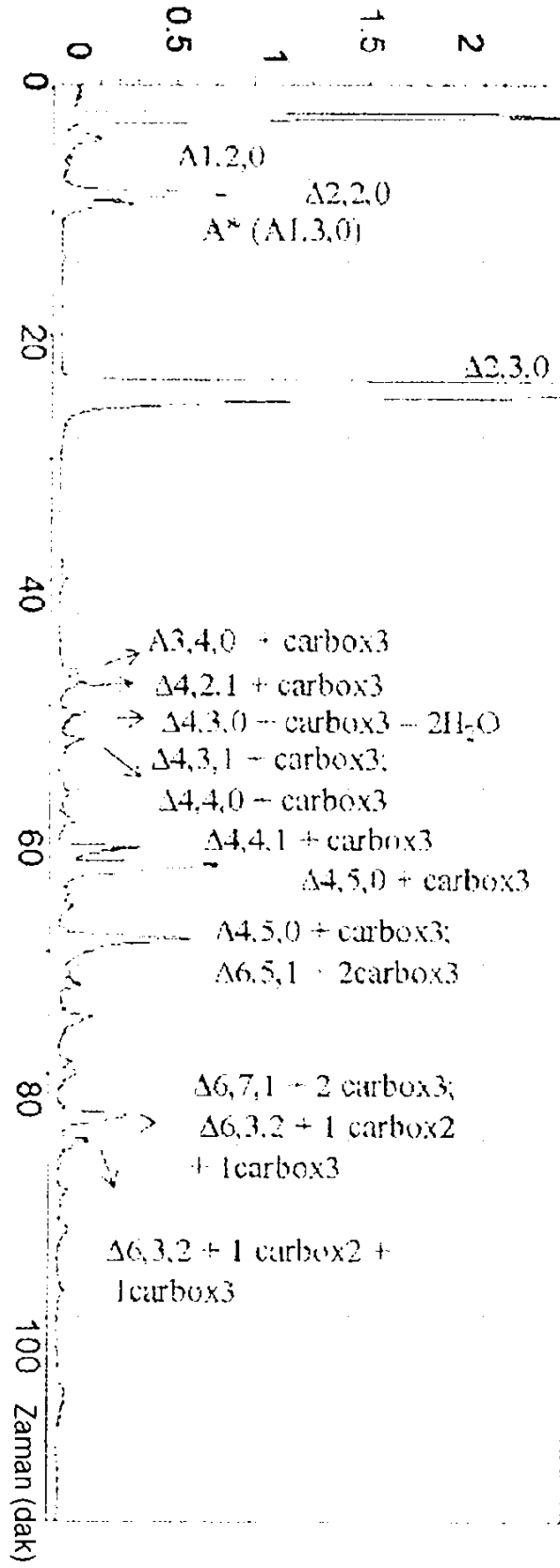
25

30



Şekil 1

Şekil 2



Şekil 3

