



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 325 549**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

C08B 37/10 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05730715 .9**

(96) Fecha de presentación : **23.02.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1720994**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

(54) Título: **Oligosacáridos, procedimiento de preparación, utilización y composiciones farmacéuticas que los contienen.**

(30) Prioridad: **24.02.2004 FR 04 01810**

(73) Titular/es: **Aventis Pharma S.A.**
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.09.2009

(72) Inventor/es: **Viskov, Christian y**
Mourier, Pierre

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.09.2009

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Oligosacáridos, procedimiento de preparación, utilización y composiciones farmacéuticas que los contienen.

La presente invención se refiere a nuevos compuestos químicos, particularmente nuevos oligosacáridos, a su procedimiento de preparación, a su utilización y a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Estos oligosacáridos son útiles para el tratamiento del cáncer, en particular la prevención e inhibición de la formación de metástasis.

Más particularmente, la invención se refiere, según un primer aspecto, a un procedimiento de despolimerización de un polisacárido que tiene en un principio propiedades anti-trombóticas.

Son conocidos los procedimientos de despolimerización de polisacáridos con propiedades anti-trombóticas. Estos procedimientos tienen en común:

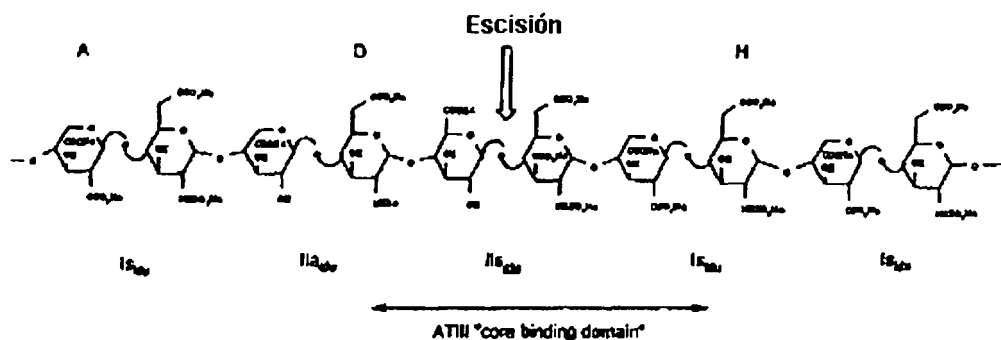
- el objetivo de obtener oligosacáridos de masa molecular media inferior, con el fin de limitar los efectos secundarios que sobrevienen cuando los polisacáridos de partida se utilizan como medicamentos;
- mantener una actividad antitrombótica satisfactoria después de la despolimerización.

Los polisacáridos con propiedades anti-trombóticas comerciales tales como la heparina o las heparinas de bajo peso molecular tales como Enoxaparina, tinzaparina, fragmina, son todos inhibidores de la heparanasa.

En condiciones fisiológicas normales, las células expresan la enzima heparanasa. Esta enzima permite regular indirectamente la mitogénesis, la neo-vascularización y la reparación de los tejidos. Uno de los mecanismos de acción de la heparanasa es escindir el proteoglicano de sulfato de heparán (el heparán sulfato proteoglicano (HSPG)). Este glicosaminoglicano está presente en la superficie de las células endoteliales y asegura la cohesión de la membrana basal (matriz extracelular). La escisión del proteoglicano de sulfato de heparán conlleva la liberación de factores de crecimiento tales como el FGF2. La liberación de los factores de crecimiento es necesaria para la mitogénesis y la angiogénesis. Sin embargo, esto no es suficiente para desencadenar estos mecanismos biológicos, es necesario que el FGF2 se fije a un glicosaminoglicano para generar una modificación alostérica de la proteína y favorecer su interacción con su receptor. De hecho, mediante la escisión de HSPG, la heparanasa genera fragmentos de sulfato de heparán que se van a fijar al FGF2 y van a favorecer la interacción con sus receptores y así inducir los mecanismos biológicos mencionados anteriormente. La escisión del HSPG de la matriz extracelular y la desestructuración de los capilares permite la extravasación celular.

La heparanasa está sobreexpresada por las células tumorales y favorece por lo tanto las metástasis y su neovascularización. Estos fenómenos son esenciales para la propagación y la supervivencia del tumor canceroso.

La heparina, un glicosaminoglicano estructuralmente cercano al sulfato de heparán es conocida por ser un inhibidor potente de la heparanasa. Este efecto se ha atribuido durante mucho tiempo a la presencia de la secuencia específica de unión a ATIII. En efecto, esta secuencia, aunque menos presente en el sulfato de heparán, es común a estos dos glicosaminoglicanos. La zona de escisión de la heparanasa está representada a continuación:



El punto de escisión de esta β -endo glicosidasa está situado en el centro de la secuencia mínima de fijación a ATIII. Se puede pensar por lo tanto que las propiedades antitrombóticas y de inhibición de la heparanasa están íntimamente asociadas (de hecho la heparina es un sustrato competitivo del sulfato de heparán). Debido a ello, es difícil utilizar este glicosaminoglicano como agente anti-metastático. En efecto, sus fuertes propiedades anti-coagulantes limitan su margen terapéutico e inducen efectos secundarios graves tales como hemorragias severas. Además, la inyección repetida de heparina puede conllevar en ciertos casos trombocitopenias que conllevan un resultado fatal (reacción inmunológica ligada a la asociación entre la heparina y el factor plaquetario 4 (PF4)).

Pocos documentos revelan los vínculos entre la estructura de los oligosacáridos y sus propiedades anti-heparanasa, en correlación con una actividad anti-metastásica. Así, Bitan *et al.* (Isr. J. Med. Sci. 1995; 31: 106-118) precisa las condiciones estructurales requeridas para la inhibición de la colonización de melanomas pulmonares por especies de heparina que inhiben la heparanasa: La heparanasa es inhibida eficazmente por fragmentos de heparina que contienen 16 azúcares o más (resumen; fig.2, p.110; fig.3, p.111; p. 116, col. de la derecha, 2ª frase). Los hexasacáridos se describen como malos inhibidores de la heparanasa (Fig.8, p.115). Además, se dice que la inhibición de la heparanasa no es posible más que con moléculas que tienen una masa molecular superior o igual a al menos 4.000 daltons (resumen, p.116, col. de la derecha, 4ª frase). Sin embargo, el método de determinación de la inhibición de la heparanasa es un método indirecto, ya que consiste en la evaluación de la aptitud de las células para degradar la matriz extra-celular en presencia de diferentes productos a ensayar (p.108; col. de la derecha, 2º párrafo “Degradation of Sulfated Proteoglycans”). No es por lo tanto específica de la heparanasa. Además, todos los productos descritos se obtienen por un método de escisión de la heparina por vía química (ácido nitroso) (p.108; col. de la izquierda, 2º párrafo “Heparin-Derived Oligosaccharides”).

Véanse también:

Vlodavski I, et al. Modulation of neovascularization and metastasis by species of heparin, Heparin and related Polysaccharides, D.A. Lane, *et al.*, Editor, *Plenum Press*, Nueva York, 1992;

Parish C R, et al. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumor metastasis by blocking tumor-cell-derived heparanases, *Int. J. Cancer* 40: 511-518, 1987.

Hasta la fecha, existe una necesidad importante de compuestos anti-metastásicos, y para la que no hay una solución comercialmente aceptable. Los poli- y oligo-sacáridos inhibidores de la heparanasa conocidos en la actualidad provienen directamente de fuentes naturales (heparina) o de procedimientos más o menos difíciles de poner en práctica (algunas heparinas de bajo peso molecular) y que presentan un componente anti-trombótico marcado, que no es compatible con un tratamiento anticanceroso, principalmente cuando el paciente que se va a tratar es sensible a las hemorragias.

Uno de los problemas actuales es por lo tanto obtener un producto que presenta una actividad anti-heparanasa significativa, esencialmente desprovisto de actividad anti-trombótica, a través de un método simple y reproducible.

Con este fin, y de manera sorprendente, se ha encontrado que un nuevo procedimiento de despolimerización de un polisacárido que tiene en un principio propiedades anti-trombóticas, en el que el polisacárido se despolimeriza por la heparinasa I a una temperatura comprendida entre 10°C y 20°C hasta que su actividad anti-trombótica, debida principalmente a la inhibición de los factores Xa y IIa, se anula esencialmente (<35 UI/mg), permite obtener un producto que conserva una actividad anti-heparanasa significativa.

Este procedimiento constituye por lo tanto un medio eficaz de obtención de productos enriquecidos in situ anti-heparanasa del polisacárido, eliminando su componente anti-trombótico. El procedimiento se explota más ventajosamente cuando la despolimerización del polisacárido se continúa hasta que su actividad anti-trombótica es inferior a 20 UI/mg.

Más particularmente, la despolimerización se continúa hasta alcanzar una masa molecular media inferior a 5.000 Da, preferentemente inferior a 3.000 Da.

Contra toda previsión, el producto obtenido por este procedimiento simple de poner en práctica, contiene principalmente hexasacáridos que son buenos inhibidores de la heparanasa. Además, estos hexasacáridos tienen una masa molecular media claramente inferior a 4.000 daltons, porque está generalmente comprendida entre 1.000 y 2.000 daltons.

El polisacárido es preferentemente una heparina.

La despolimerización se continúa ventajosamente hasta que la mezcla de la fracción hexacarídica esté esencialmente exenta de hexasacáridos sulfatados $\Delta\text{Is-Is}_{\text{id}}\text{-Is}_{\text{id}}$ y $\Delta\text{Is-Is}_{\text{id}}\text{-IIS}_{\text{glu}}$.

Las enzimas se utilizan habitualmente en condiciones denominadas “fisiológicas”, es decir, en las condiciones en las que funcionan habitualmente *in-vivo* en los organismos a partir de los cuales se extraen (principalmente: pH, temperatura, fuerza iónica, opcionalmente cofactores físicos (luz...) o químicos (coenzimas...)). La mayoría de las enzimas pueden utilizarse corrientemente a temperaturas superiores a su temperatura fisiológica, por ejemplo 45-50°C. En nuestra situación, y contra toda previsión, se ha observado que la despolimerización puede incluso tener lugar a una temperatura comprendida entre 10 y 20°C, en particular de 16°C, en condiciones de selectividad y de cinética aceptables, conservando así de la mejor forma los compuestos inhibidores de la heparanasa formados durante la reacción de despolimerización. Además, esto permite limitar la concentración final de heparinasa I en el medio de reacción al final de la reacción. En efecto, la realización de la reacción a una temperatura inferior a la temperatura óptima de reacción de la heparinasa I, que se puede situar aproximadamente a 25-45°C, permite evitar proceder a adiciones excesivas de enzima durante la reacción. Las adiciones de enzima se efectúan habitualmente cuando se

observa una bajada de la cinética de reacción diferente de la debida al empobrecimiento en sustrato. Por consiguiente, la utilización de una temperatura de reacción relativamente baja permite indirectamente facilitar una etapa posterior de purificación opcional, debido principalmente a la presencia limitada de enzima. La despolimerización puede realizarse por lo tanto debido a esto a una temperatura comprendida entre 10 y 20°C.

Con el fin de eliminar posibles oligosacáridos de baja masa molecular que se formarían durante la despolimerización, en particular disacáridos y tetrasacáridos, el procedimiento según la invención se continúa ventajosamente con una etapa en la que el producto de despolimerización del polisacárido se purifica por cromatografía por permeación de gel (GPC) a un pH inferior a 8 y superior a 5.

El procedimiento según la invención comprende ventajosamente una etapa posterior de purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la que una fase estacionaria, por ejemplo una sílice, es una fase inversa injertada (i) de C18 y (ii) de cetil trimetil amonio (CTA-SAX).

El procedimiento comprende además una primera etapa de desalado, que comprende ventajosamente la utilización de una fase móvil que contiene un electrolito en disolución acuosa, siendo dicho electrolito preferentemente esencialmente transparente entre 200 y 250 nm. Los electrolitos aceptables comprenden NaCl, pero para una utilización con un detector UV entre 200-250 nM, es preferible utilizar percloratos, metanosulfonatos o fosfatos de metales alcalinos tales como Na. Una fase estacionaria aceptable para la primera etapa de desalado es una resina intercambiadora de aniones. Una resina particularmente preferida es una resina Sepharosa Q®.

El procedimiento puede comprender además una segunda etapa de desalado, preferentemente mediante un gel de exclusión molecular, por ejemplo y preferentemente de tipo Sephadex G10®.

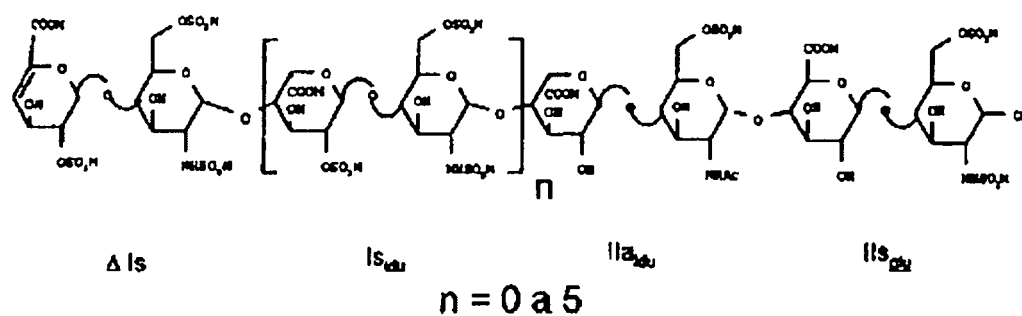
Otra solución para detectar los productos según la invención en las fracciones recogidas a la salida de la columna de HPLC puede consistir opcionalmente en la utilización de un difractorómetro.

Otras técnicas de desalado aceptables incluyen la utilización de técnicas de ósmosis, por ejemplo mediante membranas poliméricas.

Según un segundo aspecto, la invención se refiere a los productos obtenidos por un procedimiento según su primer aspecto.

Petitou *et al.* en J. Biol. Chem. (1988), 263(18), 8685-8690 divulgan un hexasacárido de fórmula $\Delta\text{Is-Is}_{\text{idu}}\text{-Is}_{\text{glu}}$ en forma de sal de sodio aislado a partir de un producto obtenido por un procedimiento de despolimerización parcial de la heparina por la heparinasa I. Este producto se describe como que no presenta actividad anti-trombótica. No se ha puesto de manifiesto ninguna otra propiedad de este producto. EEUU 4 916 219 describe también un procedimiento de despolimerización de la heparina por la heparinasa. Estos dos procedimientos se efectúan a 30°C.

Según un tercer aspecto, la invención se refiere a productos de fórmula general (I)



en la que:

R se elige entre H y SO_3M , y

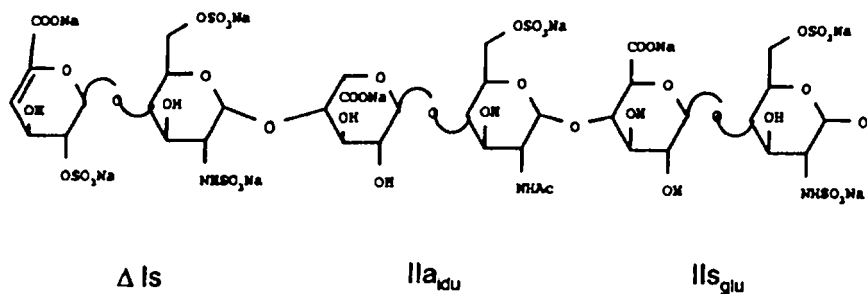
M se elige entre H, Li, Na y K:

con la excepción del producto para el que $n = 0$, $R = SO_3M$ y $M = Na$.

De forma inesperada, se ha observado que los productos conformes al tercer aspecto de la invención, presentan mejores propiedades físico-químicas cuando M se elige entre Li, Na y K, preferentemente Na. En particular, se mejoran la solubilidad y la estabilidad.

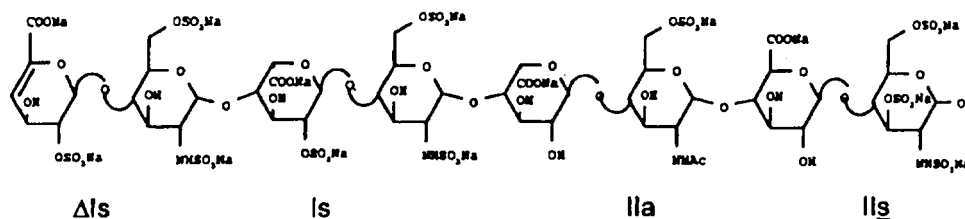
Los productos de fórmula general (I) preferidos son aquellos para los que $n=0$.

Según un cuarto aspecto, la invención se refiere a hexasacáridos. Un producto de fórmula (Ia) siguiente:



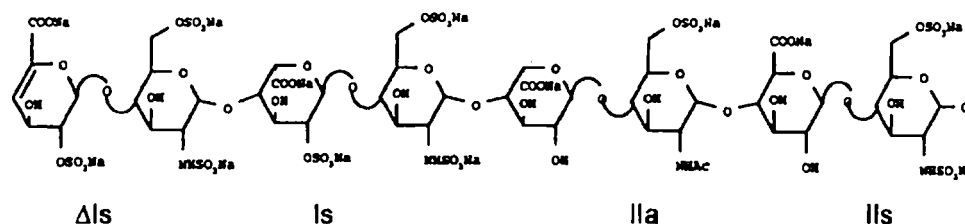
es conforme a la invención según su cuarto aspecto.

Un producto de fórmula (Ib) siguiente:



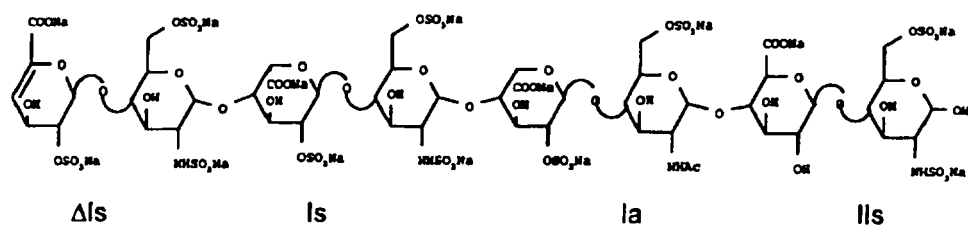
es conforme a la invención según su tercer aspecto.

Un producto de fórmula (Ic) siguiente:



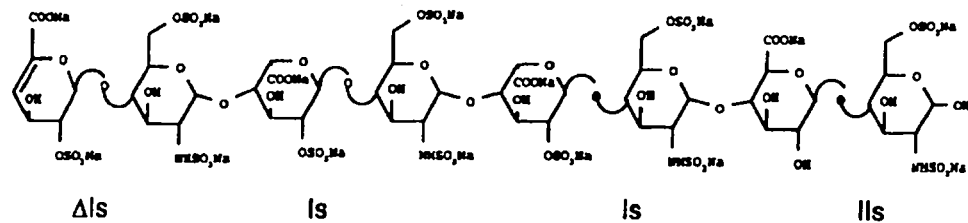
es conforme a la invención según su tercer aspecto.

Un producto de fórmula (Id) siguiente:



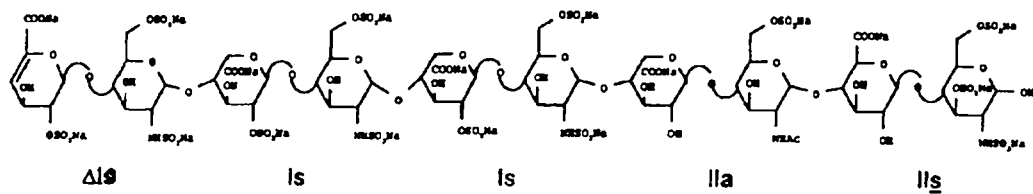
es conforme a la invención.

Un producto de fórmula (Ie) siguiente:



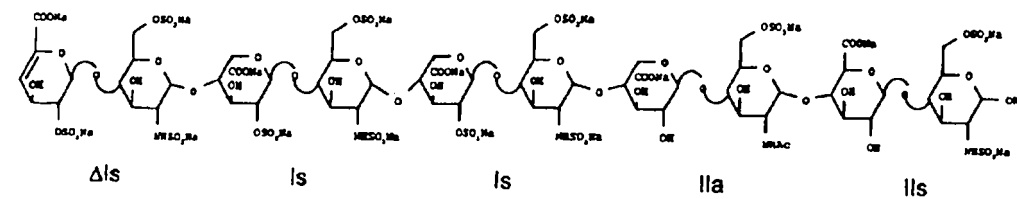
es conforme a la invención.

Un producto de fórmula (If) siguiente:



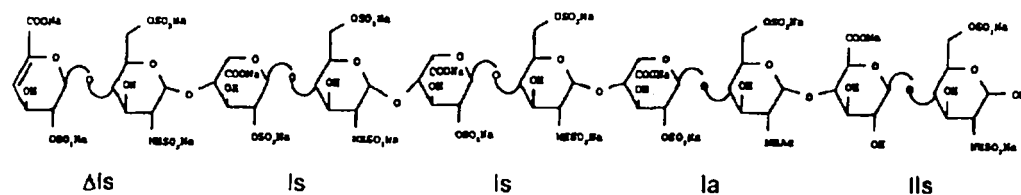
es conforme a la invención según su tercer aspecto.

Un producto de fórmula (Ig) siguiente:



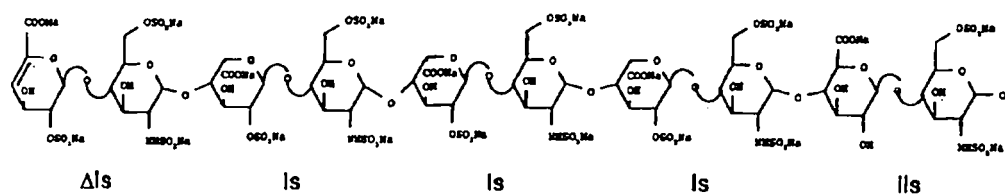
es conforme a la invención según su tercer aspecto.

Un producto de fórmula (Ih) siguiente:



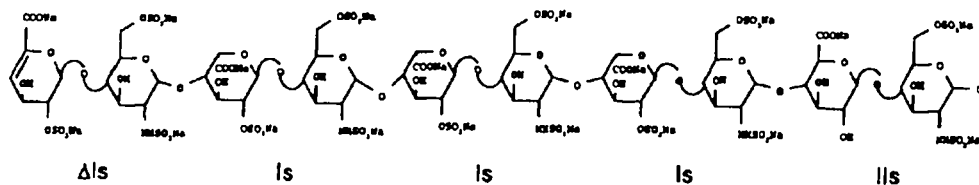
es conforme a la invención.

Un producto de fórmula (Ij) siguiente:



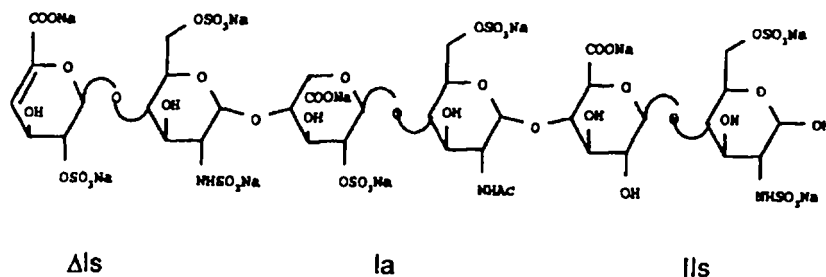
es conforme a la invención.

Un producto de fórmula (Ik) siguiente:



es conforme a la invención.

Un producto de fórmula (Im) siguiente:



es conforme a la invención según su cuarto aspecto.

Según un quinto aspecto, la invención se refiere a la utilización de un producto según uno cualquiera de los aspectos segundo a cuarto, para modular una proliferación celular, en particular asociada al cáncer, principalmente un cáncer de mama, de pulmón, de próstata, de colon o de páncreas.

Una utilización de un producto según el quinto aspecto de la invención es particularmente ventajosa cuando la proliferación celular está asociada a un proceso metastásico, así como cuando la utilización se efectúa en un estadio precoz de la enfermedad.

Una utilización de un producto según el quinto aspecto de la invención es particularmente ventajosa en combinación con un segundo producto anticanceroso, preferentemente citotóxico.

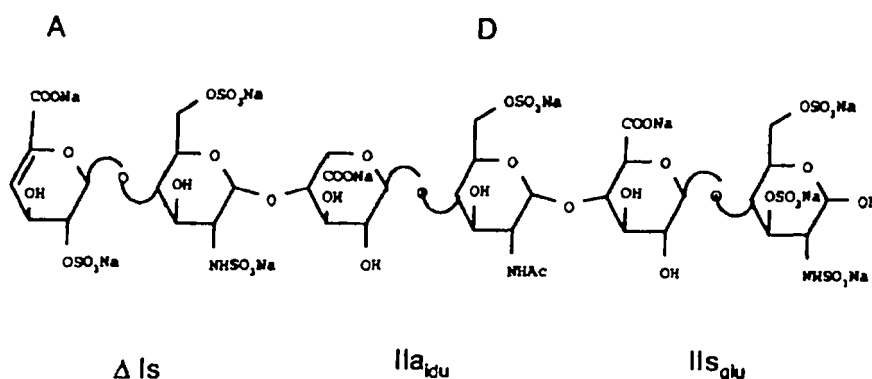
Un segundo producto anticanceroso se elige ventajosamente entre derivados del platino tales como cisplatino u oxaliplatino, taxoides tales como docetaxel o paclitaxel, derivados de bases púricas o pirimídicas tales como 5-FU, capecitabina o gemcitabina, vincas tales como vincristina o vinblastina, mostazas, heterociclos aromáticos condensados tales como estaurosporina, elipticina o camptotecinas tales como irinotecan, topotecan, combretastatinas tales como CA4P, derivados de la colchicina, tales como fosfato de colchicol.

El segundo producto anticanceroso es preferentemente docetaxel, oxaliplatino o irinotecan.

Cuando se estudia la inhibición de la heparanasa por diversas heparinas comerciales de bajo peso molecular, se evidencia que son todas inhibidoras de la heparanasa (Enoxaparina, tinzaparina, fragmina, etc ...). Sin embargo, hemos podido constatar que una nueva heparina de muy bajo peso molecular (ULMWH = Ultra Low Molecular Weight Heparin) (WO 02/08295; y la solicitud internacional aún sin publicar PCT/FR03/02960) no inhibe la heparanasa aunque contiene más secuencias afines a ATIII que la Enoxaparina. Hay ahí por consiguiente una incoherencia respecto a la teoría enunciada más arriba.

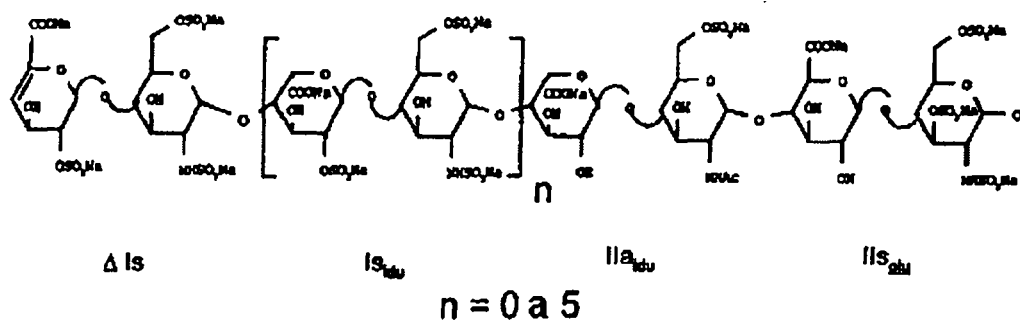
El procedimiento realizado según la invención da lugar principalmente a la formación de un hexasacárido que es el IsoATIII, de estructura Is-IIa-IIs, a continuación:

Hexasacárido Is-IIa-IIs (Iso ATIII):



Los resultados siguientes muestran que este hexasacárido Iso ATIII es un muy buen inhibidor de la heparanasa. Presenta además la ventaja considerable de no tener ninguna afinidad por ATIII y por consiguiente estar desprovisto de actividad anti-trombótica. La ventaja principal de esta invención es la desconexión de las propiedades antitrombóticas de los heparinoides de sus propiedades inhibidoras de la heparanasa. Comparativamente con la heparina y las HBPM, el margen terapéutico del hexasacárido Iso ATIII está muy aumentado y le hace ser potencialmente utilizable como agente antimetastático. En la presente invención, reivindicamos su utilización como tal y la preparación del hexasacárido Iso ATIII solo o mezclado con otros hexasacáridos procedentes de la despolimerización controlada de la heparina por la heparinasa I. Además, reivindicamos la idea de despolimerizar la heparina por la heparinasa I hasta el punto de extinción de su actividad aXa y la utilización de esta mezcla como agente antimetastático. Será en este caso una HBPM no antitrombótica y específicamente inhibidora de la heparanasa.

Reivindicamos la preparación y la utilización como agente antimetastásico de los productos siguientes aislados o mezclados:



Parte experimental

GPC

La cromatografía de exclusión en gel se realiza con 2 columnas de TSK Super SW2000 (300 x 4,6 mm) y una columna de seguridad de TSK Super (35 x 4,6 mm) (TOSOH BIOSEP). La detección se realiza por absorciometría en UV a 232 nm. La fase móvil es acetato de amonio 0,1 M. El volumen inyectado es 5 μ l.

Cromatografía CTA-SAX

El seguimiento HPLC se realiza por el método de CTA-SAX. La columna utilizada es una Hypersil BDS (150 x 2,1 mm) de partículas de 3 μ m sobre la que se ha adsorbido cetil trimetil amonio por percolación de una disolución de hidrógenofosfato de cetil trimetil amonio 1 mM en una mezcla agua - metanol (68-32) v/v a 45°C a 0,2 ml/min durante 4 horas.

Las condiciones de separación sobre este tipo de columna son las siguientes: la temperatura de la columna injertada se mantiene a 40°C. Se procede a un gradiente de elución en el que el disolvente A es agua ajustada a pH 3 por adición de ácido metano sulfónico. El disolvente B es una disolución 2N de metano sulfonato de amonio ajustada a pH 2,6. El gradiente de elución es el siguiente:

Tiempo (min)	Disolvente A	Disolvente B	Caudal (ml/min)
0	99	1	0,22
44	35	65	0,22
74	0	100	0,22

La detección utilizada es absorciometría en UV a 232 nm. Se utiliza también 202-247 nm como detección específica de los oligosacáridos acetilados.

Cromatografía semi-preparativa sobre CTA-SAX

Cromatografía en columna Hypersil BDS (250 x 20 mm) de partículas de 5 μ m, sobre la que se han injertado cadenas cetil trimetil amonio por percolación de una disolución de hidrógenofosfato de cetil trimetil amonio 1 mM en una mezcla agua-metanol (68-32) v/v a 45°C a 2 ml/min durante 4 horas.

ES 2 325 549 T3

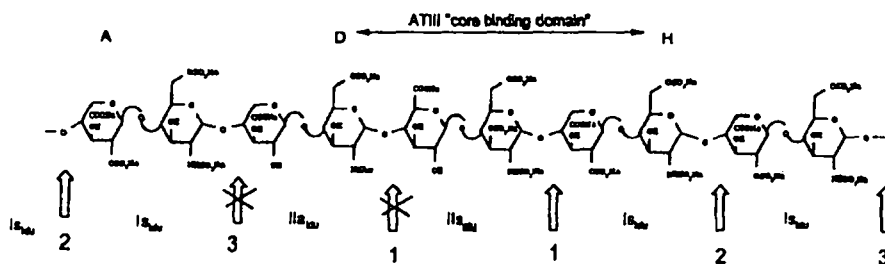
La separación se efectúa a temperatura ambiente. Se utiliza un gradiente de elución: el disolvente A es agua ajustada a pH 2,5 por adición de HCl. El disolvente B es una disolución de NaCl 2N ajustada a pH 2,5.

Tiempo (min)	Disolvente A	Disolvente B	Caudal (ml/min)
0	60	40	10
44	0	100	10

La detección es en UV a 232 nm. Se pueden inyectar 100 mg de fracción hexasacárido en cada separación.

Preparación del Hexasacárido Iso ATIII

El hexasacárido $\Delta\text{Is-IIa}_{\text{id}}\text{-II}_{\text{glu}}$ (hexasacárido iso ATIII) se obtiene por escisión por la heparinasa 1 del sitio afín ATIII de la heparina. La despolimerización de la heparina por la heparinasa 1 es endolítica: da lugar a una mezcla de oligosacáridos insaturados sobre su extremo no reductor. Al final de la reacción, se obtiene una mezcla de disacáridos, de tetrasacáridos y de hexasacáridos. Todas las zonas más sulfatadas de la heparina se escinden y se transforman en disacáridos y en tetrasacáridos. Sólo las partes acetiladas se quedan en forma de hexasacáridos y sobre todo los encadenamientos del tipo -GlcNS(6S ó 6OH)-IdoA-GlcNAc(6S ó 6OH)-GlcA-GlcNS(3S ó 3OH, 6S ó 6OH)-



La despolimerización de la heparina se hace en las condiciones siguientes: 3 g de heparina de mucosidad de cerdo se disuelven en 30 ml de una disolución 0,2M NaCl, 0,02% BSA, Na₂HPO₄ 5 mM ajustada a pH 7. La temperatura de despolimerización es 16°C. Se introducen inicialmente 2UI de heparinasa 1. Al cabo de 7 días, se añade una unidad suplementaria de heparinasa 1. Al cabo de 15 días, se considera alcanzada la despolimerización de la heparina. El seguimiento de la reacción se realiza bien con GPC analítica sobre columna de TSK Super SW 2000 (Figura 1), bien sobre columna de CTA-SAX (Figura 2a). Se puede considerar que la reacción enzimática está suficientemente avanzada cuando la proporción de oligosacáridos de tamaño superior al octasacárido está limitada y cuando los 2 principales hexasacáridos sulfatados $\Delta\text{Is-Is}_{\text{id}}\text{-Is}_{\text{id}}$ y $\Delta\text{Is-Is}_{\text{id}}\text{-II}_{\text{glu}}$ de la mezcla se han despolimerizado a tetrasacáridos. Cuando la reacción enzimática ha terminado, la disolución se filtra sobre membrana de 0,2 μm y se inyecta en 2 veces en una columna de GPC llena de Biogel P10 (Bio Rad) en la que circula una fase móvil de NaCl 0,2N (Figura 3). El hexasacárido $\Delta\text{Is-IIa}_{\text{id}}\text{-II}_{\text{glu}}$ es extremadamente frágil en medio alcalino: pierde su glucosamina terminal 3-O sulfatada y se transforma en pentasacárido $\Delta\text{Is-IIa}_{\text{id}}\text{-GlcA}$ una vez que el pH excede 8. Por lo tanto es muy importante acidificar ligeramente (pH entre 5 y 6) toda la fracción hexasacárida. El cromatograma de la fracción hexasacárida entera se proporciona en la Figura 4.

La última fase consiste en una separación semi-preparativa en columna 25x2,1 cm llena de Hypersil BDS C18 (5 μm) injertada con CTA-SAX (Figura 5). El control de las fracciones se realiza por CLHP (HPLC). Al ser la fase móvil utilizada en cromatografía semi-preparativa una disolución de cloruro de sodio, es necesario hacer un desalado final de la muestra. Éste se realiza en 2 etapas. La primera etapa, que elimina 95% del NaCl, consiste en una re-concentración de las fracciones que contienen el hexasacárido aislado en fase intercambiadora de aniones de Flujo Elevado Q-Sepharosa (Pharmacia) (columna 40 x 2,6 cm) haciéndolas percolar en la columna después de su dilución a 1/10 en agua. El hexasacárido se eluye en un volumen mínimo (aproximadamente 50 ml) con una disolución de NaClO₄ 1,5N para obtener una disolución de perclorato de hexasacárido.

ES 2 325 549 T3

La segunda etapa de desalado final se realiza inyectando la disolución de perclorato de hexasacárido obtenida anteriormente en una columna Sephadex G10 (100 x 7 cm). El seguimiento se realiza por detección UV a 232 nm y por un conductímetro que permite detectar la sal.

- 5 Puede considerarse necesario reiterar esta operación si la calidad de la separación entre el hexasacárido y el perclorato es insuficiente. La disolución de hexasacárido se liofiliza. Se obtienen así 108 mg del hexasacárido $\Delta\text{Is-IIa}_{\text{id}}\text{-II}_{\text{glu}}$ en forma de sal de sodio. La pureza HPLC es de 92% (Figura 6).

10 Ensayos de actividad biológica Heparanasa

La evaluación del Hexa Iso ATIII con relación a su capacidad para inhibir las heparanasas se ha efectuado como sigue:

- 15 El sulfato de heparina/heparán radiomarcado (HS) es degradado por heparanasas, produciéndose fragmentos de HS de bajo peso molecular que pueden medirse por cromatografía por permeación de gel (FPLC) y conteo de las fracciones recogidas por centelleo líquido.

20 La heparina no fraccionada (sal de sodio) de mucosa intestinal de cerdo (calidad Ia, 183 USP/mg) se ha obtenido de Sigma Biochemicals (Deisenhofen, Alemania).

La heparitinasa (HP liasa; (EC 4.2.2.8)) se ha obtenido de Seigaku (Tokio, Japón).

25 TSK 4000 proviene de Toso Haas y las columnas Sepharosa Q equipadas con pre-columnas se han obtenido de Pharmacia/LKB (Freiburg, Alemania).

30 Una línea celular de fibroblastos de útero se ha utilizado para preparar el sulfato de heparán (proteoglicano) marcado con 35-S mediante marcaje metabólico. Se ha mostrado que esta línea celular produce cantidades relativamente importantes de diferentes proteoglicanos de sulfato de heparán (HS-PG = Heparan sulfate proteoglycans), tales como sindecanos y glicoproteína (Drzeniek *et al.*, Blood 93:2884-2897, 1999).

35 El marcaje se realiza por incubación de las células con una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células/ml en presencia de 35-S-sulfato a 33 $\mu\text{Ci/ml}$ en el medio de cultivo tisular durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogen y se añade un inhibidor de proteasa PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride = fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (1 mmol/L). Las HS-PG se purifican por cromatografía de intercambio aniónico en Sepharosa Q, no siendo necesaria la eliminación del sulfato de condroitina y del sulfato de dermatán (proteoglicanos), ya que la muestra contiene una cantidad relativamente importante de proteoglicanos de sulfato de heparán, y también debido a la especificidad de la enzima heparanasa.

40 La heparanasa se ha aislado de leucocitos sanguíneos humanos (human peripheral blood leukocytes = PBL, buffy coats) y se ha enriquecido en células polimorfonucleares (PMN = polymorphonuclear cells) por procedimientos de gradiente de ficoll. La concentración de las PMN aisladas se ajusta a $2,5 \times 10^7$ células/ml y se incuban durante 1 hora a 4°C. Los sobrenadantes que contienen la heparanasa se recogen, el pH se ajusta a 6,2 (20 mM de tampón citrato-fosfato) y se utilizan bien inmediatamente, o bien se guardan congelados en alícuotas a -20°C.

45 Se incuban 200 μl de sulfato de heparán marcado con 35-S (proteoglicanos) ajustados a aproximadamente 2.200 cpm/ml (cpm = cuentas por minuto (counts per minute)) a 37°C durante 18 horas con 1 μl de sobrenadante PMN que contiene la heparanasa. Se muestrean 200 μl de la mezcla obtenida anteriormente en una columna de cromatografía por permeación de gel TSK 4000 (FPLC), las fracciones se recogen y se analizan por medida de centelleo líquido. La degradación se ha medido según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ degradación} = \frac{[\sum \text{cuentas (cpm) frac. 20 - 33 (HEP)} - \sum \text{cuentas (cpm) frac. 20 - 33 (CONT)}]}{[\text{cuentas totales (cpm) frac. 12 - 33 (CONT)}]} \times 100$$

55 Por ejemplo, el porcentaje de degradación se calcula como sigue: la suma de las cuentas (cpm) en las fracciones 20-33 de la muestra después de tratamiento con la heparanasa restado de las cuentas del ruido de fondo (cpm) (fracciones 20-33) de la muestra control, se divide por las cuentas totales (fracciones 12-33) aplicadas a la columna. Se han utilizado factores de corrección para normalizar las cuentas totales de diferentes cromatografías a 2.200 cuentas/cpm. 60 Los resultados se dan en porcentaje de degradación. En los ensayos de inhibición, la degradación de la muestra control (con heparanasa) se ha fijado en 100% (degradación), y los valores de % de inhibición se han calculado sobre esta base. No es necesaria una corrección para la actividad sulfatasa, ya que no ha podido detectarse ninguna actividad sulfatasa.

65 Los inhibidores de la heparanasa siguientes: heparina no fraccionada (UF-H) y Hexa Iso ATIII se han ensayado mediante el protocolo descrito anteriormente a tres concentraciones diferentes. La comparación se ha efectuado sobre una base de masa. Los datos se expresan en porcentaje de inhibición de la actividad heparanasa.

Resultados

En primer lugar, el ensayo heparanasa se ha optimizado para las necesidades de este estudio. Por razones prácticas, el tiempo de incubación en el ensayo de degradación se ha establecido en 18 horas. Según la eficacia del marcaje y el contenido de sulfato de heparán (proteoglicanos), las cuentas totales de sulfato de heparán (proteoglicanos) se ha fijado en aproximadamente 2.200 cpm por muestra, para permitir efectuar todos los ensayos con un lote de sulfato de heparán (proteoglicano). La figura 1a presenta una cromatografía por permeación de gel sobre TSK 4000 de una muestra nativa. La figura 1b presenta el desplazamiento de la distribución molecular de la muestra inducido por la heparanasa. Se determina la cantidad de heparanasa que permite una degradación de aproximadamente 80% de proteoglicano de sulfato de heparán (conteniendo la muestra aproximadamente 35% de proteoglicanos de sulfato de heparán y aproximadamente 65% de proteoglicanos de sulfato de condroitina-/dermatán). Por consiguiente, una degradación en un campo de 10-80% es relativamente lineal y es aceptable para determinar el efecto de los inhibidores. La figura 1c presenta el efecto de la heparina no fraccionada a 1 µg/ml (UFH =UnFractionned Heparin) sobre la actividad heparanasa con una inhibición de 97,3%.

Después de haber determinado las condiciones del ensayo, se ha medido el efecto de la heparina no fraccionada (UFH) procedente de mucosa de intestino de cerdo. La figura 2 presenta una inhibición dependiente de la dosis. A una concentración de 1 µg/ml de heparina no fraccionada (UFH) (concentración final), se ha observado una inhibición casi completa de la actividad heparanasa. La figura 7 presenta la inhibición dependiente de la dosis de Hexa Iso ATIII. Puede concluirse sobre la base de estos datos que el Hexa Iso ATIII presenta una fuerte actividad inhibidora de la heparanasa.

C.R. Parish, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1471 (2001) 99-108

M. Bartlett *et al.*, *Immunol. Cell Biol.* 73 (1995) 113-124

I. Vlodavsky *et al.*, *IMAJ* 2 (2000) 37-45

Y. Matzner, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 76 (1985), 1306-1313

Z. Drzeniek, *et al.*, *Blood* (1999) 2884-2897

Otras fracciones ricas en oligosacáridos pueden aislarse del producto de degradación de la heparina por la heparinasa I. Así, en el caso de los hexasacáridos, una sola purificación cromatográfica CTA-SAX es suficiente. Este método utiliza una columna Hypersil BDS (250 x 20 mm) de partículas de 5 µm, sobre la que se han injertado cadenas cetil trimetil amonio por percolación de una disolución de hidrógenofosfato de cetil trimetil amonio 1 mM en una mezcla agua-metanol (68-32) v/v a 45°C a 2 ml/min durante 4 horas.

La separación se efectúa a temperatura ambiente. Se utiliza un gradiente de elución: el disolvente A es agua ajustada a pH 2,5 por adición de HCl. El disolvente B es una disolución de NaCl 2N ajustada a pH 2,5.

Tiempo (min)	Disolvente A	Disolvente B	Caudal (ml/min)
0	60	40	10
44	0	100	10

La detección es en UV a 232 nm. Se pueden inyectar 100 mg de fracción hexasacárido en cada separación.

La purificación de las fracciones octasacáridas y deca-sacáridas es más compleja que la de las fracciones hexasacáridas. Necesita generalmente una purificación suplementaria en columna IonPac[®]AS11 (250x20 mm) (Dionex). La separación se efectúa a temperatura ambiente. Se utiliza un gradiente de elución. El disolvente A es agua ajustada a pH 3 por adición de ácido perclórico. El disolvente B es una disolución de NaClO₄ 1M ajustada a pH3.

Tiempo (min)	Disolvente A	Disolvente B	Caudal (ml/min)
0	99	1	20
80	40	60	20

La figura 8 permite identificar los productos aislados de las fracciones ricas en oligosacáridos, para cada una de las fracciones hexasacárida, octasacárida y decahexasacárida aisladas por GPC.

Evaluación de la actividad de los inhibidores de heparanasas en un sistema enzimático

La actividad de la heparanasa se pone de manifiesto por su capacidad para degradar el fondaparinux. La concentración de fondaparinux se determina gracias a su actividad anti-factor Xa.

A. Material y métodos

La heparanasa es producida por Sanofi-Synthelabo (Labège, Francia).

Los reactivos de dosificaciones del factor Xa están comercializados por Chromogenix (Montpellier, Francia).

Se mezclan concentraciones crecientes de un compuesto según la invención, inhibidor de heparanasas (diluciones variables: de 1 nM a 10 μ M) a una concentración fija de heparanasa (para cada lote, experimentos preliminares permiten determinar la actividad enzimática suficiente para la degradación de 0,45 μ g/ml de fondaparinux añadido). Después de 5 minutos a 37°C la mezcla se pone en presencia del fondaparinux y se deja 1 hora a 37°C. La reacción se detiene por calentamiento a 95°C durante 5 minutos. La concentración de fondaparinux residual se mide por último por adición de factor Xa y de su sustrato cromógeno específico (Ref. S2222).

Las diferentes mezclas se efectúan según el procedimiento siguiente:

a) Mezcla de reacción

Se mezclan 50 μ l de tampón acetato de sodio (0,2 M, pH 4,2), con 50 μ l de fondaparinux (0,45 μ g/ml) y 59 μ l de una disolución de heparanasa. Se incuba 1 hora a 37°C y 5 minutos a 95°C. Se pasa así de pH 4,2 a pH 7. Se mezclan 100 μ l de la mezcla de reacción con 50 μ l de tampón Tris 50 mM, NaCl 175 mM EDTA 75 mM, pH 14.

La actividad anti-factor Xa del fondaparinux se mide de la forma siguiente:

b) Dosificación de la actividad anti-factor Xa del fondaparinux

Se mezclan 100 μ l de la disolución obtenida en la etapa a) con 100 μ l de AT (0,5 μ g/ml). Se mantiene durante 2 minutos a 37°C y se añaden 100 μ l de factor Xa (7nkat/ml). Se mantiene durante 2 minutos a 37°C y se añaden 100 μ l de sustrato cromogénico (Ref.: S2222) (1 mM). Se mantiene durante 2 minutos a 37°C y se añaden 100 μ l de ácido acético (50%).

La lectura de la densidad óptica se efectúa a 405 nm.

Se determina un porcentaje de inhibición respecto al control sin inhibidor. Una curva de porcentajes de inhibición permite calcular una CI_{50} .

B. Resultados

Producto	Estructura	Concentración (M)	% de inhibición
Hexa Iso ATIII	Δ Is-IIa-IIs	3,00E-5	48,5
(Ia)	Δ Is-IIa-IIs	1,00E-4	53,8
(Ib)	Δ Is-Is-IIa-IIs	1,00E-5	59,9
(Ic)	Δ Is-Is-IIa-IIs	3,00E-6	59,2
(Id)	Δ Is-Is-Ia-IIs	3,00E-5	53,9
(Ie)	Δ Is-Is-Is-IIs	3,00E-5	59,1
(If)	Δ Is-Is-Is-IIa-IIs	3,00E-6	58,4
(Ig)	Δ Is-Is-Is-IIa-IIs	1,00E-4	55,8
(Ih)	Δ Is-Is-Is-Ia-IIs	3,00E-5	55,5
(Ij)	Δ Is-Is-Is-Is-IIs	3,00E-5	48,4
(Im)	Δ Is-Ia-IIs	3,00E-5	54,1
Fracción hexasacárida		3,00E-5	55,8
Fracción octasacárida		3,00E-6	50,7
Fracción decasacárida		3,00E-6	55,6
Producto bruto después de la despolimerización		3,00E-6	53.0

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de despolimerización de un polisacárido con propiedad anti-trombótica, para la obtención de un producto que tiene propiedades anticancerosas, **caracterizado** porque comprende una etapa en la que el polisacárido se despolimeriza por la heparinasa I hasta que su actividad anti-trombótica, debida principalmente a la inhibición de los factores Xa y IIa, es esencialmente anulada (<35 UI/mg) y porque la despolimerización se realiza a una temperatura comprendida entre 10 y 20°C.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polisacárido es una heparina.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado** porque la despolimerización se continúa hasta que la mezcla comprende una fracción hexasacárida esencialmente exenta de hexasacáridos sulfatados $\Delta\text{Is-Is}_{\text{id}}\text{-Is}_{\text{id}}$ y $\Delta\text{Is-Is}_{\text{id}}\text{-IIIs}_{\text{glu}}$.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la despolimerización se continúa hasta alcanzar una masa molecular media inferior a 5.000 Da.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la despolimerización se continúa hasta alcanzar una masa molecular media inferior a 3.000 Da.

6. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende además una etapa en la que el producto de despolimerización del polisacárido se purifica por cromatografía por permeación de gel a un pH inferior a 8 y superior a 5.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque comprende además una etapa de purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la que una fase estacionaria es una fase inversa injertada (i) de C18 y (ii) de cetil trimetil amonio (CTA-SAX).

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque comprende además una etapa de desalado.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa de desalado comprende la utilización de una fase móvil que contiene un electrolito en disolución acuosa, esencialmente transparente entre 200 y 250 nm.

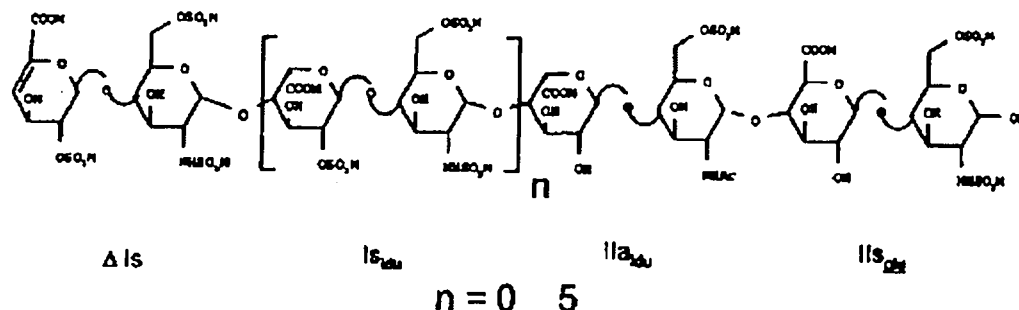
10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el electrolito se elige entre percloratos, metanosulfonatos o fosfatos de metales alcalinos tales como Na.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el desalado se efectúa mediante una resina intercambiadora de aniones, por ejemplo de tipo Sepharosa Q[®].

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizado** porque comprende una segunda etapa de desalado mediante un gel de exclusión molecular, en particular de tipo Sephadex G10[®].

13. Producto obtenido por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Producto de fórmula general (I)



en la que:

R se elige entre H y SO_3M , y

M se elige entre H, Li, Na y K;

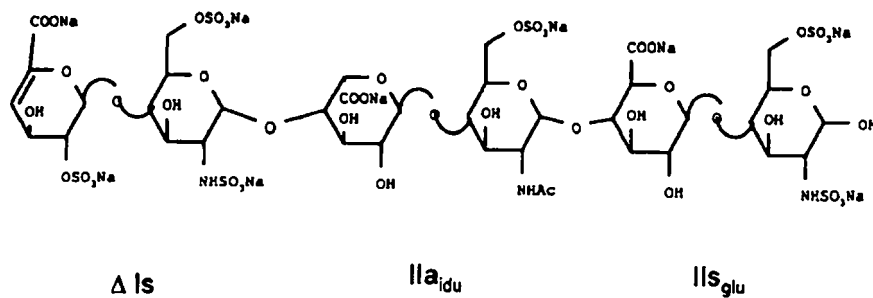
con la excepción del producto para el que $n = 0$, $\text{R} = \text{SO}_3\text{M}$ y $\text{M} = \text{Na}$.

15. Producto según la reivindicación 14, **caracterizado** porque M se elige entre Li, Na y K.

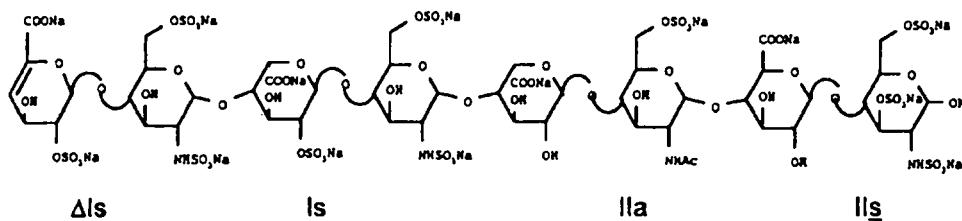
16. Producto según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, **caracterizado** porque n=0.

17. Producto según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, **caracterizado** porque M=Na.

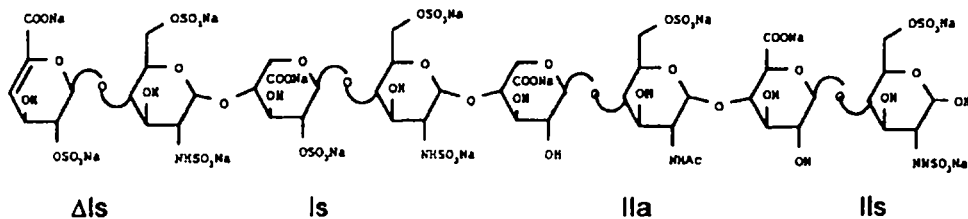
18. Producto según la reivindicación 17, de fórmula (Ia) siguiente:



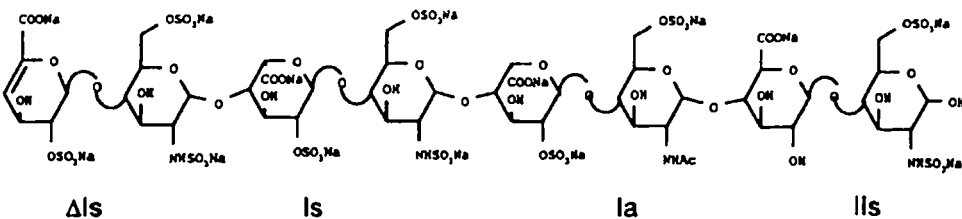
19. Producto según la reivindicación 14, de fórmula (Ib) siguiente:



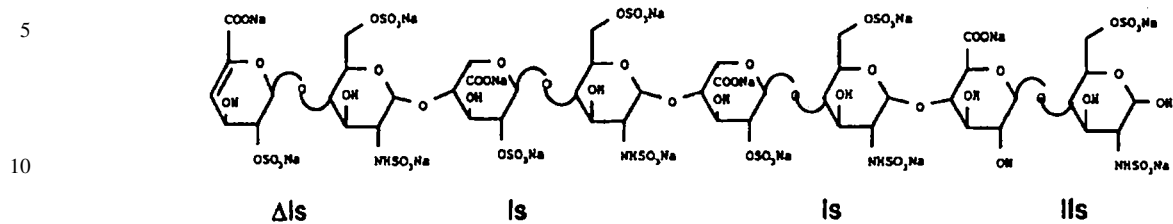
20. Producto según la reivindicación 14, de fórmula (Ic) siguiente:



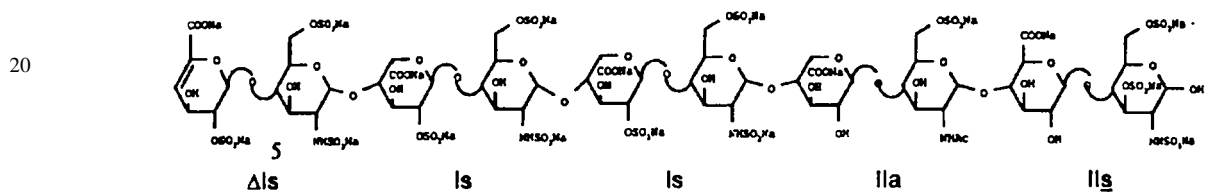
21. Producto de fórmula (Id) siguiente:



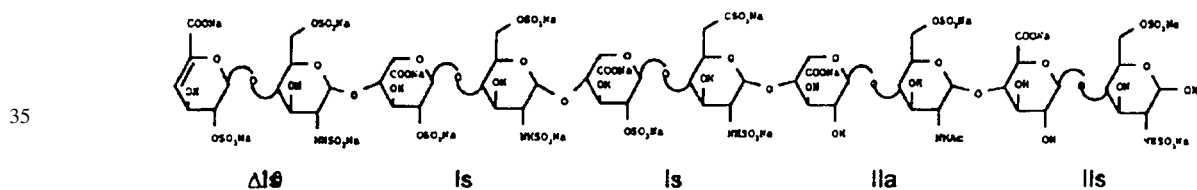
22. Producto de fórmula (Ie) siguiente:



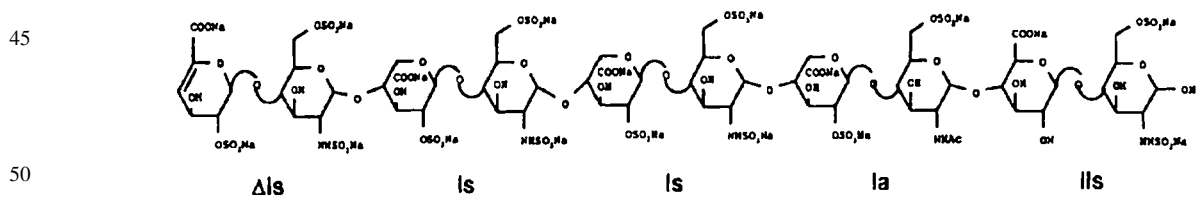
23. Producto según la reivindicación 14, de fórmula (If) siguiente:



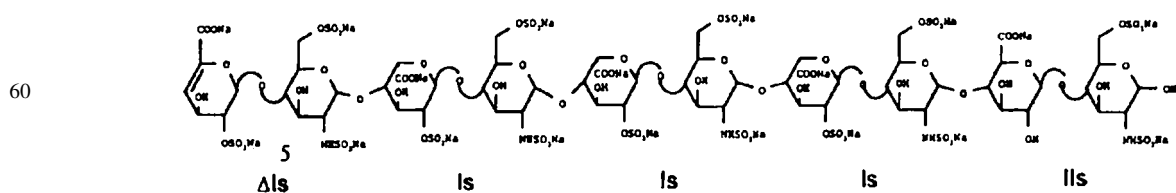
24. Producto según la reivindicación 14, de fórmula (Ig) siguiente:



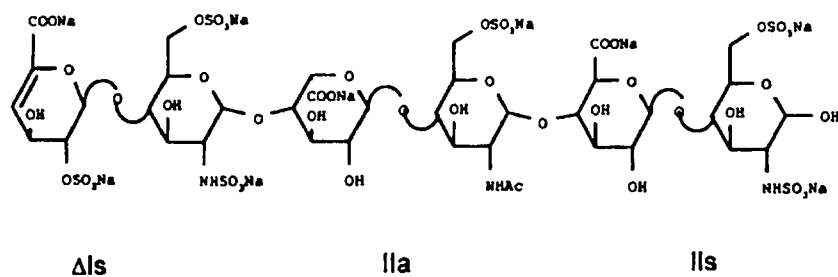
25. Producto de fórmula (Ih) siguiente:



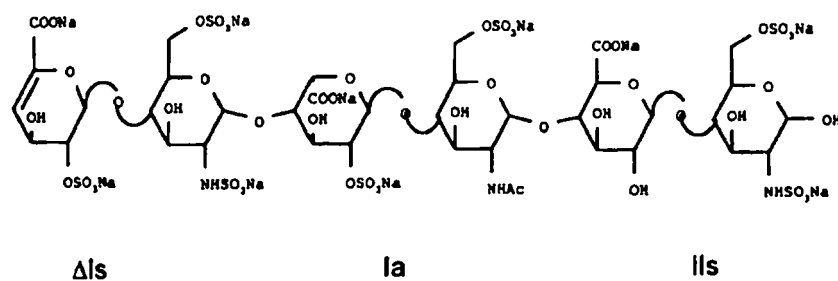
26. Producto de fórmula (Ij) siguiente:



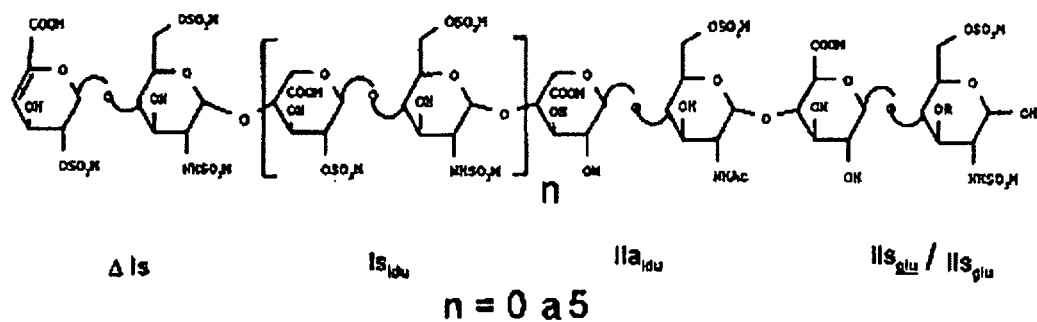
27. Producto según la reivindicación 14, de fórmula (Ik) siguiente:



28. Producto de fórmula (Im) siguiente:



29. Utilización de un producto de fórmula general (I)



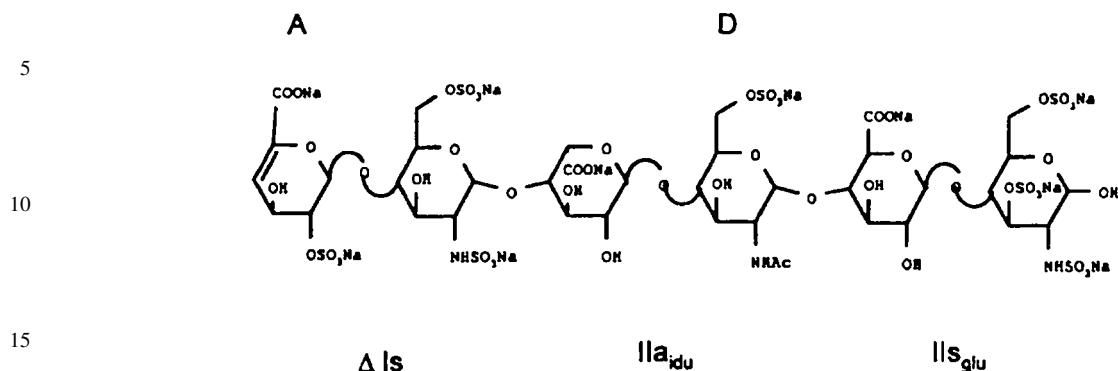
en la que:

R se elige entre H y SO₃M, y

M se elige entre H, Li, Na y K;

como inhibidor de la heparanasa.

30. Utilización de un producto de fórmula general (I) según la reivindicación 29, **caracterizado** porque se trata de:



31. Utilización de un producto de fórmula Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, Ih, Ij, Ik, o Im como inhibidor de la heparanasa.

32. Utilización de un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, para modular una proliferación celular.

33. Utilización de un producto según la reivindicación 32, **caracterizada** porque la proliferación celular está asociada al cáncer.

34. Utilización de un producto según la reivindicación 33, **caracterizada** porque la proliferación celular está asociada a un proceso metastásico.

35. Utilización de un producto según la reivindicación 33 o la reivindicación 34, como agente citostático.

36. Utilización de un producto según la reivindicación 34 o la reivindicación 35, **caracterizada** porque se efectúa en un estadio precoz de la enfermedad.

37. Utilización de un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 36, en combinación con un segundo producto anticanceroso.

38. Utilización de un producto según la reivindicación 37, **caracterizada** porque el segundo producto anticanceroso es citotóxico.

39. Utilización de un producto según la reivindicación 38, **caracterizada** porque el segundo producto anticanceroso se elige entre derivados del platino tales como cisplatino u oxaliplatino, taxoides tales como docetaxel o paclitaxel, derivados de bases púricas o pirimídicas tales como 5-FU, capecitabina o gemcitabina, vincas tales como vincristina o vinblastina, mostazas, heterociclos aromáticos condensados tales como estaurosporina, elipticina o camptotecinas tales como irinotecan, topotecan, combretastatinas tales como CA4P, derivados de la colchicina, tales como fosfato de colchicol.

40. Utilización de un producto según la reivindicación 39, **caracterizada** porque el segundo producto anticanceroso es docetaxel, oxaliplatino o irinotecan.

41. Utilización de un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 40, **caracterizada** porque el cáncer es un cáncer de mama, de pulmón, de próstata, de colon o de páncreas.

Seguimiento GPC de la despolimerización de la heparina por la heparinasa 1

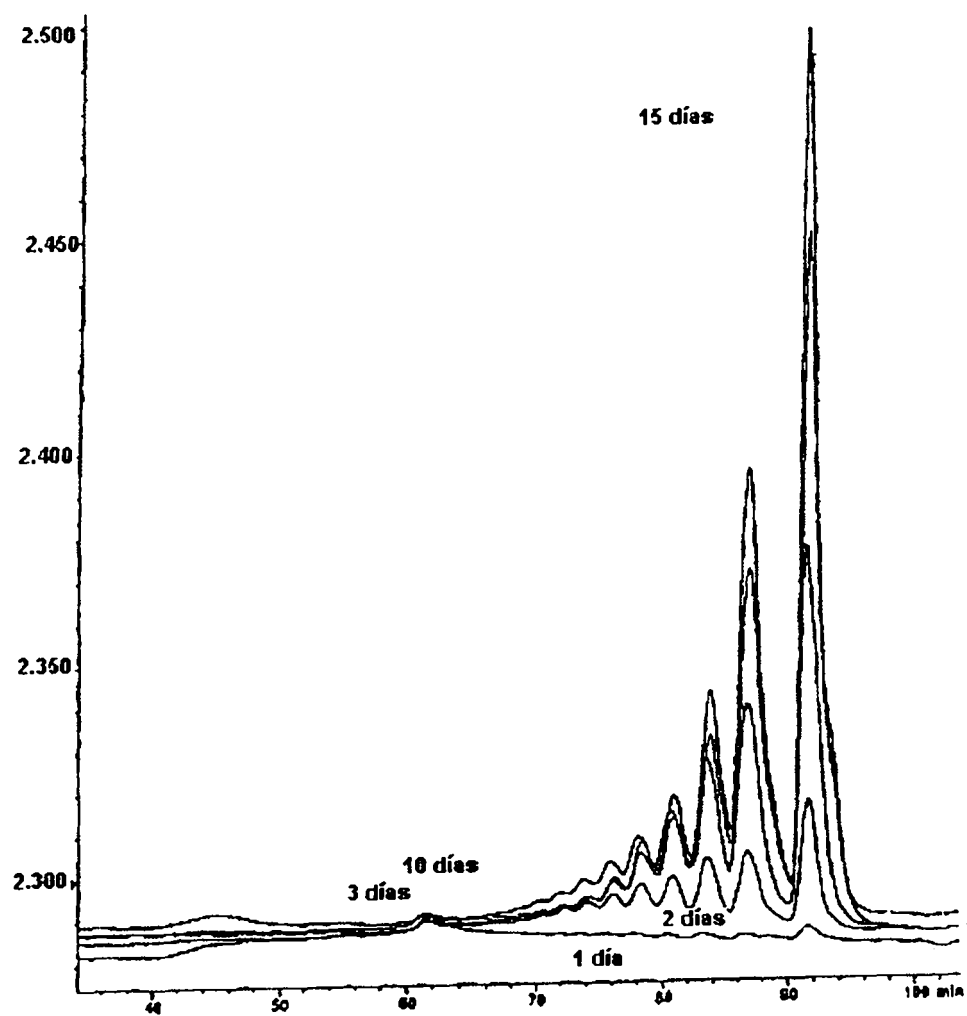


Figura 1

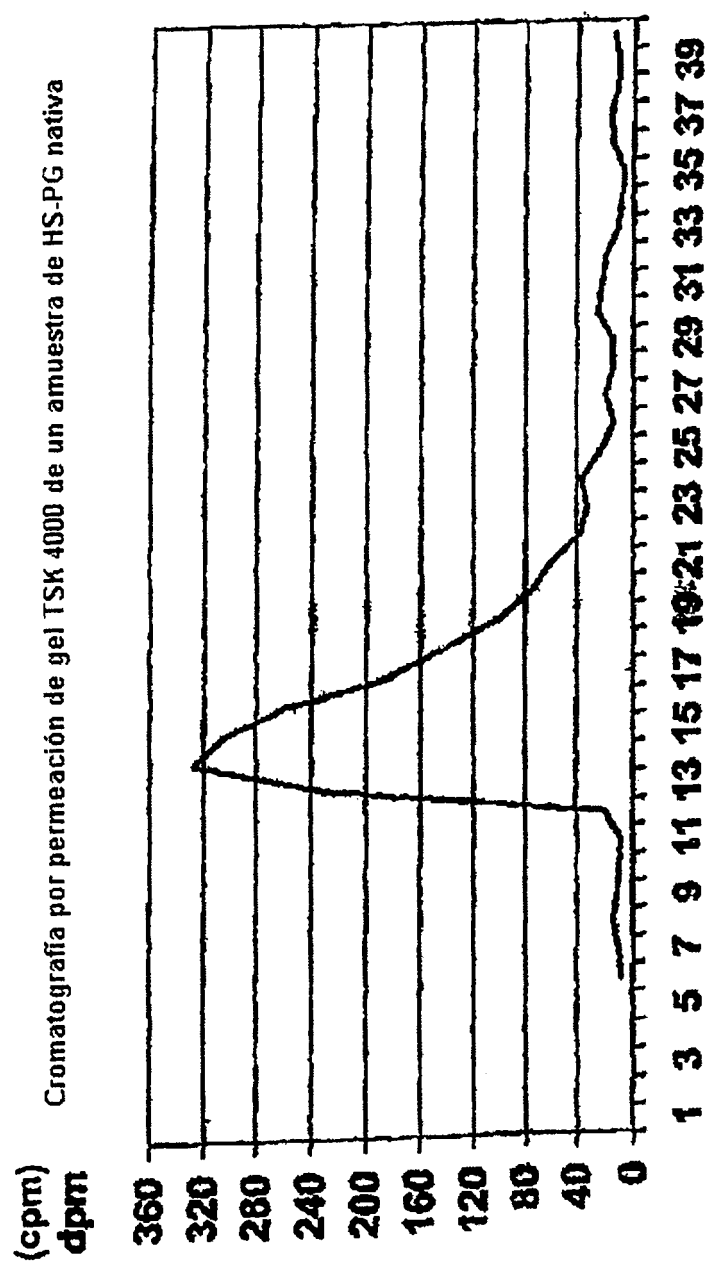


Figura 1a

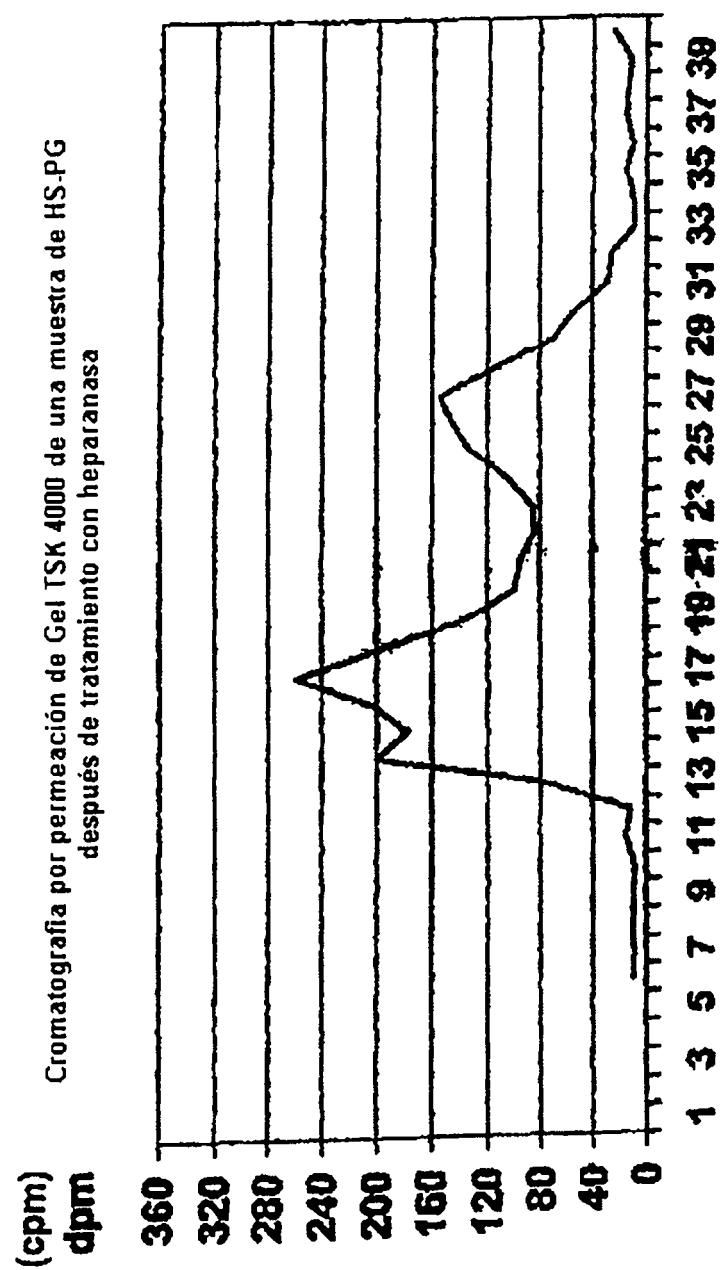


Figura 1b

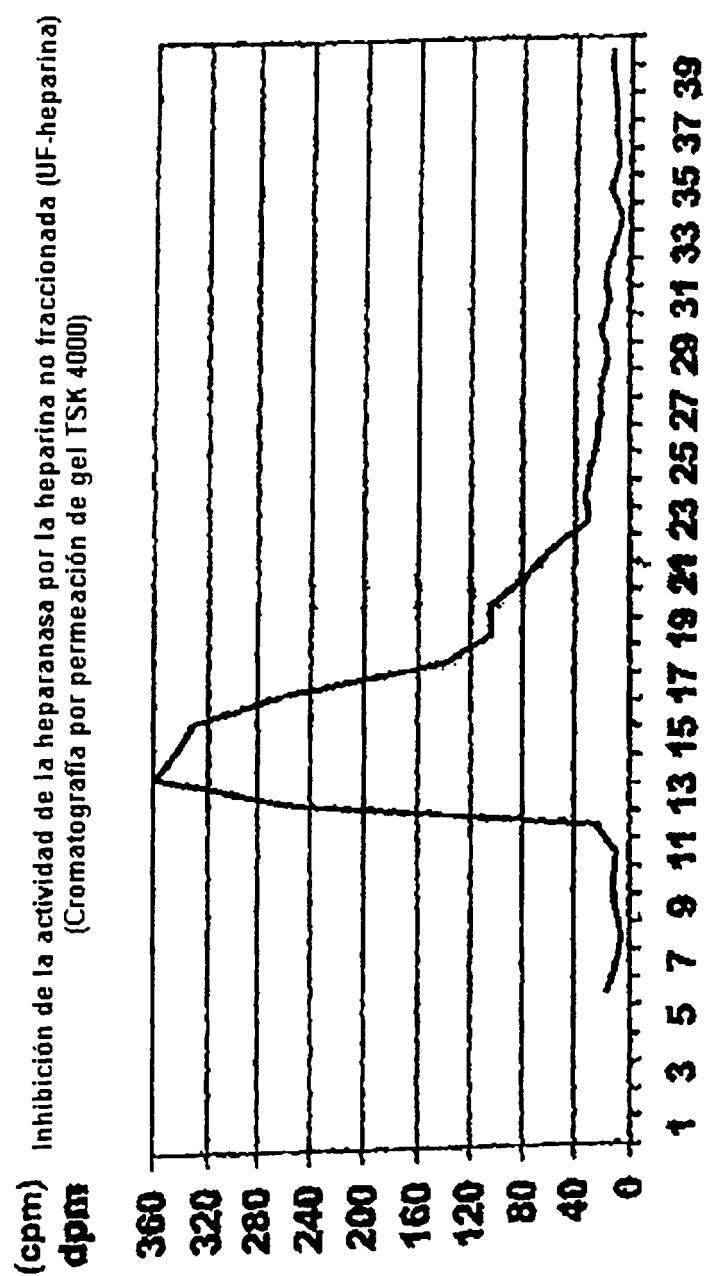


Figura 1c

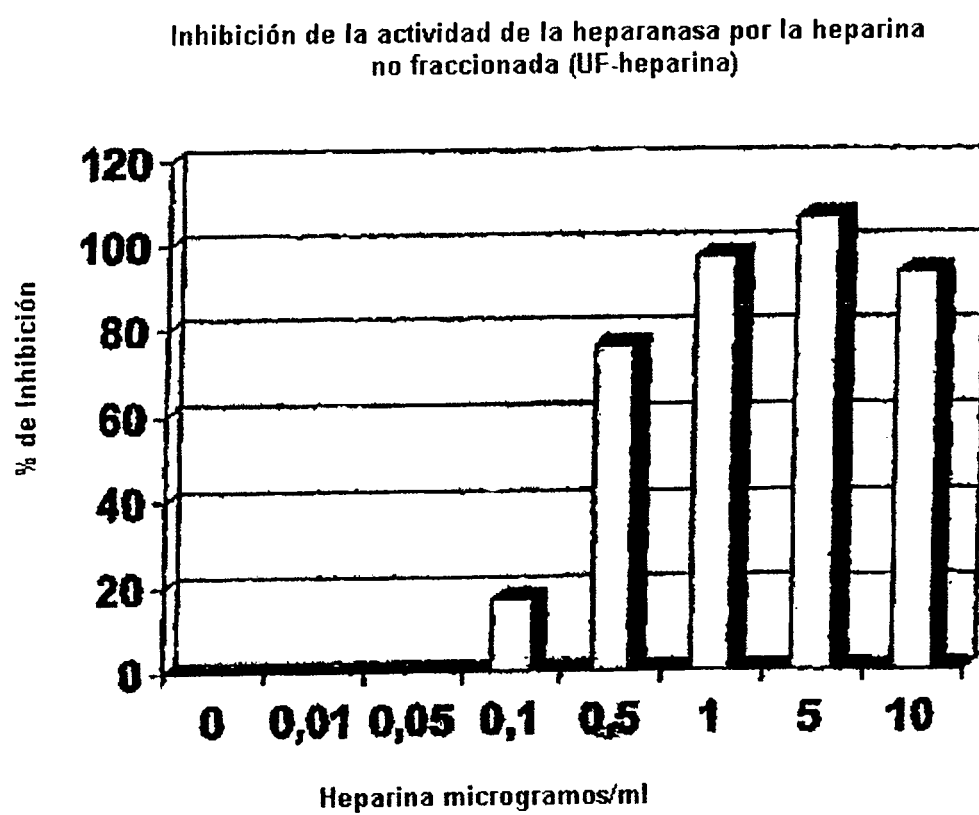


Figura 2

Seguimiento de la despolimerización de la heparina por la heparinasa 1 por CTA-SAX

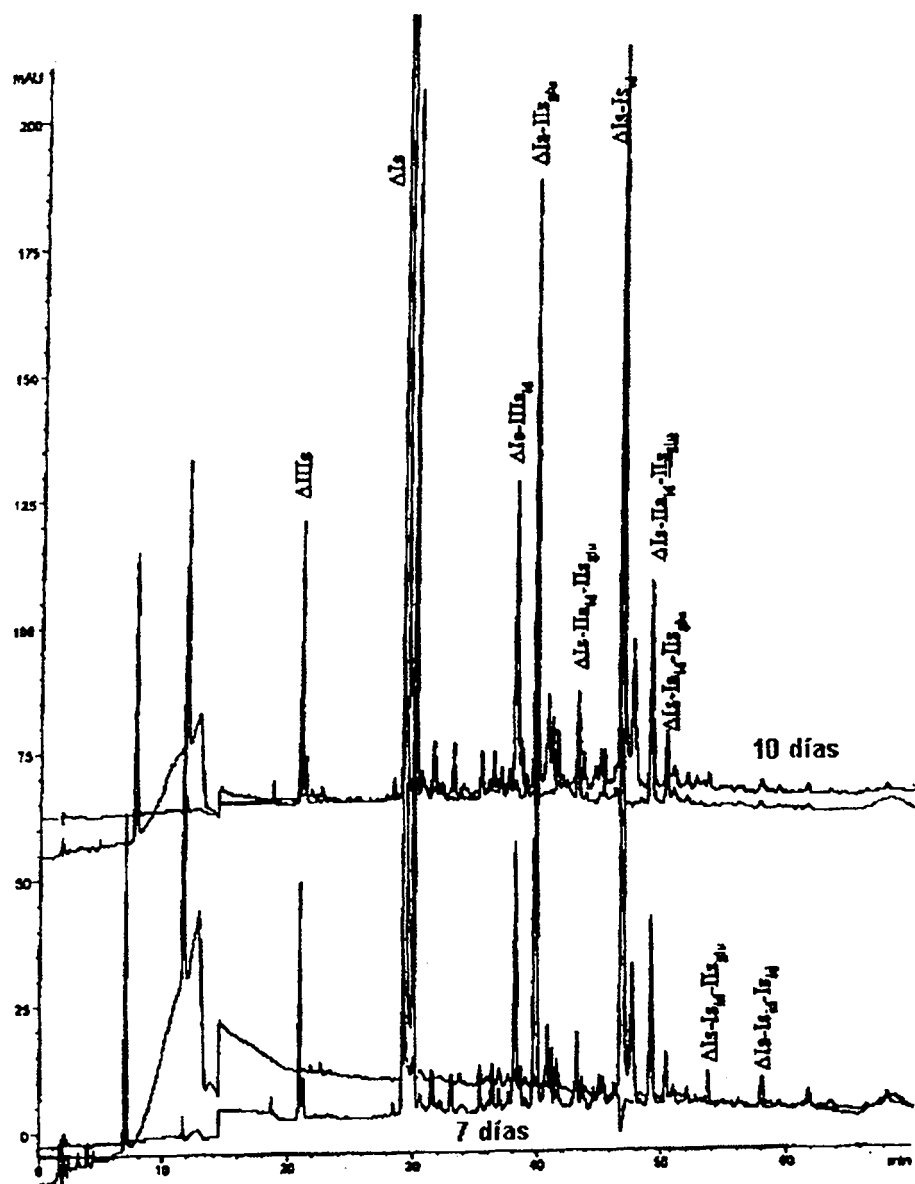
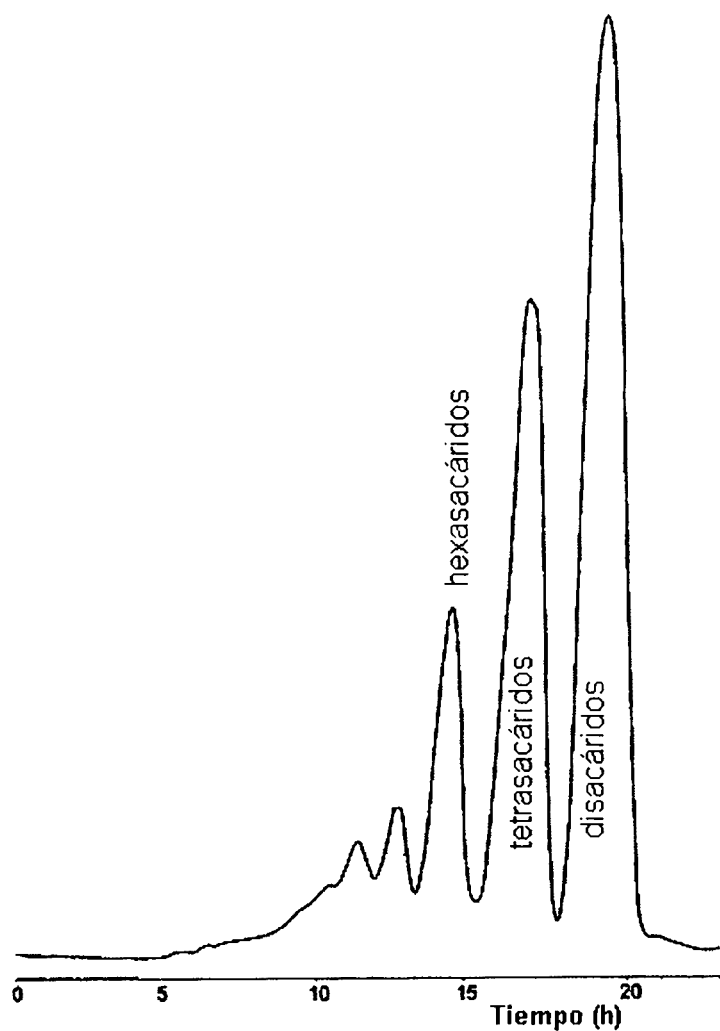


Figura 2a



Fraccionamiento de 2,5g de heparina despolimerizada por GPC (Columna Biogel P10 (100x5cm) ; Fase móvil : NaCl 0,2N ; caudal 80 ml/h ; detección: UV a 250nm. Las señales a 11 y 12 min, se atribuyen respectivamente a las fracciones deca- y octasacáridas.

Figura 3

Cromatograma de la fracción hexasacárida por CTA-SAX

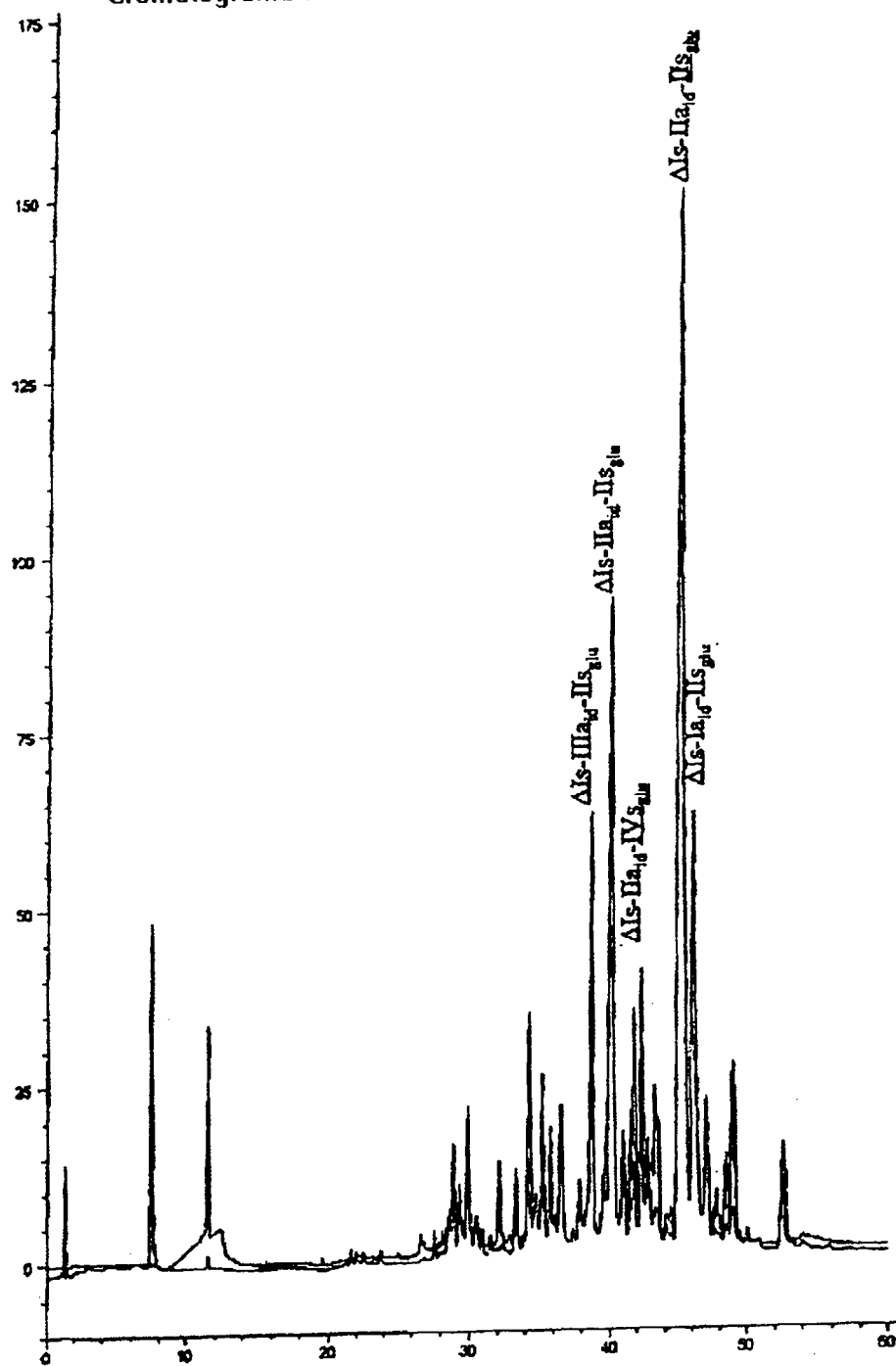


Figura 4

Separación de la fracción hexasacárida por cromatografía semi preparativa en columna CTA-SAX (25 x 2 cm)

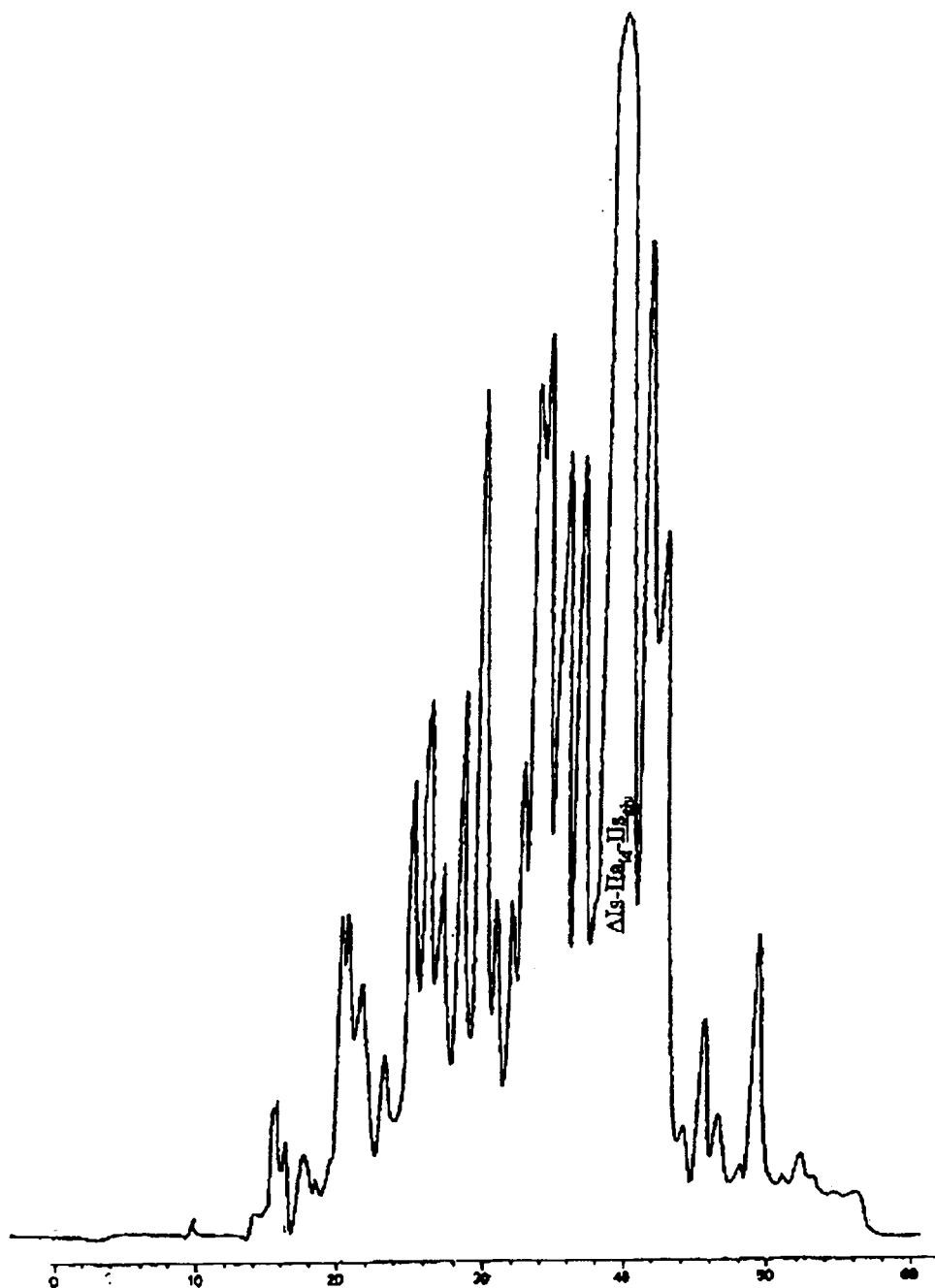


Figura 5

Cromatograma final del hexasacárido $\Delta\text{Is-IIa}_M\text{-IIa}_{\text{du}}$ después de desalado

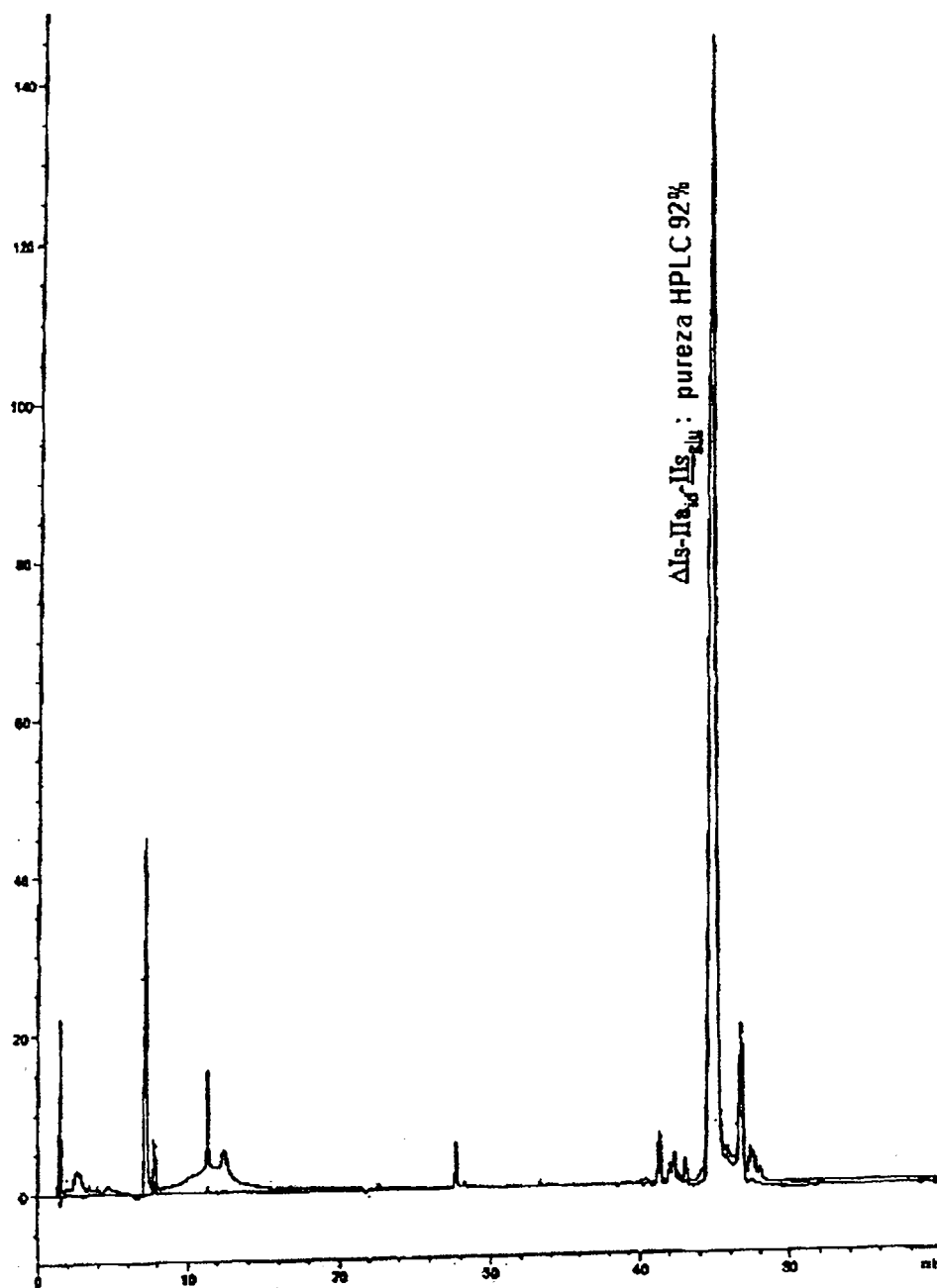


Figura 6

Inhibición de la actividad de la heparanasa en función de la concentración de Hexa ISO ATIII.

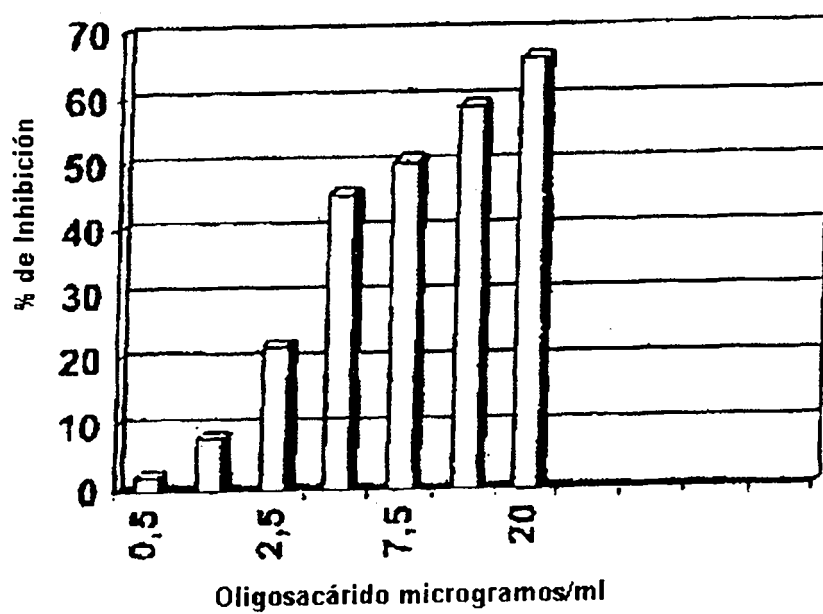
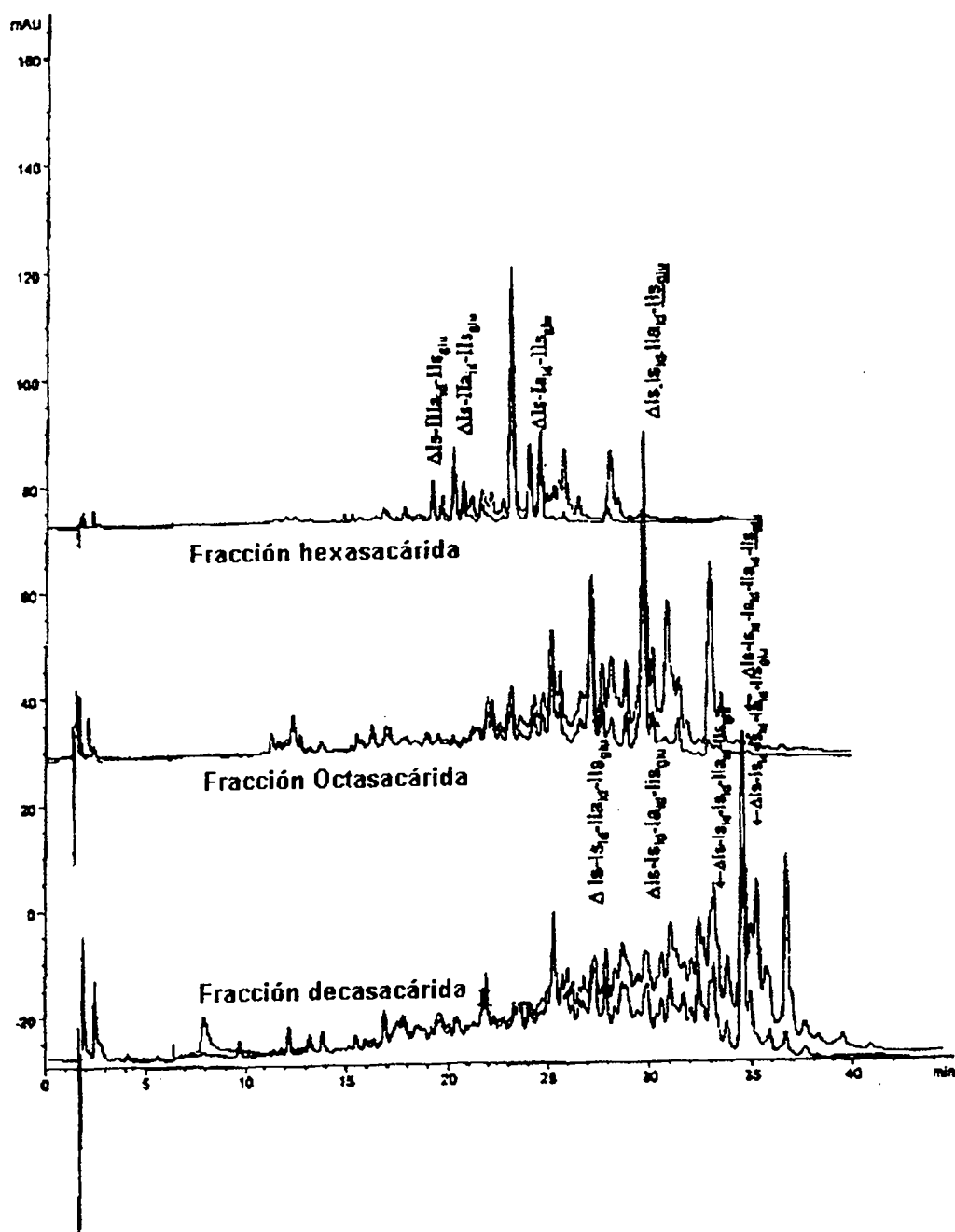


Figura 7



Identificación de los productos aislados de las fracciones ricas en oligosacáridos, para cada una de las fracciones hexasacárida, octasacárida y decasacárida aisladas por GPC.

Figura 8