



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102000900816398
Data Deposito	25/01/2000
Data Pubblicazione	25/07/2001

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

DERIVATI GLICOSAMMINOGLICANI PARZIALMENTE DESOLFATATI NON
ANTICOAGULANTI AD ATTIVITA' ANTIANGIOGENICA.

La presente invenzione riguarda derivati di glicosamminoglicani parzialmente desolfatati, in particolare eparine, procedimenti per la loro preparazione, il loro uso quali principi attivi per la preparazione di medicinali ad attività antiangiogenica, in particolare per il trattamento di tumori, ad esempio le forme metastatiche e composizioni farmaceutiche che li comprendono.

Stato dell'arte

La prima molecola ad attività antiangiogenica fu scoperta nelle cartilagini da Henry Brem e Judah Folkman nel 1975. Da quell'anno sono state scoperte oltre 300 nuove molecole capaci di inibire l'angiogenesi.

Dagli inizi degli anni '80, con la scoperta dell'interferone (α/β) come inibitore dell'angiogenesi tumorale, è iniziata la sperimentazione clinica seguendo questo approccio terapeutico.

I mass-media hanno sollevato un forte clamore quando, il 3 marzo 1998, sul New York Times, era pubblicata la notizia che due molecole, l'angiostatina e l'endostatina, scoperte nei laboratori di J.Folkman, presso l'Harvard Medical School and Children's Hospital di Boston, stavano dando risultati molto incoraggianti nella lotta contro i tumori. L'elevata efficacia di queste due molecole nell'inibire l'angiogenesi, ha dato un notevole impulso alla ricerca di nuovi composti. Attualmente, sono una trentina le molecole ad attività

antitumorale che agiscono mediante un meccanismo antiangiogenico, entrate nelle prove cliniche (Fase I-III) e quasi altrettante sono le industrie o le istituzioni coinvolte.

Solo negli Stati Uniti si calcola che vi sono circa 9 milioni di
5 pazienti che potrebbero beneficiare di una terapia antiangiogenica. Attualmente almeno 4 mila pazienti sono arruolati in studi clinici sperimentali seguendo questa terapia senza che si siano registrati particolari effetti indesiderati.

Il concetto generale di angiogenesi va distinto tra vasculogenesi,
10 ossia la formazione di vasi sanguigni durante lo sviluppo embrionale e angiogenesi vera e propria, ossia la formazione di nuovi vasi sanguigni (capillari) durante la vita post-natale a partire da vasi preesistenti. L'importanza dell'angiogenesi per la crescita dei tumori solidi è ampiamente documentata. Nelle ultime tre decadi è stato riportato che
15 la crescita tumorale, così come la formazione di metastasi, è strettamente dipendente dallo sviluppo di nuovi vasi capaci di vascolarizzare la massa tumorale.

L'inibizione dell'angiogenesi è alla base della formazione di masse necrotiche all'interno del tumore o dell'induzione apoptotica in cellule
20 tumorali.

Esistono delle differenze nette tra una neovascolarizzazione in un tessuto normale e quella in un tessuto tumorale. Nel primo, infatti,

l'endotelio vascolare rappresenta un tessuto quiescente con un bassissimo indice mitotico delle cellule che lo compongono (tempo di rinnovamento misurato in centinaia di giorni), la rete vascolare è regolare, relativamente uniforme, idonea ad ossigenare sufficientemente tutti i tessuti, senza alcuna connessione artero-venosa. Nel tessuto tumorale, invece, la stimolazione alla proliferazione delle cellule endoteliali determina in queste un alto indice mitotico (tempo medio di rinnovamento 5 giorni), la neovascolarizzazione è fortemente irregolare con delle zone di occlusione, a volte con delle terminazioni chiuse, in alcuni punti con contatti artero-venosi, ed infine la membrana basale presenta delle interruzioni: questo porta in alcuni punti ad una ipossia tissutale. Queste differenze sono una opportunità per individuare farmaci che bloccano selettivamente la neovascolarizzazione tumorale.

In un tumore, la neovascolarizzazione non sempre coincide con una fase precisa dello sviluppo tumorale, infatti esistono casi in cui l'angiogenesi inizia ancora prima dello sviluppo del tumore (ad esempio: carcinoma della cervice uterina) altri in cui le due fasi coincidono (ad esempio carcinoma della vescica e della mammella), altri ancora in cui l'angiogenesi inizia dopo la neoplasia (ad esempio: melanoma e carcinoma dell'ovaio, si veda ad esempio "Manuale di oncologia medica", IV ed. (1991) G. Bonadonna e coll.

La terapia antiangiogenica presenta numerosi vantaggi rispetto alla chemioterapia standard tradizionale (Cancer Research 1998, 58, 1408-16):

- a) specificità: ha come bersaglio un processo, la
5 neovascolarizzazione tumorale;
- b) biodisponibilità: ha come bersaglio le cellule endoteliali, facilmente raggiungibili senza i problemi della chemioterapia tradizionale che agisce direttamente sulle cellule tumorali;
- c) chemioresistenza: questo è forse il più importante vantaggio di
10 questa terapia; infatti, essendo le cellule endoteliali, a differenza di quelle tumorali, geneticamente stabili, difficilmente si registrano fenomeni di resistenza al farmaco;
- d) metastatizzazione: il blocco della neovascolarizzazione limita la propagazione delle cellule tumorali in altre parti del corpo mediante il
15 torrente circolatorio;
- e) apoptosi: il blocco della rete vascolare nel tumore fa diminuire l'apporto di ossigeno e di sostanze nutrienti alle cellule tumorali, in queste condizioni si favorisce l'apoptosi;
- f) ridotta tossicità sistemica: effetti tossici, quali
20 mielosoppressione, effetti gastrointestinali e temporanea perdita dei capelli, quasi sempre presenti con la chemioterapia tradizionale, non si osservano con una terapia antiangiogenica.

Si conoscono alcuni elementi molecolari coinvolti nell'angiogenesi tumorale (Oncology 1997, 54, 177-84). Sono noti fattori endogeni pro- e anti-angiogenici coinvolti nei meccanismi regolatori biologici nella formazione di nuovi vasi.

5 Tra gli stimolatori angiogenici, si ricordano: i fattori di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factors - FGF), il fattore di crescita endoteliale vascolare (Vascular endothelial growth factor - VEGF); l'angiogenina, il fattore- α di crescita di trasformazione (Trasforming Growth Factor- α), il fattore di necrosi tumorale (Tumor Necrosis Factor- α -TNF- α), il fattore di crescita delle cellule endoteliali derivante dalle piastrine (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor), il fattore- β di crescita di trasformazione (Trasforming Growth Factor- β) inibitore in vitro, ma stimolatore in vivo, il fattore di crescita placentare (Placental Growth Factor), l'interleuchina-8, il fattore di crescita degli epatociti
10 (Hepatocyte Growth Factor), fattore di crescita derivante dalle piastrine (Platelet-Derived Growth Factor), i fattori di stimolazione delle colonie di granulociti (Granulocyte Colony-Stimulating Factors), la proliferina, le prostaglandine (PGE1, PGE2), i GM1-GT1b, la sostanza P, le bradichinine, l'ossido nitrico.

20 Per contro, tra gli inibitori dell'angiogenesi, si ricordano: il recettore solubile del bFGF, gli interferoni (α , β , γ), l'angiostatina, la trombospodina-1, la prolattina (frammento ammino terminale da

16kDa), il fattore delle piastrine 4 (PF4), gli inibitori delle metalloproteinasi tissutali (TIMP), il peptide correlato alla proliferina placentare, il fattore di inibizione dell'angiogenesi derivato dal glioma, steroidi angiostatici, l'inibitore derivante dalla cartilagine (CDI), le eparinasi, l'interleuchina-12, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno, i retinoidi, l'endostatina, l'angiopoietina-2, la genisteina, l'ossido nitrico e il GM3.

Le integrine sono una vasta famiglia di proteine transmembrana che mediano le interazioni cellula-cellula e cellule-matrice extracellulare. Tutte le integrine sono in grado di riconoscere una comune sequenza peptidica Arg-Gly-Asp ("sito di riconoscimento cellulare universale"), anche se ogni integrina riconosce preferenzialmente una diversa conformazione di questo tripeptide. Anche l'inibizione di specifici sottotipi di integrine può essere di grande interesse dal punto di vista farmacologico per lo sviluppo di inibitori dell'angiogenesi.

Anche il controllo delle protein chinasi-C (PK-C) può permettere una regolazione dell'angiogenesi. Esistono infatti classici inibitori delle PK-C capaci di bloccare in parte o completamente l'angiogenesi.

Nonostante gli enormi investimenti e il coinvolgimento di numerosissimi centri di ricerca istituzionali e privati, in tutto il mondo il problema cancro è ancora lontano dall'essere definitivamente risolto.

Anche se si è migliorata la prognosi di chi è colpito da questo male, passando, negli ultimi 30 anni, mediamente dal 30 al 50% di sopravvivenza e si conoscono bene i meccanismi genetici, cellulari e biochimici coinvolti nello sviluppo di un tumore, la possibilità di poter
5 sconfiggere o almeno limitare questa patologia è ancora oggi un problema estremamente sentito e sono tuttora irrisolti molti aspetti, quali la possibilità di recidiva, la remissione completa e la metastatizzazione del tumore primario.

Dalla fine degli anni '70, quando le osservazioni di Folkmann
10 iniziarono a trovare conferme nella comunità scientifica internazionale, sono state isolate, da fonti naturali (piante, funghi, liquidi biologici), e sintetizzate nei laboratori, centinaia di molecole ad attività antiangiogenica.

Alcuni farmaci sono già in Fase III, come il Marimastat (British
15 Biotech.), l'AG3340 (Prinomast-Agouron), Neovastat (Aeterna), tutti agiscono principalmente a livello polmonare (SNCL) con meccanismo di interferenza sulle metalloproteinasi. Sempre in Fase III vi è il RhuMad VEGF (è un anticorpo anti-VEGF della Genetech) e l'Interferon α (commerciale), attivi sui tumori solidi grazie all'interferenza con i fattori
20 di crescita pro-angiogenici, o il TNP-470 (TAP Pharm.) che agisce direttamente sulle cellule endoteliali. Infine, farmaci come CAI (NCI) e IM862 (Cytran), sono attivi come antiangiogenici ma con un

meccanismo non specifico o non ben conosciuto.

Questi farmaci sopra menzionati in pochi anni potranno far parte dell'armamentario terapeutico degli oncologi, ma vi sono altre molecole che sono state recentemente inserite in sperimentazioni cliniche di Fase I/II come la Combretastatina (OxiGene), il Metossiestradiolo e l'Endostatina (EntreMed) che dalla preclinica risultano molto promettenti. Aziende come la Bristol Myers-Squibb (con BMS-275291), la Novartis (con CGS27023A) o la Parke-Davis (con la Suramina) sono coinvolte in questa strategia terapeutica.

10 Eparina

L'eparina è una miscela eterogenea di polisaccaridi naturali di varia lunghezza e vario grado di solfatazione che possiede attività anticoagulante ed è secreta dai mastociti connettivali presenti nel fegato (da cui è stata isolata la prima volta), nei muscoli, nei polmoni, nel timo, nella milza.

Nell'eparina è stata individuata, oltre alla sequenza regolare, una sequenza corrispondente al sito attivo per l'attività antitrombinica.

L'attività antitumorale e antimetastatica dell'eparina e dei suoi derivati è dovuta alla capacità di inibire l'eparinasi, di bloccare i fattori di crescita e di regolare l'angiogenesi.

20 Eparansolfati (HS)

Gli eparansolfati (HS) sono ligandi proteici ubiquitari. Le proteine

si legano alle catene di HS per una varietà di funzioni, dalla semplice immobilizzazione o protezione contro l'azione di degradazione proteolitica per arrivare a specifiche modulazioni di attività biologiche, come l'angiogenesi.

5 Lo scheletro carboidratico, sia nell'eparina sia negli eparansolfati (HS), consiste in un'alternanza di D-Glucosammina (GlcN) e di acidi esuronici (Glc.A o IdO.A).

Nell'eparina i residui di GlcN sono prevalentemente N-solfatati, mentre nell'HS sono sia N-solfatati sia N-acetilati, con una piccola
10 quota di N- non sostituito.

L'HS è anche mediamente meno O-solfatato rispetto all'eparina.

L'utilizzo dell'eparina nel trattamento di alterazioni dell'angiogenesi, quali tumori, in particolare metastasi, è fortemente limitato dall'attività anticoagulante dell'eparina stessa.

15 Modifiche chimiche sono state effettuate sull'eparina, al fine di ridurre la capacità anticoagulante, preservandone le proprietà antitumorali.

L'apertura di una unità di acido glucuronico nel sito antitrombinico, fa diminuire l'affinità dell'eparina per l'antitrombina: in
20 questo modo è possibile utilizzare eparine con ridotti effetti anticoagulanti ma ancora con proprietà antiangiogeniche.

Eparanasi

Le "eparanasi" sono enzimi appartenenti ad una famiglia di endoglicosidasi che idrolizzano i legami glicosidici interni delle catene degli eparansolfati (HS) e dell'eparina.

5 Queste endoglicosidasi sono coinvolte nella proliferazione delle cellule tumorali, nelle metastasi e nella neovascolarizzazione dei tumori. Questo suggerisce anche un loro coinvolgimento nell'angiogenesi dei tumori mediante il rilascio, dalla matrice extracellulare, di fattori di crescita legati all'eparina, come aFGF (detto
10 anche FGF-1), bFGF (detto anche FGF-2) e VEGF.

Questi enzimi sono dei bersagli biologici per l'attività antiangiogenica. Nella letteratura scientifica vi è un gran numero di studi di correlazione struttura/attività (si veda ad esempio Lapierre F. a al., *Glycobiology*, vol.6, (3), 355-366, 1996). Sebbene rimangano da
15 chiarire ancora molti aspetti, sono riportati studi di attività di inibizione delle eparanasi, ad opera dell'eparina e dei suoi derivati, usando test specifici che hanno fatto emergere considerazioni di tipo strutturale che possono guidare verso nuovi derivati più selettivi.

Nel summenzionato lavoro di Lapierre e al. si descrivono derivati
20 dell'eparina ottenuti mediante 2-O desolfatazione oppure mediante "glycol split" (ossidazione con periodato e successiva riduzione con sodio boroidruro. Tali derivati, qui definiti rispettivamente eparina "2-

O-desolfatata” e “RO-eparina” hanno mantenuto in parte l’attività antiangiogenica dell’eparina valutata mediante test CAM in presenza di corticosteroidi come riportato nella Tabella III (ibid. pagina 360).

Eparine e FGF

5 Gli FGF regolano molteplici processi fisiologici come la crescita e la differenziazione cellulare, ma anche funzioni coinvolte in processi patologici come l’angiogenesi dei tumori.

 Gli FGF sono fattori di crescita (una famiglia di oltre 10 polipeptidi, di cui gli FGF acido (FGF-1) e basico (FGF-2) sono i più
10 studiati), che richiedono un cofattore polisaccaridico, eparina o HS, per legare il recettore FGF (FGFR) e attivarlo.

 Sebbene il meccanismo esatto con il quale eparina e HS attivano gli FGF sia sconosciuto, si sa tuttavia che eparina/FGF/FGFR formano un complesso “trimolecolare” o “ternario”.

15 Un meccanismo proposto è che l’eparina e HS inducano la dimerizzazione dell’FGF detto “a sandwich”, questo così dimerizzato forma un complesso stabile con FGFR.

Attività antimetastatica dei derivati dell’eparina

 La capacità di un tumore primario di generare cellule
20 metastatiche, rappresenta forse il problema principale nella terapia antitumorale.

 Derivati dell’eparina con un’elevata capacità di bloccare

l'eparinasi, sembra siano altrettanto capaci di inibire l'angiogenesi sia nel tumore primario sia nelle metastasi.

Inoltre l'inibizione dell'eparinasi riduce la capacità di migrazione di cellule tumorali dal tumore primario ad altri organi.

5 Nella tabella successiva si riporta un esempio di correlazione struttura/attività antimetastatica dell'eparina:

	% inibizione
Eparina	97
N-succinil-eparina	60
N-succinil-RO-eparina	58
Eparina a basso Mw	86
N-succinil-eparina a basso Mw	61
Eparina a bassissimo Mw	83

Mw significa peso molecolare (Molecular Weight)

10 I dati di questa tabella fanno pensare che frammenti molto corti di eparina abbiano ancora una buona attività antimetastatica mentre questa attività viene ridotta quando l'ammino gruppo della glucosammina è legato all'acido succinico.

I requisiti strutturali delle molecole simili all'eparina che favoriscono l'azione di inibizione dell'angiogenesi possono essere riuniti

in due punti, in base al bersaglio che si intende bloccare:

a) blocco dell'eparanasi, un enzima che idrolizza i legami glicosidici degli eparansolfati, liberando i fattori di crescita.

A tal fine i composti simili all'eparina preferibilmente
5 comprendono sequenze lunghe almeno otto unità monosaccaridiche, contenenti acido glucuronico-N-acetilglucosammina (o glucosammina N-solfato (si veda ad esempio D. Sandback-Pikas e al. J. Biol. Chem., 273, 18780-18777 (1998) e riferimenti citati).

b) blocco dei fattori di crescita angiogenici (tipo fibroblasti: FGF-1
10 e FGF-2; tipo endotelio vascolare: VEGF; tipo permeabilità vascolare: VPF).

A tal fine i composti simili all'eparina preferibilmente hanno sequenze lunghe almeno cinque unità monosaccaridiche, contenenti acido iduronico 2-solfato e glucosammina N,6-solfato (si veda ad
15 esempio M. Maccarana e al. J. Biol. Chem., 268, 23989-23905 (1993)).

In letteratura sono descritti piccoli peptidi (5-13 amminoacidi) ad attività antiangiogenica (brevetto US 5.399.667 dell'Università di Washington) che agiscono legando un recettore trombospondinico, o peptidi più lunghi (circa 50 amminoacidi).

20 Sono noti fattori piastrinici modificati - (EP 0 589 719, Lilly), capaci di inibire, con $IC_{50}=7$ nM, la proliferazione endoteliale.

Anche frammenti oligosaccaridici ad attività antiangiogenica sono

ampiamente descritti: risulta, infatti, che variando la sequenza
carboidratica si possa aumentare la selettività di interazione.

Inoltre l'eparina può essere usata come veicolo di sostanze di per
sé antiangiogeniche, come alcuni steroidi, sfruttando l'affinità
5 dell'eparina per le cellule endoteliali vascolari, si veda ad esempio WO
93/18793 dell'Università del Texas e Imperial Cancer Research
Technology, dove vengono rivendicate eparine con linker, tipo idrazina
dell'acido adipico, acido labili, legati al cortisolo. L'effetto
antiangiogenico dei coniugati è superiore a quello delle molecole non
10 coniugate, anche se somministrate contemporaneamente.

In *Biochim. Biophys. Acta* (1996), 1310, 86-96, sono descritti
derivati eparinici legati a steroidi (ad esempio cortisolo) aventi un
gruppo idrazone in C-20 che mostrano un'attività antiangiogenica
superiore alle due molecole non coniugate.

15 In EP 0 246 654 della Daiichi Sc. sono descritti polisaccaridi
solfatati ad attività antiangiogenica con studio in Fase II.

In EP 0 394 971 della Pharmacia & Upjohn - Harvard Coll. si
descrivono esasaccaridi - frammenti dell'eparina - a bassa solfatazione,
capaci di inibire la crescita di cellule endoteliali e dell'angiogenesi
20 stimolata da (FGF-1).

In EP 0 618 234 della Alfa Wasserman si descrive un metodo per
preparare glicosamminoglicani semisintetici con struttura eparinica o

eparanica recanti un gruppo nucleofilo.

In WO 95/05182 della Glycomed sono descritti oligosaccaridi variamente solfati con attività anticoagulante, antiangiogenica e antiinfiammatoria.

5 In US 5.808.021 della Glycomed si descrive un metodo per preparare eparina sostanzialmente non depolimerizzata 2-O, 3-O desolfatata avente una percentuale di desolfatazione sulle posizioni 2-
dell'acido iduronico (I, 2-O) e in posizione 3 dell'unità glucosamminica
(A, 3-O) comprese fra circa 99 e circa 75% della percentuale originaria.
10 Tale metodo prevede la desolfatazione condotta in presenza di un catione di metallo bivalente, esemplificato con calcio, rame, seguita dalla liofilizzazione del prodotto ottenuto. Le eparine desolfatate hanno attività antiangiogenica.

La presente invenzione si pone l'obiettivo di trovare strutture
15 glicosaminoglicaniche ottimali per generare un'attività antiangiogenica basata su meccanismi di inibizione dell'eparanasi e/o di inibizione dei fattori di crescita FGF. È anche un obiettivo della presente invenzione fornire un medicamento ad attività antiangiogenica sostanzialmente privo degli effetti collaterali tipici dei derivati delle eparine, ad esempio
20 l'attività anticoagulante.

Riassunto dell'invenzione

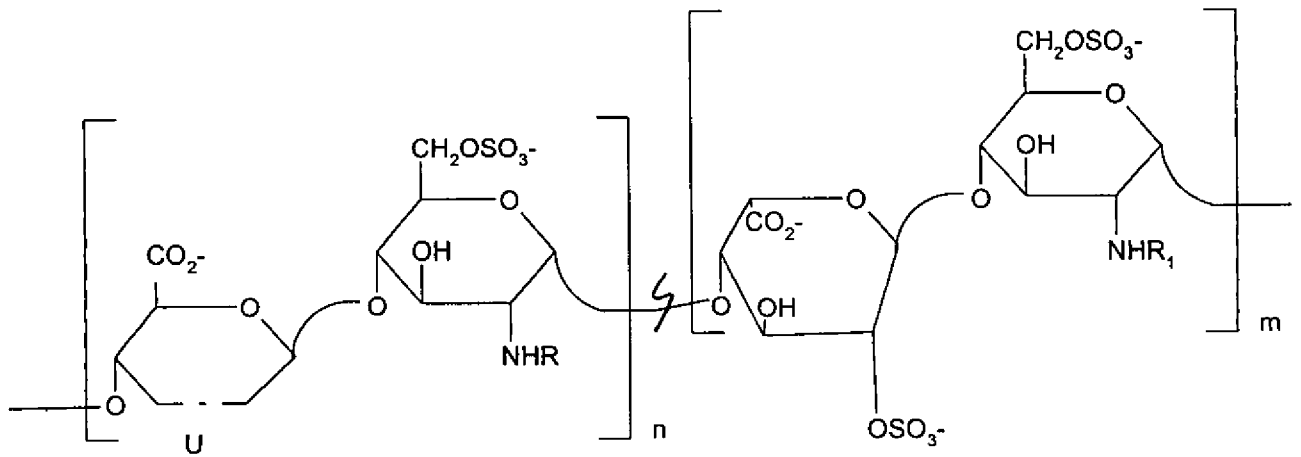
È stato ora trovato che assoggettando un glicosamminoglicano,

quale un glicosamminoglicano eparino-simile, eparina o eparina modificata, contenente residui di glucosammina a diverso grado di N-desolfatazione ed eventuale successiva N-acetilazione totale o parziale, a un trattamento di 2-O-desolfatazione controllata delle unità iduroniche fino a un grado di desolfatazione non superiore al 60% delle unità uroniche totali, si mantengono le proprietà di legame (binding) dei fattori di crescita angiogenici. Sorprendentemente, l'eparina 2-O-desolfatata non oltre al 60% sulle sue unità uroniche totali è spiccatamente antiangiogenica.

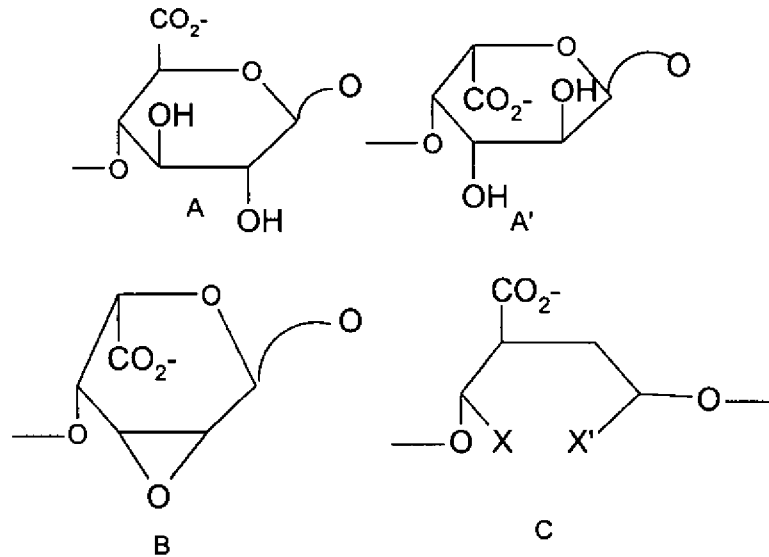
La desolfatazione condotta nelle condizioni descritte nella presente invenzione procura la formazione anche di unità iduroniche con un anello ossiranico in posizione 2,3. L'apertura dell'anello ossiranico nelle condizioni descritte nella presente invenzione dà origine ad unità L-iduroniche o L-galatturoniche.

È un oggetto della presente invenzione un derivato di glicosamminoglicano, in particolare eparina desolfatata, selettivamente parzialmente desolfatato con grado di desolfatazione non superiore al 60% delle unità uroniche totali; queste lacune di solfatazione riducono la lunghezza delle sequenze regolari costituite dalla successione di unità di disaccaride trisolfato.

In una sua realizzazione particolare, la presente invenzione si riferisce a un composto di formula (I)



dove l'anello U può avere i seguenti significati:



X e X', che possono essere uguali o diversi fra loro, sono un gruppo aldeide o il gruppo $-\text{CH}_2\text{-D}$, dove D è idrossile oppure un amminoacido, un peptide o un residuo di un carboidrato o un oligosaccaride;

R e R₁, che possono essere uguali o diversi fra loro, sono un residuo SO₃ o acetile;

n e m, uguali o diversi fra loro, possono variare da 1 a 40, la somma di $n+m$ è compresa tra 6 e 40; il rapporto m/n è compreso fra $10/2$ e $1/1$. Preferibilmente m è maggiore o uguale a n. Preferibilmente n è compreso nell'intervallo tra il 40 e il 60% della somma $m+n$. Il simbolo ζ indica che le unità contrassegnate da m e n sono statisticamente distribuite lungo la catena del polisaccaride e non sono necessariamente in sequenza.

I composti oggetto della presente invenzione hanno interessanti proprietà antiangiogeniche, pertanto sono utili come principi attivi per la preparazione di medicinali per il trattamento di patologie basate su una alterata angiogenesi, in particolare per il trattamento di tumori, ancora più in particolare per il trattamento delle metastasi.

Vantaggiosamente, i composti secondo la presente invenzione presentano ridotte, se non nulle, proprietà anticoagulanti, evitando, o riducendo, gli effetti collaterali propri delle eparine. Un ulteriore vantaggio deriva dal fatto che i composti secondo la presente invenzione sono caratterizzabili con tecniche analitiche strumentali, quali la spettroscopia NMR, permettendo un controllo di processo assolutamente desiderabile dal punto di vista industriale.

Anche nel caso di eparine modificate, per farne degli inibitori dell'angiogenesi, il peso molecolare (Mw) ha una funzione importante. È noto, infatti, come una riduzione del peso molecolare (Mw) fino a valori

corrispondenti a unità pentasaccaridiche non porta ad una perdita dell'attività antiangiogenica. E' anzi accertato che, oltre ad una certa lunghezza, le catene epariniche favoriscono la dimerizzazione e quindi l'attivazione degli FGF, anziché inibirla.

5 **Descrizione dettagliata dell'invenzione**

Per grado di desolfatazione si intende la percentuale di acidi iduronici non solfatati contro gli acidi uronici totali originariamente presenti nell'eparina di partenza. Un primo intervallo preferito di percentuale di desolfatazione è compreso fra circa 40 e circa 60%.Tra i
10 composti di formula (I) è preferito:

eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare (Mw) 11200, indice di polidispersione D 1,3, grado di solfatazione 1,99 (espresso come rapporto molare SO_3^-/COO^-), percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali di circa 50% (di
15 seguito anche denominato ST1514). Detto composto è compreso nella formula (I) dove, tra le altre definizioni corrispondenti, $m/n=1/1$ e le unità contrassegnate da m e n sono distribuite lungo la catena del polisaccaride in modo regolare e alternato.

I composti secondo la presente invenzione sono preparati
20 mediante un procedimento che comprende:

- a) trattamento basico a una temperatura compresa tra la temperatura ambiente e circa 100°C, preferibilmente tra 50 e 70°C, ancora più

preferibilmente a circa 65°C, che porta all'eliminazione di una percentuale controllata di gruppi solfato in posizione 2 dell'acido iduronico e alla formazione di gruppi epossidici; e, se desiderato

- b) apertura di detto anello epossidico a pH circa 7, a una temperatura
5 compresa fra circa 50°C e circa 100°C, preferibilmente a circa 70°C a dare residui di acido galatturonico, oppure, in alternativa,
- c) apertura di detto anello epossidico a una temperatura compresa fra circa 0°C e circa 30°C, preferibilmente a circa 25°C a dare residui di acido iduronico; e, se desiderato
- 10 d) ossidazione con periodato di sodio dei dioli, a dare l'apertura dell'anello glicosidico e la formazione di due gruppi aldeidici per residuo modificato;
- e) riduzione di detti gruppi aldeidici ad alcool primario e, se desiderato, trasformazione del gruppo D in un gruppo diverso da idrossile, come
15 previsto dai significati dati nella formula (I)
- f) eventuale idrolisi acida per ottenere oligosaccaridi corrispondenti alle sequenze regolari, oppure, in alternativa
- g) idrolisi enzimatica parziale con un enzima scelto tra liasi, eparinasi, eparitinasi o equivalente dei prodotti ottenuti nello stadio e) a dare
20 oligosaccaridi, preferibilmente tetra- od ottasaccardi aventi il residuo terminale non riducente costituito da acido iduronico insaturo, il residuo riducente costituito da una N-solfoglucosammina e

contenenti almeno un residuo di acido iduronico aperto; oppure, in alternativa

- h) il composto ottenuto dallo stadio a), oppure il prodotto ottenuto dallo stadio b) viene trattato per idrolisi enzimatica parziale, e se
5 desiderato
- i) sottoporre i prodotti ottenuti da uno degli stadi a), b) ed e) a parziale 6-O-desolfatazione; o, in alternativa,
- j) sottoporre l'eparina di partenza parzialmente o totalmente 6-desolfatata agli stadi a), b) ed e).

10 Secondo la presente invenzione, è preferita:

eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento sopra descritto, dove lo stadio a) è condotto per 45' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 e avente peso molecolare (Mw) 11200, , indice di polidispersione D 1,3, grado di solfatazione 1,99 (espresso come
15 rapporto molare SO₃⁻/COO⁻, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali di circa 50% (di seguito anche denominato ST1514);

I pesi molecolari sono determinati via HPLC-GPC (cromatografia liquida ad alta prestazione – cromatografia di permeazione su gel). Il
20 grado di solfatazione è determinato per via conduttimetrica e la percentuale di acidi uronici modificati è determinata via ¹³C-NMR.

Mw è il peso ponderale, D è l'indice di dispersione espresso come

Mw/Mn.

Secondo la presente invenzione, i prodotti di partenza sono glicosamminoglicani di varia origine, preferibilmente eparine naturali. È anche possibile utilizzare eparine modificate chimicamente aventi un contenuto percentuale di N,6 disolfato compreso tra 0 e 100%.
5 Partendo da prodotti con un diverso contenuto di glucosammina 6-O-solfato, è possibile modulare la lunghezza delle sequenze regolari tra un acido uronico aperto e l'altro. I glicosamminoglicani secondo la presente invenzione che presentano l'apertura dell'anello glicosidico
10 sono convenzionalmente chiamati dai tecnici del settore derivati RO, con ciò intendendo che l'anello glicosidico è stato aperto mediante un'azione di ossidazione, seguita da una riduzione (Reduction-Oxidation - RO). Questa apertura dell'anello glicosidico è anche convenzionalmente detta "glycol split", dalla formazione dei due
15 ossidrili primari presenti sull'anello aperto. I composti della presente invenzione saranno anche denominati derivati "RO" o "glycol split".

In un'ulteriore realizzazione della presente invenzione, le aldeidi e gli ossidrili primari derivanti dalla reazione di apertura sopra descritta ("glycol split") si prestano anche alla successiva funzionalizzazione.
20 Pertanto, i composti di formula (I) possono anche recare sugli ossidrili primari derivanti dal "glycol split" gruppi uguali o diversi fra loro, come definiti sopra per X e X', ad esempio gruppi oligosaccaridici o peptidi,

dal singolo saccaride o amminoacido, fino a qualche unità di lunghezza, preferibilmente 2 o 3 unità.

I composti di formula (I), dove X e X' sono $-\text{CH}_2\text{OH}$ possono essere impiegati anche come veicoli per altri tipi di farmaci, mediante un opportuno legame con la porzione eparinica che sia in grado di fornire un legame stabile nelle normali condizioni di fabbricazione e conservazione di una specialità farmaceutica, che però liberi il farmaco veicolato nell'organismo, preferibilmente vicino o sull'organo bersaglio. Esempi di farmaci che possono essere veicolati sono antiinfiammatori, steroidei e non steroidei, corticosteroidi, altri farmaci ad azione antimetastatica, nel qual caso si avrà un vantaggioso potenziamento dell'effetto antimetastatico, derivante dalla sommatoria dell'attività propria dei composti della presente invenzione e dell'antimetastatico legato, con i relativi vantaggi di una maggiore selettività di bersaglio e minore tossicità sistemica. Esempi di tali farmaci sono gli inibitori delle metalloproteinasasi. Altri farmaci utilmente veicolati sono quelli che agiscono a livello endoteliale. Anche i composti di formula (I) dove X e X' sono diversi da ossidrile o aldeide, possono essere utilizzati come veicoli di farmaci, nel qual caso, i gruppi X e X' agiranno da "distanziatori" tra la molecola veicolo, ossia il glicosamminoglicano della presente invenzione e il farmaco veicolato, nel caso ciò fosse desiderato per motivi di farmacocinetica o farmacodinamica.

Nel caso di composti secondo la presente invenzione derivanti dall'eparina, questi sono preparati a partire dall'eparina stessa mediante tecniche di desolfatazione note al tecnico esperto del ramo. Ad esempio, la desolfatazione viene condotta in presenza di agenti
5 alcalini, quale l'idrossido di sodio, a una temperatura compresa fra la temperatura ambiente e 100°C, preferibilmente fra 50°C e 70°C, ad esempio a 60°C, per un tempo sufficiente ad ottenere la desolfatazione desiderata. Il controllo della desolfatazione è fatto agendo sui parametri di processo, quali le concentrazioni dei reagenti, la temperatura e i
10 tempi di reazione. Un esempio preferito consiste nel mantenere costanti le concentrazioni di substrato (glicosamminoglicano) a 80 mg/ml e di NaOH a 1 M, la temperatura a 60°C e controllando la desolfatazione con il tempo di reazione, tra 15' e 60'. L'esperto del settore potrà variare le condizioni, ad esempio alzando la temperatura di reazione e
15 abbreviando il tempo di reazione, sulla base di tentativi normali nella pratica sperimentale e sulla base della sua conoscenza generale.

Il trattamento con agenti alcalini dà luogo a un intermedio caratterizzato dalla presenza di un anello epossidico sull'unità desolfatata. In modo del tutto sorprendente, tali intermedi si sono
20 rivelati dotati di proprietà antiangiogeniche analoghe a quelli dei composti di formula (I). Pertanto, è un ulteriore oggetto della presente invenzione un derivato di eparina parzialmente desolfatata, quindi con

carica ridotta, in particolare eparina desolfatata in grado non superiore al 60%, caratterizzata da un anello epossidico sul sito di desolfatazione. Detti composti caratterizzati da un anello epossidico rientrano anche negli altri oggetti della presente invenzione, ossia composizioni farmaceutiche che li comprendono e il loro uso per la preparazione di
5 medicamenti ad attività antiangiogenica.

Sono preferiti i seguenti composti:

eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare (Mw) 12900 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione
10 2,05 (espresso come rapporto molare $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti (di seguito anche denominato ST1513);

eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare
15 (Mw) 11000 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 1,93 (espresso come rapporto molare $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$), percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti;

eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare
20 (Mw) 9200 D, indice di polidispersione D 1,5, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 11% gruppi epossidici, 27,5% residui uronici ossidati e ridotti.

In una delle possibili realizzazioni della presente invenzione, sono preferiti:

eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento sopra descritto, dove lo stadio a) è condotto per 15' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 e avente peso molecolare 12900 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 2,05 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻), percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti (di seguito denominato ST1513);

10 eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento sopra descritto, dove lo stadio a) è condotto per 30' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 (di seguito denominato ST1516) e avente peso molecolare (Mw) 11000 D, , indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 1,8 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻),
15 percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti;

eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento sopra descritto, dove lo stadio a) è condotto per 60' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 e avente peso molecolare (Mw) 9200 D, indice di
20 polidispersione D 1,5, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 11% gruppi epossidici, 27,5% residui uronici ossidati e ridotti (split) (di seguito denominato ST1515).

Successivamente alla formazione dell'anello epossidico, si effettua l'apertura dello stesso, anche in questo caso ricorrendo a tecniche note. La percentuale di epossido formato si calcola dal rapporto tra le aree dei segnali ^{13}C -NMR a circa 55 ppm, caratteristiche dei carboni 2 e 3 dell'anello di acido uronico contenente l'epossido e il totale dei segnali anomericici (C1 dei residui di acido uronico e glucosammina). Se l'apertura è condotta a caldo, si ottiene un residuo di acido galatturonico, se invece, l'apertura dell'epossido è condotta a freddo, si ottiene un residuo di acido iduronico. Esempi preferiti di composti comprendenti un anello epossidico sono quelli ottenibili dal procedimento sopra descritto e aventi un contenuto di residui uronici epossidati rispettivamente del 14% (di seguito ST1509, del 24% (di seguito ST1525) e del 30% (di seguito ST1526).

L'eparina parzialmente desolfatata è quindi sottoposta a "glycol-splitting" (brevemente RO), secondo quanto definito sopra e alla degradazione di Smith (brevemente SD).

In alternativa, i composti di formula (I) possono anche essere ottenuti senza passare dall'intermedio epossidico, ossia per diretto "glycol-splitting" e successiva degradazione di Smith.

Il procedimento fin qui descritto porta a composti di formula (I) nei quali i gruppi X e X' sono entrambi $-\text{CH}_2\text{OH}$.

Per gruppi X e X' diversi da $-\text{CH}_2\text{OH}$, sono disponibili all'esperto

del settore metodi per trasformare il gruppo idrossile con altri gruppi previsti dalle definizioni date sopra. Ad esempio, la coniugazione con amminoacidi o peptidi può essere fatta trattando l'aldeide intermedia, derivante dalla reazione di "glycol-splitting", con una reazione di amminazione riduttiva (Hoffmann J. e al. Carbohydrate Research, 117, 328-331 (1983)), che può essere condotta in solvente acquoso ed è compatibile con il mantenimento della struttura eparinica.

Se desiderato, e questo costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione, i composti di formula (I) possono essere ulteriormente degradati con agenti acidi in condizioni di pH opportune, ad esempio a pH 4 a dare una miscela di oligosaccaridi che mantengono le proprietà antiangiogeniche

Allo stesso modo, sono oggetto della presente invenzione i composti ottenuti da uno degli stadi g), h), i) e j) del procedimento descritto sopra.

Sono oggetto della presente invenzione composizioni farmaceutiche comprendenti come principio attivo almeno un composto di formula (I), da solo o in associazione con uno o più composti di formula (I), o, detto composto o detti composti di formula (I) in associazione con le eparine desolfatate descritte sopra, ad esempio gli intermedi epossidati, questi ultimi potendo anche essere utilizzati da soli come principi attivi nelle composizioni farmaceutiche. Il principio

attivo secondo la presente invenzione sarà in miscela con opportuni
veicoli e/o eccipienti di comune uso in tecnica farmaceutica, come ad
esempio descritto in "Remington's Pharmaceutical Sciences
Handbook", ultima edizione. Le composizioni secondo la presente
5 invenzione conterranno una quantità terapeuticamente efficace del
principio attivo. I dosaggi saranno determinati dall'esperto del settore,
ad esempio il clinico o il medico curante a seconda del tipo di patologia
da trattare e le condizioni del paziente, oppure in concomitanza con la
somministrazione di altri principi attivi. A titolo di esempio si possono
10 indicare dosaggi compresi fra 0,1 e 100 mg/Kg.

Esempi di composizioni farmaceutiche sono quelle che
permettono la somministrazione per via orale o parenterale, per via
endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, transdermica o sotto forma
di spray nasale od orale. Composizioni farmaceutiche adatte allo scopo
15 sono compresse, capsule, rigide o molli, polveri, soluzioni, sospensioni,
sciroppi, forme solide per preparazioni liquide estemporanee.
Composizioni per somministrazione parenterale sono ad esempio tutte
le forme iniettabili per intramuscolo, endovena, sottocute, sotto forma
di soluzioni, sospensioni, emulsioni. Vanno anche menzionate le
20 formulazioni liposomiali. Sono anche comprese le forme a cessione
controllata del principio attivo, sia come somministrazione orale,
compresse rivestite con opportuni strati, polveri microincapsulate,

complessi con ciclodestrine, forme deposito, ad esempio sottocute, come iniezioni deposito o impianti.

I composti secondo la presente invenzione hanno attività antiangiogenica. Questo li rende idonei per la preparazione di
5 medicinali utili per il trattamento di soggetti, generalmente mammiferi, in particolare umani, che soffrono di alterata angiogenesi. Esempi di patologie trattate con il medicamento oggetto della presente invenzione sono tumori primari, metastasi, retinopatie diabetiche, fibroplasia retrolenticolare, psoriasi, ristenosi dopo angioplastica, by-
10 pass coronarico..

Vantaggiosamente, i composti secondo la presente invenzione sono sostanzialmente privi degli effetti collaterali propri dell'eparina. In particolare, i composti secondo la presente invenzione sono sostanzialmente privi di attività anticoagulante. Per sostanzialmente
15 privi, l'esperto del settore intende attività nulla o non significativa dal punto di vista dell'applicazione clinica.

Uno dei primi fattori di crescita, scoperti avere un ruolo angiogenico, è stato il bFGF (o FGF-2) seguito, a breve distanza di tempo, dal aFGF (o FGF-1) (per una rassegna sull'argomento vedi
20 Christofori, Oxford University, 1996). Entrambe le proteine sono membri di una classe di fattori di crescita caratterizzati da un'alta affinità per l'eparina. Altri potenti induttori angiogenici sono

rappresentati dal VEGF, dal VEGF-B e dal VEGF-C. Tutti e tre i fattori VEGF così come i due FGF sono espressi in modo ubiquitario nell'organismo. Entrambi, a/bFGF (FGF-1 e FGF-2) e VEGF, legano recettori specifici ad alta affinità con un dominio transmembrana ad attività tirosin-chinasica. I tre recettori per i VEGF: VEGF-1 (flt-1), VEGF-2 (kdr/flk-1) e VEGF-3 (flt-4) sono espressi in modo specifico sulle cellule endoteliali mentre i 4 recettori del FGF sono espressi in numerosi organi e tessuti (per una rassegna sull'argomento vedi Risau and Flame 1995 Annu. Rev. Cell Dev: Biol. 11: 73-91). Il legame del bFGF all'eparina o a frammenti di eparansolfato ne determina la sua dimerizzazione e la possibilità' di legarsi al proprio recettore attivando la via di trasduzione del segnale che attiva la cellula endoteliale sia in senso mitogenico sia differenziativo.

L'inibizione del binding all'eparina o ai frammenti di eparansolfato da parte dell'FGF rappresenta quindi un valido target terapeutico per contrastare la neoangiogenesi patologica indotta da un aumentato livello locale o sistemico di fattori di crescita.

A questo scopo è stato allestito un modello in vitro in grado di valutare l'interferenza dei diversi derivati dell'eparina nei riguardi del binding dell'bFGF al proprio recettore

In particolare si sono utilizzate cellule ovariche di criceto cinese (CHO) che possiedono eparan solfati sulla loro superficie ma prive del

recettore 1 per l'FGF denominate CHO-K1. Sono state anche utilizzate cellule CHO esprimenti il recettore 1 per l'FGF e che al contrario delle prime non possiedono eparan solfati di membrana denominate CHO-745flg. Queste ultime sono anche trasfettate stabilmente con il cDNA per la "green fluorescent protein" e per questo motivo sono visualizzabili al microscopio a fluorescenza con una combinazione di filtri per la rivelazione dell'emissione nel verde. In sintesi la tecnica si basa sulla possibilità' che i due tipi cellulari possano interagire (formare dei legami stabili) solo nel caso che unitamente ai due tipi cellulari sia aggiunto FGF. Infatti, in questo caso gli eparan solfati delle cellule CHO-745flg si legheranno all'FGF il quale a sua volta legherà' le cellule CHO-K1 stabilendo un ponte. L'avvenuto binding è evidenziabile dalla fluorescenza verde data dalle cellule CHO-745flg.

Inoltre i composti sono stati saggiati per la loro attività inibente la proliferazione cellulare. Infatti, uno dei maggiori effetti dell'FGF è di stimolare la crescita cellulare in assenza di siero in cellule esprimenti il recettore 1 per l'FGF (FGFR-1).

A questo scopo sono state utilizzate due linee cellulari entrambe esprimenti FGFR-1 (L6WT1 e cellule di aorta bovina) e di cui è stata valutata la crescita in presenza di FGF con o senza aggiunta dei derivati dell'eparina per i quali era attesa un'attività' inibitoria.

Inibizione dell'adesione intercellulare FGF2-mediata

Cellule CHO-K1 sono state seminate alla densità di 90.000 cellule/cm² in piastre da 24 pozzetti. Dopo 24 ore le cellule sono fissate in glutaraldeide 3% in PBS per 2 ore a 4°C e lavate con 0,1 M glicina/PBS. Sui monostrati fissati vengono quindi seminate cellule CHO 745/flg, trasfettate con FGFR-1 alla densità di 50.000 cellule/cm² in DMEM contenente 10 mM EDTA, 30 ng/ml FGF-2 e dosi crescenti dei composti in esame. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C, le cellule adese vengono quindi contate al microscopio rovesciato.

10 I risultati sono espressi come percentuale del numero di cellule adese rispetto a quelle misurate in assenza dei composti in esame. I composti sono stati esaminati in triplicato a 6 concentrazioni comprese tra 1 ng/ml e 100 µg/ml e per ciascuno composto è stata calcolata la sua ID50 (Tabella 1)

Tabella 1**Inibizione dell'adesione intercellulare (ID50) tra cellule CHO-K1 e CHO-745flg**

Prodotto	Inibizione (ID50)
Eparina	100
Eparina RO	8
ST1513	80
ST1516	110
ST1514	105
ST1515	120
ST1525	50
ST1528	75
ST1507	125

5

Inibizione della sintesi di DNA in cellule L6 trasfettate con FGFR-1

Cellule L6-WT1 (mioblasti di ratto trasfettati con FGFR-1) sono state seminate a 25.000 cellule/cm² in piastre da 48 pozzetti in DMEM+ FCS 10%. Dopo 24 ore le cellule sono state lavate con terreno
 10 esente da siero e incubate per 48 ore con DMEM+FCS 0,5%. Le cellule sono state quindi incubate per 16 ore con FGF-2 alla concentrazione di

15 e 30 ng/ml in presenza o in assenza del composto in esame (tutti a 100 µg/ml). Al termine dell'incubazione veniva aggiunta 3H-timidina (0,25 µCi/pozzetto) senza cambiare il terreno. Dopo 6 ore viene misurata l'attività TCA precipitabile. Ciascun punto sperimentale è la
5 media di 3 determinazioni. I risultati sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2

Inibizione della sintesi di DNA in cellule L6 trasfettate con FGFR-1.

Prodotto	Incorporazione di 3H-timidina (% sul controllo)
Eparina (FGF-2 15 ng/ml)	50
Eparina (FGF-2 30 ng/ml)	74
Eparina RO (FGF-2 15 ng/ml)	41
Eparina RO (FGF-2 30 ng/ml)	80
ST1513 (FGF-2 15 ng/ml)	93
ST1513 (FGF-2 30 ng/ml)	102
G3025B (FGF-2 15 ng/ml)	68
G3025B (FGF-2 30 ng/ml)	71
ST1514 (FGF-2 15 ng/ml)	58
ST1514 (FGF-2 30ng/ml)	99
ST1515 (FGF-2 15 ng/ml)	79
ST1515 (FGF-2 30 ng/ml)	100

**Effetto sulla sintesi di DNA in cellule endoteliali aortiche
bovine (BAEC)**

Cellule BAEC sono state seminate a 2.500 cellule/cm² in piastre da 48 pozzetti in terreno completo EGM Bullet kit. Dopo 24 ore le cellule sono state coltivate in assenza di siero in terreno EGM senza estratto di cervello bovino e hEGF. Dopo ulteriori 24 ore, le cellule sono state trattate con 30 ng/ml di bFGF in presenza di concentrazioni crescenti del composto in esame. Dopo 16 ore, veniva aggiunto al terreno 1 µCi/ml di 3H-timidina. Dopo 6 ore viene misurata l'attività TCA precipitabile. Ciascun punto sperimentale è la media di 3 determinazioni. I risultati sono riportati in Tabelle 3-6

Tabella 3

**Effetto sulla sintesi di DNA in cellule endoteliali aortiche
bovine (BAEC) - ST1514**

Concentrazione ng/ml	Incorporazione di ³ H- timidina (% sul controllo)
1	80
10	78
100	42
1000	33
10000	22
100000	5

Tabella 4

**Effetto sulla sintesi di DNA in cellule endoteliali aortiche
bovine (BAEC) - ST1528**

Concentrazione ng/ml	Incorporazione di ³ H-timidina (% sul controllo)
1	85
10	73
100	85
1000	32
10000	28
100000	5

Tabella 5

**Effetto sulla sintesi di DNA in cellule endoteliali aortiche
bovine (BAEC) - ST1525**

Concentrazione ng/ml	Incorporazione di ³ H- timidina (% sul controllo)
1	75
10	67
100	26
1000	21
10000	7
100000	2

Tabella 6

**Effetto sulla sintesi di DNA in cellule endoteliali aortiche
bovine (BAEC) - ST1507**

Concentrazione ng/ml	Incorporazione di ³ H- timidina (% sul controllo)
1	92
10	92
100	45
1000	40
10000	18
100000	12

5

Test di proliferazione cellulare in BAEC

Cellule BAEC al 7° passaggio sono state seminate a 2.500 cellule/cm² in piastre da 96 pozzetti in terreno EBM senza estratto di cervello bovino e hEGF. A tale terreno si aggiungevano 30 ng/ml di FGF-2 e ciascuno dei composti in esame a 5 concentrazioni comprese tra 10 ng/ml e 100 µg/ml. Dopo 3 giorni le cellule venivano fissate e colorate con violetto cristallo e la densità ottica determinata mediante lettore per micropiastre ELISA. Ciascun punto sperimentale è stato

condotto in quadruplicato ed è stata calcolata la sua ID₅₀. I risultati sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7

Test di proliferazione cellulare in BAEC

5

Prodotto	Inibizione (ID ₅₀) µg/ml
Eparina	100
ST1509	0,02
ST1525	10
ST1526	0,02
ST1527	100
ST1528	0,1

Test di proliferazione cellulare in BAEC fetali GM 7373

Cellule GM7373 sono state seminate a 70000 cellule/cm² in piastre da 96 pozzetti in terreno MEM+FCS 10%. Dopo 24 ore le cellule sono state lavate con terreno esente da siero e trattate con 10ng/ml di FGF-2 in terreno contenente FCS 0,4%. Dopo 8 ore venivano aggiunti al terreno i composti in esame a 5 concentrazioni comprese tra 10 ng/ml e 100 µg/ml. Dopo ulteriori 16 ore le cellule erano tripsinizzate e contate alla camera di Burker. Per ciascun composto è stata calcolata

10

la sua ID₅₀ e i risultati sono la media di 2 esperimenti in triplicato. I risultati sono riportati in Tabella 8.

Tabella 8

Test di proliferazione cellulare in BAEC fetali GM 7373

5

Prodotto	Inibizione (ID ₅₀) µg/ml
Eparina	2
ST1509	0,3
ST1525	2
ST1526	1
ST1527	20
ST1528	0,2
ST1514	0,1

Inibizione dell'angiogenesi

Per lo studio dell'angiogenesi ci si è avvalsi del modello della membrana corioallantoidea di embrioni di pollo (Ribatti e al. Int. J. Dev. Biol., 40, 1189 (1996)).

300 uova embrionate di pollo sono state messe a incubare a 37°C in condizioni costanti di umidità. Al 3° giorno di incubazione, dopo avere aspirato 2-3 ml di albume in corrispondenza del polo acuto dell'uovo, al fine di staccare la CAM dal guscio, è stata aperta con una

10

forbice una finestra nel guscio. Così sono stati messi in evidenza i vasi sottostanti della CAM. La finestra è stata chiusa con un vetro trasparente e le uova sono state riposte in incubatore. All'8° giorno di incubazione, in condizioni di sterilità le CAM sono state trattate secondo il protocollo descritto più avanti utilizzando una tecnica messa a punto recentemente (Ribatti e al. *J. Vasc. Res.* 34, 455 (1997)), che prevede l'impiego di campioni di spugne sterili di gelatina delle dimensioni di 1 mm². Ciascuna molecola alla concentrazione di 50 o 100 µg/embrione è stata risospesa in 3 µl di PBS. Come controllo positivo è stato impiegato il FGF-2 (1 µg/spugna), per il quale è stato dimostrata una potente attività angiogenica sulla CAM (Ribatti e al., *Dev. Biol.* 170, 39, (1995)). Le spugne sono dapprima state appoggiate sulla superficie della CAM, quindi sono stati pipettati sulla superficie della spugna 3 µl di soluzione della sostanza in esame. Le CAM sono state esaminate quotidianamente utilizzando uno stereomicroscopio Zeiss SR provvisto di dispositivo fotografico. Gli esperimenti sono stati sospesi il 12° giorno di incubazione, quando è stata eseguita una valutazione globale dell'attività angiostatica delle molecole espressa come percentuale di inibizione in rapporto al numero di esperimenti avviati e portati a termine (Tabella 9). Inoltre per il composto ST1514, saggiato alla concentrazione di 100 µg/embrione è anche stata eseguita una valutazione quantitativa macroscopica dell'attività angiostatica

secondo la tecnica proposta da Brooks e al. (Science, 264, 569, (1994)), contando il numero dei vasi che circondano la spugna. Il numero dei vasi è stato confrontato con quello delle spugne di controllo trattate con PBS (veicolo del composto in esame) e con FGF-2 (controllo positivo). I
5 risultati sono riportati in Tabella 10.

Tabella 9

Attività angiostatica su modello CAM

Composto	Concentrazione ($\mu\text{g}/\text{embrione}$)	N° esperimenti	Inibizione (%)
Eparina N- acetilata	50	10	0
RO-eparina (ox- red 19,6%)	50	10	20
ST1514 (RO 56%)	50	10	50
ST1514 (RO 56%)	100	10	80

10

Si deve osservare che l'eparina nativa non ha attività.

Tabella 10

**Attività angiostatica, valutazione quantitativa macroscopica
(Brooks)**

Composto	N° embrioni	N° vasi interfaccia spugna/CAM
ST1514 (100 µg/embrione)	10	2+1
PBS (3 µl)	5	7+2
FGF-2 (1 µg/embrione)	5	50+4

5

Si deve osservare che l'eparina nativa non ha attività.

Valutazione della tossicità di eparine in topi Balb/c.

20 topi Balb/c femmine di 6 settimane del peso di 20 g (Harlan), divisi per randomizzazione casuale a blocchi, furono trattati con eparina sodica, come riferimento, e con il composto secondo la presente invenzione, denominato ST1514. Lo schema di trattamento era del tipo q2dx5, cioè 5 somministrazioni totali a distanza di 2 giorni l'una dall'altra, somministrando sotto cute 200 µl/topo delle soluzioni 50 mg/Kg/10 ml e 25 mg/Kg/10 ml.

15 Le sostanze furono solubilizzate nel seguente modo:

Eparina sodica: la soluzione è preparata solubilizzando 160 mg di polvere in 4 ml di PBS 1x libero da ioni Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ pH 7.4; è suddivisa

in aliquote da 243 μ l e conservata a -20°C . Al momento del trattamento la soluzione è diluita in PBS (Dulbecco, formula modificata) 1x libero da ioni Ca^{++} e Mg^{++} pH 7.4 in modo da avere la sostanza alla concentrazione finale di 50 mg/Kg/10 ml e 25 mg/Kg/10 ml.

5 ST1514: la soluzione è preparata solubilizzando 160 mg di polvere in 4 ml di PBS 1x libero da ioni Ca^{++} e Mg^{++} pH 7.4; è suddivisa in aliquote da 243 μ l e conservata a -20°C . Al momento del trattamento la soluzione è diluita in PBS 1x libero da ioni Ca^{++} e Mg^{++} pH 7.4 in modo da avere la sostanza alla concentrazione finale di 50 mg/Kg/10
10 ml e 25 mg/Kg/10 ml.

Dopo 48 ore dall'ultima somministrazione delle sostanze in studio è eseguito un prelievo di sangue per l'analisi emocromocitometrica.

Prelievo dei campioni di sangue: i topi sono posti in una scatola chiusa ermeticamente, nella quale è insufflata CO_2 in una quantità tale
15 da tramortire l'animale. Quindi, da ogni topo viene prelevato il sangue dal plesso retro-orbitale (circa 1 ml di sangue/topo) che viene distribuito nella quantità di 0.4 ml di sangue/topo in provette Eppendorf contenenti 20 μ l di eparina Vister (5000 U/ml) per eseguire l'analisi emocromocitometrica; ed una medesima quantità di sangue
20 viene distribuita in altre provette Eppendorf contenenti 50 μ l di sodio citrato 3.8% per eseguire il test della determinazione del tempo di protrombina. Dopo il prelievo di sangue, ogni animale sarà sacrificato

per dislocazione cervicale.

Numero dei campioni: saranno prelevati 2 campioni di sangue/topo, da cui saranno allestite due letture emocitometriche, due vetrini ed un campione di plasma che è conservato a -20°C .

5 Conta all'emocitometro: l'apparecchio (Cell Analyzer 580 A, DELCON) viene utilizzato secondo la procedura standard riportata nel manuale operativo. Il sangue ($25\ \mu\text{l}$) è prelevato dal diluitore e portato ad un volume di 10 ml (dil. 1:400) con soluzione isotonica (Fisiol. PLTA, DELCON). Da questa soluzione (detta soluzione A), il diluitore preleva
10 automaticamente $100\ \mu\text{l}$ e li porta in un volume di 10 ml (dil. 1:100), ottenendo così la soluzione B. Nella soluzione A sono aggiunte 3 gocce di Emosol (DELCON) per lisare i globuli rossi. Questa soluzione sarà utilizzata per la lettura dei globuli bianchi (WBC). La soluzione B sarà invece utilizzata per la lettura dei globuli rossi (RBC) e delle piastrine
15 (PLT). Ogni campione sarà letto in doppio.

L'analisi statistica dei dati ottenuti è eseguita utilizzando ANOVA.

I gruppi di animali trattati con Eparina sodica alla dose 50 mg/Kg/10 ml e 25 mg/Kg/10 ml presentano nella regione di inoculo della sostanza un evidente ematoma, tale fenomeno non si evidenzia
20 nei gruppi sottoposti al trattamento con ST1514. Dall'esame autoptico degli animali in studio i gruppi sottoposti al trattamento con Eparina sodica alla dose 50 mg/Kg/10 ml e 25 mg/Kg/10 ml presentano un

fegato con caratteristiche anomale, questo fenomeno non si è evidenziato nei gruppi trattati con ST1514.

I dati riguardanti l'analisi ematologica mostrano una diminuzione dei globuli rossi in entrambi i gruppi trattati con Eparina sodica alla
5 dose 50 mg/Kg e 25 mg/Kg rispetto al gruppo di controllo diversamente tale differenza non si evidenzia nei gruppi trattati con ST1514.

Il gruppo trattato con eparina sodica alla dose di 25 mg/Kg presenta una piastrinopenia significativa rispetto al gruppo di
10 controllo. Tutti i gruppi di trattamento in studio non presentano differenze significative rispetto al gruppo di controllo del numero di leucociti.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

15

ESEMPIO 1

1 g di eparina viene disciolto in 12,5 ml di NaOH 1N. la soluzione viene scaldata sotto agitazione a 60°C per 45 minuti. La reazione è bloccata mediante rapido raffreddamento e neutralizzazione. Quindi la soluzione è scaldata a 70°C a pH 7 sino a completa apertura dell'anello
20 epossidico (l'andamento della reazione è controllato tramite NMR). Il campione desolfatato (qui nominato G2999H) è disciolto in 20 ml di acqua e raffreddato a 4°C. dopo l'aggiunta di 20 ml di una soluzione di NaIO₄ 0,2 M è lasciato sotto agitazione al buio per 20 ore, la reazione è

fermata mediante aggiunta di glicole etilenico e i sali sono eliminati mediante ultrafiltrazione tangenziale. Alla soluzione desalata (30-40 ml) sono aggiunti 400 mg di NaBH₄ suddivisi in più porzioni. La soluzione è lasciata sotto agitazione per 3 ore a temperatura ambiente, quindi
5 neutralizzata con HCl diluito e desalata mediante ultrafiltrazione tangenziale. Si ottengono 710 mg di prodotto, qui denominato ST1514. Peso molecolare ponderale (Mw): 11200 D, indice di polidispersione D 1,3, grado di solfatazione 1,9 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi
10 uronici totali, è di circa 50%. Il composto è stato caratterizzato con spettroscopia NMR (figura 1).

ESEMPI 2-4

Seguendo la stessa procedura dell'esempio 1, con l'eccezione che la soluzione basica era scaldata per, rispettivamente, 15, 30 e 60
15 minuti, furono ottenuti i composti aventi le seguenti caratteristiche:

- ST1513: peso molecolare ponderale (Mw) 12900 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 2,05 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali è: 5% gruppi
20 epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti (split);
- ST1516: peso molecolare ponderale (Mw) 12900 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 1.8 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻, percentuale di acidi uronici

modificati, rispetto agli acidi uronici totali, è: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti (split);

- ST1515: peso molecolare ponderale (Mw) 9200 D, indice di polidispersione D 1,5, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali è: 11% gruppi epossidici, 27,5% residui uronici ossidati e ridotti (split).

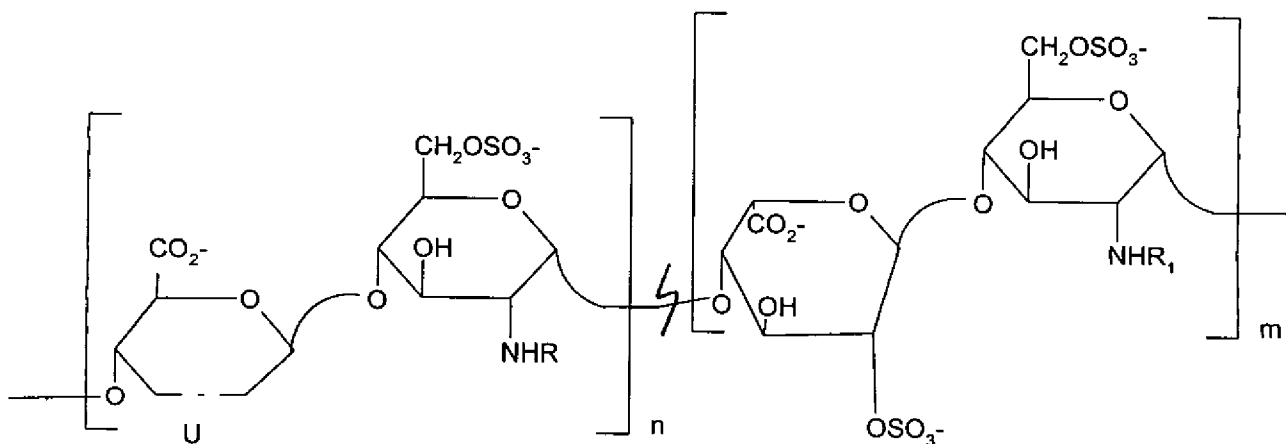
25 GEN. 2000

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

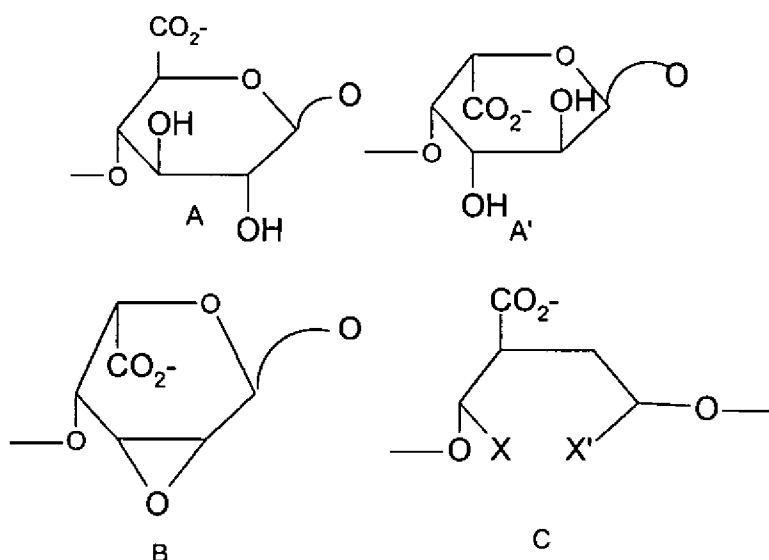


RIVENDICAZIONI

- 1) Derivato di glicosamminoglicano, in particolare eparina desolfatata, con grado di desolfatazione non superiore al 60% delle unità uroniche totali.
- 2) Derivato secondo la rivendicazione 1, che è un glicosamminoglicano eparino-simile.
- 3) Derivato secondo la rivendicazione 1, che è un'eparina modificata, contenente residui di glicosammina a diverso grado di N-desolfatazione ed eventuale successiva N-acetilazione totale o parziale.
- 4) Derivato secondo la rivendicazione 1, che ha la seguente formula (I):



dove l'anello U può avere i seguenti significati:



X e X', che possono essere uguali o diversi fra loro, sono un gruppo aldeide o il gruppo $-\text{CH}_2\text{-D}$, dove D è idrossile, oppure un amminoacido, un peptide o un residuo di un carboidrato o un oligosaccaride;

R e R₁, che possono essere uguali o diversi fra loro, sono un residuo SO_3 o acetile;

n e m, uguali o diversi fra loro, possono variare da 1 a 40, la somma di $n+m$ è compresa tra 6 e 40; il rapporto m/n è compreso fra 10/2 e 1/1, il simbolo \wr indica che le unità contrassegnate da m e n sono statisticamente distribuite lungo la catena del polisaccaride e non sono necessariamente in sequenza.

5) Derivato secondo la rivendicazione 4, che è eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare (Mw) 11200, indice di

polidispersione D 1,3, grado di solfatazione 1,99 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻), percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali di circa 50%.

- 6) Derivato secondo la rivendicazione 4, che è eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare (Mw) 12900 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 2,05 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻), percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti.
- 7) Derivato secondo la rivendicazione 4, che è eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare (Mw) 11000 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 1,93 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻), percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti.
- 8) Derivato secondo la rivendicazione 4, che è eparina parzialmente 2-O-desolfatata avente peso molecolare (Mw) 9200 D, indice di polidispersione D 1,5, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 11% gruppi epossidici, 27,5% residui uronici ossidati e ridotti.
- 9) Procedimento per la preparazione dei derivati delle rivendicazioni 1-8, che comprende i seguenti stadi:

- a) trattamento basico a una temperatura compresa tra la temperatura ambiente e circa 100°C, preferibilmente tra 50 e 70°C, ancora più preferibilmente a circa 65°C, che porta all'eliminazione di una percentuale controllata di gruppi solfato in
5 posizione 2 dell'acido iduronico e alla formazione di gruppi epossidici; e, se desiderato
- b) apertura di detto anello epossidico a pH circa 7, a una temperatura compresa fra circa 50°C e circa 100°C, preferibilmente a circa 70°C a dare residui di acido galatturonico,
10 oppure, in alternativa,
- c) apertura di detto anello epossidico a una temperatura compresa fra circa 0°C e circa 30°C, preferibilmente a circa 25°C a dare residui di acido iduronico; e, se desiderato
- d) ossidazione con periodato di sodio dei dioli, a dare l'apertura
15 dell'anello glicosidico e la formazione di due gruppi aldeidici per residuo modificato;
- e) riduzione di detti gruppi aldeidici ad alcool primario, e, se desiderato, trasformazione del gruppo D in un gruppo diverso da idrossile, come previsto dai significati della rivendicazione 4;
- 20 f) eventuale idrolisi acida per ottenere oligosaccaridi corrispondenti alle sequenze regolari, oppure, in alternativa
- g) idrolisi enzimatica parziale con un enzima scelto tra liasi,

- eparinasi, eparitinasi o equivalente dei prodotti ottenuti nello stadio e) a dare oligosaccaridi, preferibilmente tetra- od ottasaccardi aventi il residuo terminale non riducente costituito da acido iduronico insaturo, il residuo riducente costituito da una N-solfoglucosammina e contenenti almeno un residuo di acido iduronico aperto; oppure, in alternativa
- 5
- h) il composto ottenuto dallo stadio a), oppure il prodotto ottenuto dallo stadio b) viene trattato per idrolisi enzimatica parziale, e se desiderato
- 10
- i) sottoporre i prodotti ottenuti da uno degli stadi a), b) ed e) a parziale 6-O-desolfatazione; o, in alternativa,
- j) sottoporre l'eparina di partenza parzialmente o totalmente 6-desolfatata agli stadi a), b) ed e).
- 10) Eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento della rivendicazione 9, dove lo stadio a) è condotto per 45' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 e avente peso molecolare (Mw) 11200, , indice di polidispersione D 1,3, grado di solfatazione 1,99 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali di circa 50%.
- 15
- 20 11) Eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento della rivendicazione 9, dove lo stadio a) è condotto per 15' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 e avente peso molecolare 12900 D,

indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 2,05 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti.

- 5 12) Eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento della rivendicazione 9, dove lo stadio a) è condotto per 30' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 e avente peso molecolare (Mw) 11000 D, indice di polidispersione D 1,5, grado di solfatazione 1,8 (espresso come rapporto molare SO₃⁻/COO⁻), percentuale di acidi uronici
10 modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 5% gruppi epossidici, 29% residui uronici ossidati e ridotti.
- 13) Eparina parzialmente 2-O-desolfatata, ottenibile dal procedimento della rivendicazione 9, dove lo stadio a) è condotto per 60' a 60°C e lo stadio b) a 70°C a pH 7 e avente peso molecolare (Mw) 9200 D,
15 indice di polidispersione D 1,5, percentuale di acidi uronici modificati, rispetto agli acidi uronici totali: 11% gruppi epossidici, 27,5% residui uronici ossidati e ridotti.
- 14) Miscela di oligosaccaridi ad attività antiangiogenica ottenibili dalla degradazione acida dei composti delle rivendicazioni 4-8.
- 20 15) Miscela di oligosaccaridi ad attività antiangiogenica ottenibili dallo stadio f) del procedimento della rivendicazione 9.
- 16) Miscela di oligosaccaridi ad attività antiangiogenica ottenibili dallo

stadio g) del procedimento della rivendicazione 9.

17) Miscela di oligosaccaridi ad attività antiangiogenica ottenibili dallo stadio h) del procedimento della rivendicazione 9.

18) Miscela di oligosaccaridi ad attività antiangiogenica ottenibili dallo stadio i) del procedimento della rivendicazione 9.

19) Composizioni farmaceutiche comprendenti almeno un composto delle rivendicazioni 1-8 e/o 10-18 come principio attivo in miscela con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.

20) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18 come medicinali.

21) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicinale ad attività antiangiogenica.

22) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicinale per il trattamento di stati patologici dovuti a un'alterata angiogenesi.

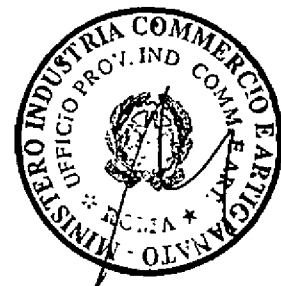
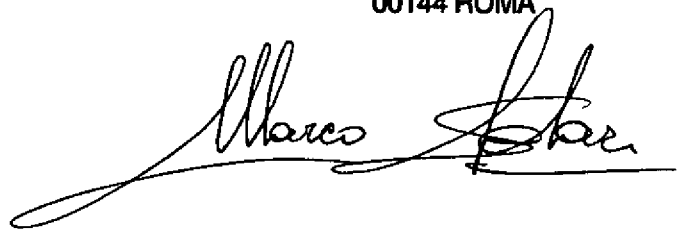
23) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicinale per il trattamento di tumori, eventualmente associati a metastasi.

24) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicinale per il trattamento di metastasi tumorali.

- 25) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicamento per il trattamento di retinopatie diabetiche.
- 26) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicamento per il trattamento di fibroplasia retrolenticolare.
- 27) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicamento per il trattamento della psoriasi.
- 28) Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 e 10-18, oppure secondo la rivendicazione 20, per la preparazione di un medicamento per il trattamento della ristenosi dopo angioplastica o dopo by-pass coronarico.

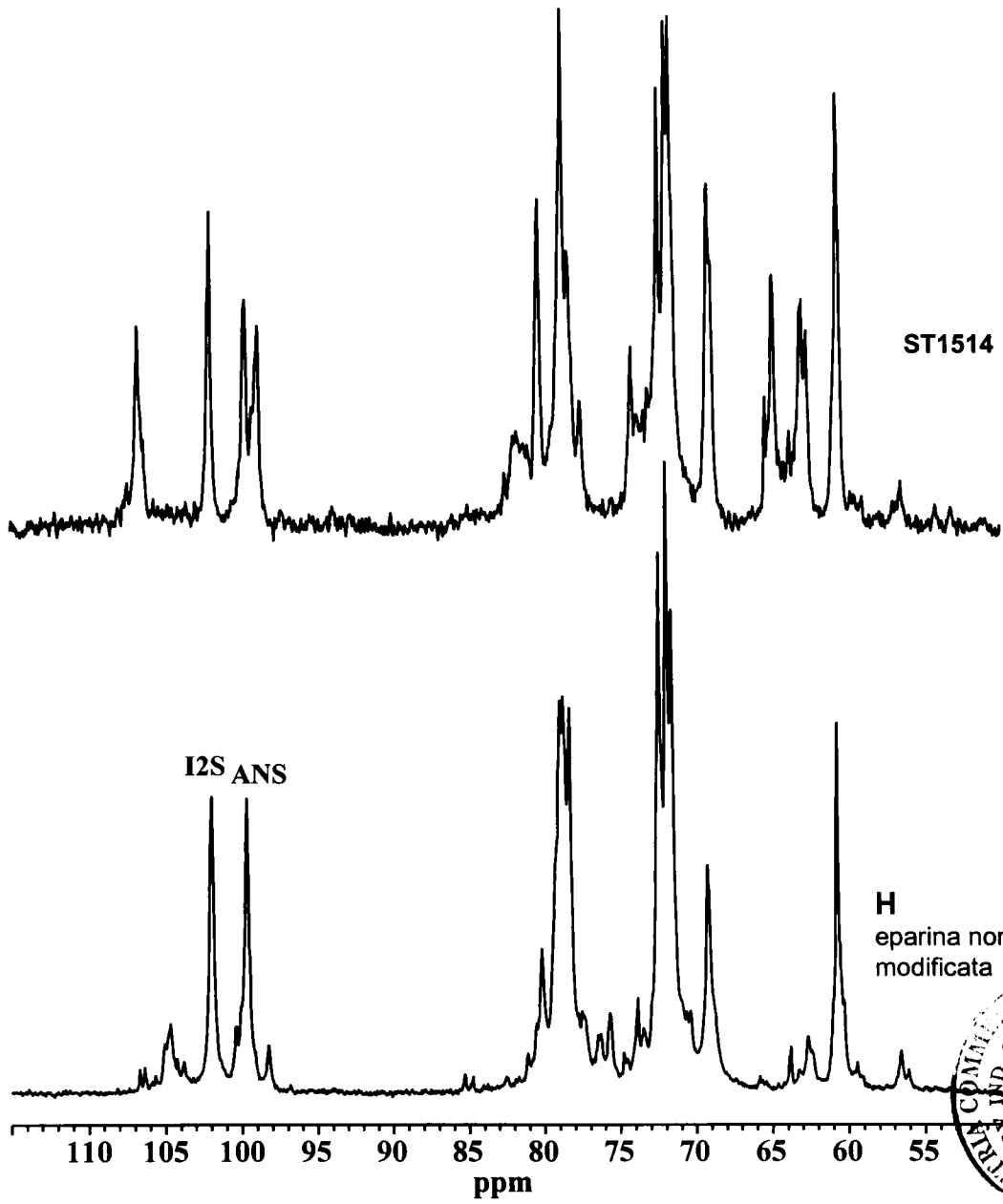
25 GEN. 2000

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA



RM2000 A 000041.

FIGURA 1



25 GEN. 2000

Marco S...

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA