

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

(22) Data de pedido: **2014.10.22**

(30) Prioridade(s): **2013.11.06 IT LO20130006**

(43) Data de publicação do pedido: **2016.09.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.12.06**
042/2018

(73) Titular(es):

NOVAHEALTH BIOSYSTEMS LLC

700 E. MAIN STREET WAUNAKEE, WI 53597 US

(72) Inventor(es):

ANNAMARIA NAGGI

GIANGIACOMO TORRI

IT

IT

(74) Mandatário:

MARIA DO ROSÁRIO MAY PEREIRA DA CRUZ

AV DUQUE DE ÁVILA, 66, 7º 1050-083 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS CARBOXILADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS E UTILIZAÇÃO COMO FÁRMACOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS, DOTADOS DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE HEPARANASE E ATIVIDADE ANTITUMORAL, QUE PORTAM GRUPOS CARBOXILATO NAS POSIÇÕES 2 E 3 DE PELO MENOS PARTE DOS RESÍDUOS DE GLICOSAMINOGLICANO, E AO PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS MESMOS. OS DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS DA PRESENTE INVENÇÃO SÃO GERADOS PARTINDO DE GLICOSAMINOGLICANOS NATURAIS OU SINTÉTICOS, PREFERENTEMENTE HEPARINA OU HEPARINA DE BAIXA MASSA MOLECULAR, OPCIONALMENTE 2-O- E 2N-DESSULFATADAS ATRAVÉS DE DUAS ETAPAS DE OXIDAÇÃO. ATRAVÉS DA PRIMEIRA OXIDAÇÃO, OS DIÓIS ADJACENTES E, OPCIONALMENTE, OH/NH₂ ADJACENTES DOS RESÍDUOS DE GLICOSAMINOGLICANOS SÃO CONVERTIDOS EM ALDEÍDOS E, ATRAVÉS DA SEGUNDA OXIDAÇÃO, OS DITOS DIALDEÍDOS SÃO CONVERTIDOS EM GRUPOS CARBOXILATO. A PRIMEIRA OXIDAÇÃO CONDUZ, PREFERENTEMENTE, À CLIVAGEM DA LIGAÇÃO C2-C3 DO ANEL DE RESÍDUOS OXIDÁVEIS. A INVENÇÃO REFERE-SE ADICIONALMENTE A UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS DITOS DERIVADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS E, ADICIONALMENTE, À SUA UTILIZAÇÃO COMO INGREDIENTES ATIVOS DE MEDICAMENTOS. ALÉM DISSO, A INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE COMPREENDEM OS DERIVADOS DE HEPARINA DI/TRICARBOXILADA, COMO AGENTE ATIVO.

RESUMO

DERIVADOS CARBOXILADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS E UTILIZAÇÃO COMO FÁRMACOS

A invenção refere-se a derivados de glicosaminoglicanos, dotados de atividade inibitória de heparanase e atividade antitumoral, que portam grupos carboxilato nas posições 2 e 3 de pelo menos parte dos resíduos de glicosaminoglicano, e ao processo para a preparação dos mesmos. Os derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção são gerados partindo de glicosaminoglicanos naturais ou sintéticos, preferentemente heparina ou heparina de baixa massa molecular, opcionalmente 2-O- e 2N-dessulfatadas através de duas etapas de oxidação. Através da primeira oxidação, os dióis adjacentes e, opcionalmente, OH/NH₂ adjacentes dos resíduos de glicosaminoglicanos são convertidos em aldeídos e, através da segunda oxidação, os ditos dialdeídos são convertidos em grupos carboxilato. A primeira oxidação conduz, preferentemente, à clivagem da ligação C2-C3 do anel de resíduos oxidáveis. A invenção refere-se adicionalmente a um processo para a preparação dos ditos derivados de glicosaminoglicanos e, adicionalmente, à sua utilização como ingredientes ativos de medicamentos. Além disso, a invenção refere-se a composições farmacêuticas que compreendem os derivados de heparina di/tricarboxilada, como agente ativo.

DESCRIÇÃO

DERIVADOS CARBOXILADOS DE GLICOSAMINOGLICANOS E UTILIZAÇÃO COMO FÁRMACOS

Sumário

A invenção refere-se a derivados de glicosaminoglicanos, dotados de atividade inibitória de heparanase e atividade antitumoral, que portam grupos carboxilato nas posições 2 e 3 de pelo menos parte dos resíduos de glicosaminoglicano, e ao processo para a preparação dos mesmos.

Os derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção são gerados partindo de glicosaminoglicanos naturais ou sintéticos, opcionalmente modificados quimica ou enzimaticamente. Em particular, os ditos derivados de glicosaminoglicanos são obteníveis através de duas etapas de oxidação do glicosaminoglicano. Através da primeira oxidação (a), preferentemente por periodato, os dióis adjacentes e OH/NH₂ adjacentes dos resíduos de glicosaminoglicanos são convertidos em aldeídos e através da segunda oxidação (b) os ditos dialdeídos são convertidos em grupos carboxilato. De acordo com a presente invenção, preferentemente desde 10 % até 100 %, mais preferentemente desde 25 % até 100 %, de resíduos 2-O-não sulfatados e resíduos 2N-, 3-O-não sulfatados de um glicosaminoglicano são oxidados na primeira etapa de oxidação (a), sob condições eficazes para converter os dióis adjacentes e OH/NH₂ adjacentes em aldeídos.

A primeira oxidação conduz preferentemente à clivagem da ligação C₂-C₃ do anel de resíduos oxidáveis. Preferentemente, o glicosaminoglicano é um glicosaminoglicano natural ou sintético, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatado, tendo um grau de sulfatação (razão molar de SO₃⁻/COO⁻) de desde 0,8 até 2,8, preferentemente de desde 0,9 até 2,5. O grau de

sulfatação (razão molar de $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) é, no presente documento, pretendido conforme determinado por titulação condutométrica de acordo com Casu B. e Gennaro U., 1975, Carbohydr Res 39, 168-176. Os derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados obteníveis através do processo da invenção divulgado acima mostram um incremento de carboxilo de desde 1,2 até 2,2, em que o incremento de carboxilo é calculado como a razão do grau de sulfatação (razão molar de $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) do material de partida para o grau de sulfatação (razão molar de $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) do derivado di/tricarboxilado, determinada por titulação condutométrica como definido no presente documento. Mais especificamente, o grau de sulfatação do glicosaminoglicano de partida é determinado numa amostra do intermediário de glicosaminoglicano obtido através da primeira etapa de oxidação (a), depois da redução por NaBH_4 .

Preferentemente, os derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção são obtidos partindo de heparinas naturais a partir de qualquer fonte orgânica ou animal, ou a partir de heparinas sintéticas, opcionalmente modificadas química ou enzimaticamente. Mais preferentemente, o material de partida é heparina não fracionada, heparinas de baixa massa molecular (LMWHs, que têm uma massa molecular de desde 3.500 a 8.000 Da), sulfato de heparano (HS) ou derivados dos mesmos. Ainda mais preferidos são os derivados de glicosaminoglicanos obteníveis a partir de heparinas não fracionadas ou LMWHs, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados.

A invenção refere-se adicionalmente a um processo para a preparação dos ditos derivados de glicosaminoglicanos e adicionalmente à sua utilização como ingredientes ativos de medicamentos, opcionalmente em combinação com fármacos ou tratamentos estabelecidos conhecidos. Em particular, a presente invenção está direcionada aos ditos derivados de glicosaminoglicanos para utilização como medicamentos para o tratamento de

condições patológicas, como mieloma múltiplo e outras neoplasias (ou seja, sarcomas, carcinomas, neoplasias malignas hematológicas), incluindo as suas formas metastáticas.

Além disso, a invenção refere-se à utilização dos ditos derivados de glicosaminoglicanos em qualquer indicação terapêutica que beneficia da inibição de heparanase (ou seja, nefropatia diabética, doença intestinal inflamatória, colite, artrite, psoríase, sépsis, aterosclerose). A invenção também se refere a composições farmacêuticas que compreendem os ditos derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados, em particular a composições farmacêuticas que compreendem derivados de heparina de baixa massa molecular (LMWH) e heparina di/tricarboxilados, como agente ativo. Opcionalmente, as ditas composições farmacêuticas compreendem adicionalmente pelo menos um agente ativo diferente, preferentemente pelo menos um agente antitumoral diferente.

Antecedentes

O mieloma múltiplo é a segunda neoplasia maligna hematológica mais prevalente e é responsável por mais de 10 % de todos os cânceros hematológicos nos Estados Unidos, com cerca de 20.000 novos casos cada ano e uma mortalidade superior a 50 % (Graham- Rowe D., 2011, Multiple myeloma outlook. Nature 480, s34-s35).

Ao longo dos últimos anos, foram desenvolvidas terapêuticas prometedoras, como a administração de inibidor de proteassoma (Velcade), bifosfonatos e talidomida entre outros. A eficácia destes agentes deve-se, pelo menos em parte, ao seu impacto no microambiente tumoral do mieloma.

Embora tenha sido demonstrada a eficácia dos ditos agentes contra o mieloma, permanece a necessidade de fármacos novos e melhorados para o tratamento do mieloma e outros tumores.

A heparanase é uma endo-p-glucoronidase que cliva o

sulfato de heparano (HS) dos proteoglicanos de HS, como sindecano-1, libertando, desta forma, fatores de crescimento ligados a HS.

Nos seres humanos, parece existir uma única enzima heparanase funcional dominante, capaz de clivar o HS. A heparanase é expressa na maioria dos tumores humanos, onde aumenta, significativamente, ambos os potenciais angiogénico e metastático das células tumorais. Níveis elevados de heparanase foram, de facto, correlacionados com progressão avançada e metástases de muitos tipos de tumor. Por exemplo, um nível elevado de heparanase está associado com um tempo de sobrevivência pós-operativo mais curto dos pacientes. Um papel direto da heparanase nas metástases tumorais foi demonstrado no laboratório de Vlodavsky e Sanderson, onde os inibidores inovadores dos inventores foram testados.

Além das suas funções enzimáticas, que incluem a libertação de fatores de crescimento ligados a HS e degradação da matriz extracelular (MEC), a heparanase também tem uma função não enzimática que pode influenciar o comportamento e microambiente tumoral. O grupo de Sanderson foi pioneiro no estudo da heparanase e sindecano-1 no mieloma, estabelecendo que a heparanase atua como um regulador principal do fenótipo tumoral agressivo no mieloma. Isto ocorre através da promoção da regulação positiva de VEGF e MMP-9 que, em conjunto, estimulam o crescimento tumoral, destruição óssea osteolítica e metastática. Foi, de facto, demonstrado *in vivo* que a heparanase promove o crescimento de tumores de mieloma e metástase espontânea no osso e que a expressão de heparanase pelas células tumorais alimenta uma osteólise desenfreada, pelo menos parcialmente devido à regulação positiva da expressão de RANKL. O efeito de promoção da osteólise da heparanase pode ser de grande importância porque os fatores de crescimento ligados ao osso são libertados quando o osso é degradado. Adicionalmente, os osteoclastos podem libertar fatores de

promoção do crescimento tumoral como HGF. Em conjunto, estes fatores podem ajudar a estabelecer nichos dentro da medula óssea que suportam a migração dirigida de células tumorais e o subsequente crescimento (Fux, L. *et al.*, 2009, "Heparanase: busy at the cell surface." *Trends Biochem Sci*, 34 (10): 511-519; Sanderson R.D. e Yang Y., 2008, "Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment." *Clin Exp Metastasis* 25:149-59; Ilan N. *et al.*, 2006, "Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis." *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 2018-2039). A inibição da heparanase é, assim, um alvo viável da terapêutica de mieloma, suportado pelo facto de que existe uma única heparanase enzimaticamente ativa nos seres humanos e pelo facto de que a sua expressão nos tecidos normais é rara. Além disso, foi mostrado que ratinhos *knock-out* para heparanase são viáveis e não exibem distúrbios visíveis. Isto indica que pouco ou nenhum efeito secundário pode derivar de uma estratégia de inibição de heparanase (Casu B., *et al.* 2008. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 36: 195-203; Vlodavsky I., *et al.* 2007. Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. *Curr Pharm Des*. 13: 2057-2073; Naggi A., *et al.* 2005. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded N-Acetylation, and Glycol Splitting. *J. Biol. Chem*. 280: 12103-12113).

A heparina é um polissacárido sulfatado, polidisperso e linear da família dos glicosaminoglicanos, dotada de atividade anticoagulante e antitrombótica. As cadeias sacarídicas da heparina consistem em ácido urónico e D-glucosamina alternados. A principal unidade de repetição é ácido L-idurónico 2-O-sulfatado (IdoA2S) α (1 $\rightarrow$ 4) e D-glucosamina N-, 6-O-dessulfatada (GlcN6S). Constituintes menores são ácido L-idurónico e

D-glucorónico não sulfatados, juntamente com N-acetil D-glucosamina e D-glucosamina N-, 3-O-, 6-O-trissulfatada (Casu B., 2005. "Structure and active domains of heparin." Em: Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate. Amesterdão: Elsevier. 1-28; Casu B. e Lindahl U., 2001, "Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate." Adv Carbohydr Chem Biochem, 57: 159-206). A heparina, que é estruturalmente semelhante ao HS, pode inibir a heparanase de forma eficiente, mas a sua utilização em doses elevadas numa estratégia de inibição de heparanase é, contudo, impossível devido à sua atividade anticoagulante.

De forma interessante, as heparinas de baixa massa molecular (LMWHs), que são mais biodisponíveis e menos anticoagulantes que a heparina, parecem prolongar a sobrevivência dos pacientes com cancro, provavelmente através do efeito direto sobre o crescimento tumoral e metástase. Isto pode dever-se, pelo menos em parte, à inibição da atividade enzimática da heparanase (Zacharski L.R. e Lee, A.Y. 2008. Heparin as an anticancer therapeutic. Expert Opin Investig Drugs 17:1029-1037).

Inibidores eficazes da atividade enzimática da heparanase foram selecionados na técnica anterior através do estudo da inibição da heparanase por heparinas não anticoagulantes, a maioria das quais contém resíduos de ácido urónico não sulfatados modificados pela abertura do anel glucosídico através da clivagem da ligação entre os carbonos 2 e 3 de um resíduo de glicosaminoglicano (divisão de glicol, *glycol-splitting*). Os ditos inibidores diferem nos seus padrões de O-sulfatação, grau de N-acetilação e divisão de glicol de ambos resíduos de ácido urónico não sulfatados preexistentes e aqueles gerados por 2-O-dessulfatação graduada (Naggi A., 2005. "Glycolsplitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative." Em: Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Amesterdão: Elsevier 461-481; Yang

Y. et al., 2007, "The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy." Blood, 110:2041-2048).

Em particular, os termos "divisão de glicol" (gs, do inglês *glycol split*) referem-se, convencionalmente, a polissacáridos que apresentam a abertura de alguns resíduos de monossacárido devido à quebra (divisão de glicol) de uma ligação entre dois carbonos adjacentes, cada transportando um grupo hidroxilo. Uma primeira geração de heparinas com divisão de glicol, ou seja, as designadas "oxiheparinas reduzidas" (heparinas RO), consistia em blocos polissulfatados não modificados ocasionalmente interrompidos por resíduos com divisão de glicol, correspondendo a resíduos de ácido glucorónico/ácido idurónico não sulfatados que estavam presentes ao longo da cadeia original, primeiramente oxidados em dialdeídos e depois reduzidos a álcoois (Naggi A., 2005, "Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative." Em: Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Amesterdão: Elsevier 461-481).

O documento WO 01/55221 divulga glicosaminoglicanos com um grau de 2-O-dessulfatação não superior a 60 % das unidades de ácido urónico totais. Os ditos glicosaminoglicanos são desprovidos de atividade anticoagulante e mostram uma atividade antiangiogénica com base na inibição de FGFs. Não foi prevista nenhuma atividade para a inibição de heparanase.

O documento US 2008/0051567 divulga um composto que corresponde a uma heparina 100 % N-acetilada e com 25 % de divisão de glicol, exercendo pouca ou nenhuma atividade anticoagulante ou libertação de fatores de crescimento a partir da matriz extracelular. Verificou-se que o dito composto inibe a heparanase, crescimento tumoral, angiogénese e inflamação em modelos animais experimentais, incluindo o modelo de mieloma de Sanderson

(Yang Y. et al. 2007. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. Blood 110:2041-2048).

Coviello T. et al. (2005) "Scleroglucan: A Versatile Polysaccharide for Modified Drug Delivery", Molecules, vol. 10, n.º 1, pp. 6-33, revê a utilização de escleroglucano e alguns derivados, no campo da farmacêutica e, em particular, para a formulação de formas farmacêuticas de libertação modificada.

Claes P. et al. (1969) "Polyacetal carboxylic acids: a new group of antiviral polyanions", Journal of Virology, The American Society for Microbiology, EU, vol. 5, n.º 3, pp. 313-320, descreve a atividade antiviral associada com os ácidos poliacetal carboxílicos.

O documento GB 1295 666 A (08-11-1972) descreve composições farmacêuticas anti-infecciosas para utilização contra agentes que dependem da replicação intracelular, compreendendo polissacáridos oxidados.

O documento WO 01/07486 A1 (01-02-2001) descreve uma composição de policatião biodegradável para administração de uma macromolécula aniônica, compreendendo uma cadeia de polissacáridos.

O documento US 3.679.795 A (25-07-1972) descreve a preparação de ácidos poliacetalcarboxílicos antivirais e dos sais fisiologicamente aceitáveis dos mesmos, os ditos ácidos poliacetalcarboxílicos sendo polissacáridos oxidados.

Lapierre F. et al. (1996) "Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, antigostatic, anti-tumor, and antimetastatic properties", Glycobiology, Oxford University Press, EU, vol. 6, n.º 3, pp. 355-366, descreve as modificações químicas da heparina que diminuem as suas propriedades anticoagulantes mas conservam a sua atividade inibitória da heparanase.

O documento WO 03/022291 A1 (20-03-2003) descreve derivados de glicosaminoglicanos parcialmente

dessulfatados dotados com atividade antiangiogénica e de inibição da heparanase mas desprovidos de atividade anticoagulante.

Apesar disto, permanece a necessidade de proporcionar compostos melhorados com afinidade para heparanase mais elevada, maior seletividade e biodisponibilidade melhorada, sendo adequados para tratar patologias relacionadas com a heparanase, como mieloma e outros tumores.

Breve descrição das figuras

Figura 1: estruturas prevalentes geradas pelo processo da presente invenção. **(1)** unidade dissacarídica de um polímero de glicosaminoglicano compreendendo um ácido urónico (idurónico e/ou glucorónico) e uma glucosamina (2-N-acetilada, 2-N-substituída e/ou 2-N-sulfatada), na qual os grupos hidroxilo (R_3 e R_4) podem, cada um ou ambos, ser substituídos por um grupo sulfato ou não substituídos. **(2, 3, 4)** estruturas representativas (novas entidades) geradas por clivagem oxidativa do anel de resíduos de heparina 2-não sulfatados, seguido por oxidação adicional em resíduos tri ou di-carboxilados.

Figura 2: um exemplo de cromatograma obtido com deteção por MS. A presença de picos correspondendo a oligossacáridos contendo os resíduos di ou tri-carboxilados de ácido urónico, atribuídos pelos valores medidos de massa molecular, estão destacados, respetivamente, pelo código "+ carbox2" ou "+carbox3" no gráfico.

Figura 3: um exemplo de cromatograma obtido com deteção por MS. A presença de picos correspondendo a oligossacáridos contendo os resíduos de di ou tri-carboxilato de ácido urónico, atribuídos pelos valores

medidos de massa molecular, estão destacados, respetivamente, pelo código "+ carbox2" ou "+carbox3" no gráfico.

Descrição da invenção

A presente invenção refere-se a uma inovadora classe de derivados de glicosaminoglicanos quimicamente modificados, dotados de atividade inibitória de heparanase. Em particular, refere-se a derivados de glicosaminoglicanos carboxilados, em que pelo menos parte dos resíduos são resíduos divididos que portam três grupos carboxilato (ou dois se o resíduo dividido é uma glucosamina).

Os derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção são preferentemente derivados de heparina, designados como "heparinas di/tricarboxiladas", que inibem fortemente a atividade da heparanase de degradação do sulfato de heparano. As modificações químicas feitas à heparina, modificando o resíduo de ácido glucorónico incluído no sítio de ligação para ATIII, eliminam a atividade anticoagulante da heparina, permitindo a utilização de doses elevadas.

Os derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção são obteníveis por oxidação, preferentemente por periodato, de resíduos 2-não sulfatados de um glicosaminoglicano sob condições eficazes para converter dióis adjacentes e OH/NH_2 adjacentes dos glicosaminoglicanos em aldeídos, seguido por oxidação do glicosaminoglicano oxidado sob condições para converter os ditos dialdeídos em grupos carboxilato. Em particular, os derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção são preferentemente obteníveis partindo de um glicosaminoglicano tendo um grau de sulfatação razão molar de $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ de desde 0,8 até 2,8, preferentemente de desde 0,9 até 2,5. O grau de sulfatação (razão molar de $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) é pretendido, no presente documento,

conforme determinado por titulação condutométrica de acordo com Casu B. e Gennaro U., 1975, Carbohydr Res 39, 168-176.

Os derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados obteníveis através do processo da invenção divulgado acima mostram um incremento de carboxilo de desde 1,2 até 2,2, em que o dito incremento de carboxilo é calculado como a razão do grau de sulfatação (razão molar de $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) do material de partida, depois da primeira etapa de oxidação, para o grau de sulfatação (razão molar de $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) do derivado di/tricarboxilado, determinada por titulação condutométrica como definido no presente documento. Mais especificamente, O grau de sulfatação do material de partida depois da primeira etapa de oxidação é determinado numa amostra do intermediário de glicosaminoglicano obtido através da primeira etapa de oxidação (a), depois da redução por NaBH_4 .

Preferentemente, os derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção derivam de glicosaminoglicanos naturais ou sintéticos (obtidos química ou enzimaticamente), mais preferentemente de glicosaminoglicanos 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados. Numa forma de realização preferida, o dito glicosaminoglicano natural ou sintético é heparina não fracionada, LMWH ou sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados.

Mais preferentemente os derivados de glicosaminoglicanos derivam de heparinas ou LMWHs naturais ou sintéticas, 2-O-dessulfatadas e, opcionalmente, 2-N-dessulfatadas.

Como um exemplo, as cadeias da heparina podem compreender naturalmente desde cerca de 5 % até 35 % de resíduos de ácido urónico 2-O-não sulfatado, desde 0 % até 50 % de resíduos de glucosamina N-acetilada e desde cerca de 0 % até 6 % de resíduos de glucosamina N-substituídos (nem N-sulfatados, nem N-acetilados). Um

grau de sulfatação diferente depende da fonte de heparina (espécies animais, fontes orgânicas) e dos procedimentos de extração. Cada resíduo 2-O- ou 2-N-não sulfatado de glicosaminoglicanos, não portando substituintes 3-O-sulfato, é suscetível de oxidação com abertura de anel (divisão) e conversão de dióis vicinais e OH/NH₂ em aldeídos. Opcionalmente, a 2-O-dessulfatação graduada dos glicosaminoglicanos de partida permite modular a razão de resíduos divididos de glucosamina/ácido urônico.

A invenção refere-se adicionalmente ao processo para a preparação dos ditos derivados de glicosaminoglicanos carboxilados e ainda à sua utilização como ingredientes ativos de medicamentos para o tratamento de condições patológicas, seja como ingrediente ativo isolado ou em combinação com outros medicamentos. As ditas condições patológicas compreendem mieloma múltiplo e outras doenças neoplásicas, incluindo as suas formas metastáticas. Além disso, a invenção refere-se aos ditos derivados de glicosaminoglicanos carboxilados para utilização em qualquer indicação terapêutica que beneficia da inibição da heparanase. A invenção também se refere a composições farmacêuticas que contêm os ditos derivados de glicosaminoglicanos carboxilados, opcionalmente em combinação com pelo menos um ingrediente ativo adicional.

O processo para a preparação dos derivados de glicosaminoglicanos carboxilados da invenção compreende: oxidação, preferentemente por periodato (ou pela utilização de reagentes de oxidação tendo uma reatividade semelhante), dos resíduos não sulfatados suscetíveis de um glicosaminoglicano, sob condições eficazes para converter dióis adjacentes e OH/NH₂ adjacentes em aldeídos, seguido por oxidação do glicosaminoglicano que resulta da primeira oxidação, sob condições para obter dois novos grupos carboxilato a partir dos grupos aldeído correspondentes.

O processo da presente invenção compreende assim a oxidação, preferentemente por periodato, de 10 % a 100 %,

preferentemente de desde 25 % até 100 %, de resíduos 2-O- e 2-N-, 3-O-não sulfatados de um glicosaminoglicano, sob condições eficazes para converter dióis adjacentes e OH/NH₂ adjacentes em aldeídos; depois compreende a oxidação do glicosaminoglicano oxidado sob condições eficazes para converter os ditos dialdeídos em grupos carboxilato.

Preferentemente, o glicosaminoglicano de partida é um glicosaminoglicano natural ou sintético; mais preferentemente é selecionado a partir de heparina, heparinas de baixa massa molecular ou sulfato de heparano; ainda mais preferentemente é selecionado a partir de heparina e LMWHs, 2-O-dessulfatadas e opcionalmente 2-N-dessulfatadas.

Preferentemente, o glicosaminoglicano de partida tem um grau de sulfatação ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) de desde 0,8 até 2,8, mais preferentemente de desde 0,9 até 2,5, por titulação condutométrica, conforme definido no presente documento.

A primeira oxidação do processo da invenção é preferentemente levada a cabo a um pH de desde 3 até 10, mais preferentemente a um pH de desde 4,5 até 8. Numa forma de realização preferida a primeira oxidação do processo da invenção é levada a cabo a um pH de desde 3 até 5, de modo a clivar apenas a ligação C₂-C₃ dos resíduos de ácido urónico não sulfatados, evitando reações secundárias. Noutra forma de realização preferida, a primeira oxidação do processo da invenção é levada a cabo a um pH de desde 5,5 até 10, de modo a clivar a ligação C₂-C₃ de ambos os resíduos de ácido urónico 2-O-não sulfatados e glucosamina N-não sulfatados.

Numa forma de realização preferida, a primeira oxidação é realizada sob condições para clivar a união entre o C2 e C3 de ambos os ácidos urónicos 2-O-não sulfatados e das glucosaminas 2-N-, 3-O-não sulfatadas.

Opcionalmente, o processo da invenção é realizado na presença de NTA (ácido nitrilotriacético), um agente

quelante e de sequestro utilizado para reduzir a despolimerização, na presença de NaHCO_3 ou piridina, para alcalinizar a solução de reação, ou na presença de MnCl_2 com ou sem NTA. A oxidação do dialdeído adicional é preferentemente realizada utilizando NaClO_2 , ou através da utilização de agentes com propriedades oxidantes comparáveis, como TEMPO (2,2,6,6 Tetra Metil-1-Piperidinil-Oxi).

Preferentemente, os resíduos de ácido urónico carboxilados nos derivados de glicosaminoglicanos da presente invenção são desde 25 % até 100 %, mais preferentemente desde 50 % até 100 %, ainda mais preferentemente desde 60 % até 90 %, dos resíduos totais dos resíduos carboxilados totais do glicosaminoglicano.

Os derivados de glicosaminoglicanos carboxilados obteníveis pelos processos anteriores têm preferentemente uma massa molecular de desde 8000 até 30.000 Da,

dependendo das condições do processo e do glicosaminoglicano de partida empregue. Numa forma de realização preferida, mais preferentemente quando é empregue heparina não fracionada como o glicosaminoglicano de partida, o derivado de glicosaminoglicano carboxilado obtenível pelos processos anteriores tem preferentemente uma massa molecular de desde 3.000 até 20.000 Da, preferentemente desde 3.500 até 12.000 Da.

Os derivados de glicosaminoglicanos inovadores obteníveis através do processo da presente invenção representam uma nova classe de polissacáridos semelhantes a heparina, caracterizados pela presença de resíduos divididos, cada portando dois grupos carboxilato adicionais. Note-se que resíduos que portam um grupo carboxilato natural, são convertidos em resíduos tricarboxilados através do processo da presente invenção. Ditos derivados de glicosaminoglicanos di/tricarboxilados inovadores demonstraram, inesperadamente, ser fortes inibidores de heparanase *in vitro* e inibir o mieloma em

modelos animais.

Os derivados de glicosaminoglicanos que compreendem resíduos que portam dois ou três grupos carboxilato, sendo também menos sulfatados do que o glicosaminoglicano parental, apresentam farmacocinéticas mais favoráveis do que os seus análogos que portam menos grupos carboxílicos.

A presente invenção refere-se adicionalmente aos compostos obteníveis pelos processos anteriores para utilização como medicamentos.

Em particular, a presente invenção refere-se aos compostos obteníveis pelos processos anteriores para utilização como medicamentos antitumorais, preferentemente para utilização como medicamentos antimieloma, seja isoladamente ou em combinação com pelo menos um ingrediente ativo adicional.

Derivados de heparina e heparina de baixa massa molecular preparados de acordo com a presente invenção demonstraram uma inibição eficaz da atividade da heparanase, tanto *in vitro* como *in vivo* num modelo experimental de mieloma múltiplo.

Exemplos

Preparação dos compostos

Amostras de heparinas não fracionadas ou fracionadas, dotadas de um grau de sulfatação ($\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$) diferente por titulação condutométrica, foram submetidas a oxidação com periodato (para dar unidades de dialdeído divididas), realizada por modificação de métodos conhecidos. A 2-O-dessulfatação graduada de heparinas não fracionadas (UFH) foi realizada seguindo a modificação de métodos conhecidos (Jaseja M. *et al.*, 1989, "Novel regio- and stereo-selective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence." *Canad J Chem*, 67, 1449-1455; R.N. Rej e A.S.

Perlin, 1990, "Base-catalyzed conversion of the α -L-iduronic acid 2-sulfate unit of heparin into a unit of α -L-galacturonic acid and related reactions." Carbohydr. Res. 200, 25, 437-447; Casu B. et al., 2004, "Undersulfated and Glycol-Split Heparins Endowed with Antiangiogenic Activity." J. Med. Chem., 47, 838-848). Sob condições básicas, unidades de ácido L-idurônico 2-O-dessulfatadas (induzidas natural ou quimicamente) são convertidas em derivados de 2,3-epóxi e, finalmente, em unidades de ácido L-galacturônico. Os dialdeídos originados a partir das unidades de ácido urônico e, opcionalmente, de glucosaminas, são preferentemente, e dentro de um curto período de tempo, adicionalmente oxidados em dicarboxilatos.

Testagem *in vitro*

Com base em estudos anteriores de Bisio et al. (Bisio A. et al. 2007, High-performance liquid chromatographic /mass spectrometric studies on the susceptibility of heparin specie to cleavage by heparanase. Sem Thromb hemost 33 488-495), a atividade de inibição de heparanase foi determinada *in vitro* pelo grupo do Prof. Vlodavsky na Universidade de Haifa, Israel, de acordo com o método descrito por Hammond et al., (Hammond et al. 2010, Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening. Anal Biochem. 396, 112-6). Resumidamente, a heparanase pode clivar o pentassacárido sintético Fondaparinux, que é um fármaco antitrombótico, que corresponde estruturalmente ao sítio de ligação à antitrombina da heparina. Depois da clivagem da heparanase, são obtidos um trissacárido e um dissacárido redutor. O último pode ser facilmente quantificado de modo a avaliar a atividade da heparanase. Nos presentes exemplos, a solução de ensaio (100 μ l) compreendia tampão acetato de sódio a 40 mM, pH 5,0 e

Fondaparinux a 100 mM (GlaxoSmithKline), com ou sem amostra inibidora. A heparanase foi adicionada até uma concentração final de 140 pM para iniciar o ensaio. As placas foram seladas com fita adesiva e incubadas a 37 °C durante 2-24 horas. O ensaio foi interrompido pela adição de 100 µl de uma solução de dissulfonato de 4-[3-(4-iodofenil)-1H-5 tetrazolio]-1,3-benzeno a 1,69 mM (WST-1, Aspep, Melbourne, Austrália) em NaOH a 0,1 M. As placas foram seladas novamente com fita adesiva e desenvolvidas a 60 °C durante 60 min. A absorvância foi medida a 584 nm (Fluostar, BMG, Labtech). Em cada placa, foi preparada uma curva padrão, construída com D-galactose como o padrão de açúcar redutor, no mesmo tampão e volume ao longo do intervalo de 2 a 100 µM. Foi determinado o valor de CI_{50} . Dado que este ensaio tem um substrato homogêneo com um único ponto de clivagem, os parâmetros cinéticos e bioquímicos da enzima podem ser caracterizados de forma fiável. Os resultados obtidos, utilizando o ensaio colorimétrico descrito acima, foram validados utilizando matriz extracelular (MEC) marcada com sulfato como substrato. Resumidamente, o substrato de MEC é depositado por células endoteliais corneanas cultivadas e, portanto, é muito semelhante à membrana basal subendotelial na sua composição, função biológica e propriedades de barreira. Informações detalhadas sobre a preparação de MEC marcada com sulfato e a sua utilização para o ensaio de heparanase podem ser encontradas em: Vlodavsky, I., Current Protocols in Cell Biology, Capítulo 10: Unidade 10.4, 2001. O ensaio é altamente sensível, é o que melhor se assemelha às condições *in vivo*, mas, devido à sua natureza biológica, é semiquantitativo e limitado em termos de parâmetros bioquímicos.

Testagem *in vivo*

A atividade antimiéloma *in vivo* foi testada substancialmente seguindo o procedimento descrito em Yang

Y *et al.* (Yang Y., *et al.* 2007, The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood* 110:2041-2048). Resumidamente, ratinhos scid/scid CB17 com 5 a 6 semanas de idade foram obtidos de Arlan (Indianapolis, IN) ou Charles River Laboratories (EUA). Os ratinhos foram alojados e monitorizados na instalação animal da Universidade de Alabama em Birmingham. Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Utilização e Cuidado Animal. 1×10^6 células de mieloma CAG que expressam heparanase (de alta ou baixa expressão) foram injetadas por via subcutânea no flanco esquerdo de cada ratinho. 10 dias depois da injeção das células tumorais, os ratinhos foram implantados com bombas osmóticas Alzet (Durect Corporation, Cupertino, CA) no flanco direito. As bombas continham solução de compostos de teste (novos derivados de heparina) ou PBS como controle. A solução foi administrada continuamente durante 14 dias. Após 14 dias, os animais foram sacrificados e o peso húmido dos tumores subcutâneos e o nível capa sérico médio foram avaliados e comparados entre os grupos experimentais pelo teste log-rank ($p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo).

A obtenção semanal de imagens por bioluminescência de luciferase proporciona dados quantitativos sobre os tumores primários e rastreia as metástases dentro do osso, tal como tecidos moles. De forma notável, o modelo SCID-hu é único no sentido em que as células tumorais humanas são injetadas diretamente em pedaços pequenos de osso fetal humano implantado subcutaneamente em ratinhos SCID, recapitulando, assim, o mieloma humano de forma muito aproximada.

Procedimento geral de análise de RMN

Os espectros foram registados a 25 °C num espectrómetro Bruker Avance 500 (Karlsruhe, Alemanha)

equipado com uma criossonda TCI de 5 mm ou com uma sonda BBO de 10 mm. A integração dos volumes de pico nos espectros foi feita utilizando software padrão TopSpin 2.0 da Bruker. A estrutura dos resíduos de ácido urónico dicarboxilados foi determinada por experiências heteronucleares bidimensionais que confirmaram a presença dos resíduos de tricarboxilato e permitiu a identificação do seu desvio químico. No quadro abaixo, são relatados os desvios químicos atribuídos de prótons e carbonos na posição 1, 4, 5 do resíduo dicarboxilado, de glucosamina e ácido idurónico 2-O-sulfatado.

Sinais correspondentes à posição de resíduos	¹H ppm	¹³C ppm
C5-Ácido urónico gsox	4,97	81,65
C4-Ácido urónico gsox	4,59	81,22
C1-Ácido urónico gsox	5,01	103,71
C4	3,63	79,14
C1-Glucosamina NS (ANS)	5,40	99,17
C1-ANS ligada a (gsox)	5,03	100,19
C1-Ácido idurónico 2S	5,17	102,11

Procedimento geral para o cálculo do incremento de grupos carboxilo

O aumento dos grupos carboxilo nos resíduos de ácido urónico de derivados de heparina dicarboxilada foi calculado partindo dos respetivos valores de razão molar $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ do material de partida (heparina não fracionada ou LMWHS e heparinas pelo menos parcialmente dessulfatadas) e dos derivados dicarboxilados, avaliados por titulação condutométrica (Casu B. e Gennaro U., 1975, Carbohydr Res 39, 168-176). Em particular, o grau de sulfatação do material de partida é determinado depois da primeira etapa de oxidação, numa amostra reduzida do intermediário oxidado de glicosaminoglicano (vejam-se os exemplos 4-7), enquanto o grau de sulfatação do derivado

carboxilado de glicosaminoglicano final é determinado depois da segunda etapa de oxidação (vejam-se os exemplos 8-11, 13-14).

$\text{SO}_3^- / \text{CO}_2^- = A$ (razão nos materiais de partida)

$\text{SO}_3^- / \text{CO}_2^- = B$ (razão nos derivados dicarboxilados)

Dado que o número de grupos sulfato não se altera durante as duas etapas de oxidação, pode concluir-se que o aumento dos grupos carboxilados (CO_2^- (derivados dicarboxilados) / CO_2^- (materiais de partida)) é igual à razão das razões molares individuais A e B.

$$\text{Incremento de carboxilo (I.C.)} = A/B = \frac{\text{CO}_2^- \text{ (derivados dicarboxilados)}}{\text{CO}_2^- \text{ (materiais de partida)}}^*$$

Clivagem enzimática de heparinas e dos seus derivados carboxilados e análise de HPLC/MS

O substrato (2-3 mg) foi dissolvido numa mistura a 1:1 (v/v) de tampão acetato de sódio a 100 mM (pH 7,0) e acetato de cálcio a 10 mM para obter uma solução a 7,7 mg/ml. Para levar a cabo a clivagem enzimática, 144 µl da mistura de acetato de sódio a 100 mM e acetato de cálcio a 10 mM (1:1) e 3 µl da mistura de heparinases (heparina liases I, II e III) (1 µl de cada liase, solução enzimática a 2 mU/µl) foram adicionados a 13 µl da solução de heparina. A mistura de reação foi agitada a 37 °C (Thermo-Shaker TS-100, Biosan) durante 24 h. A reação foi interrompida pela adição de 3 µl de HCOOH a 3 %. Cada amostra foi diluída duas vezes com água e analisada por IPRP-HPLC/ESI-TOF (microTOF-Q, Bruker). Uma kinetex C18 e um gradiente (0'-17 % B, 15'-20 % B, 55'-40 % B, 100' 50 % B, 115' 90 % B) utilizando a fase A (pH 6,25) e B (pH 7,95) com DBA-CH₃COOH a 10 mM foi utilizado com uma

taxa de fluxo de 100 µl/min.

EXEMPLO 1 (G7669)

Uma amostra de UFH (2,5 g de lot. G5842) em NaOH a 1 M (32 ml) foi aquecida a 60 °C durante 30 min. Depois do arrefecimento à temperatura ambiente e neutralização com HCl a 2 N, a solução foi submetida a diálise à temperatura ambiente durante 3 dias contra água destilada em membranas (limiar: 3500 Da). A concentração sob pressão reduzida e secagem por congelamento deu: 2,15 g (rendimento=80 % p/p) de um intermediário com 13 % dos resíduos de ácido urónico totais portando um grupo epóxido conforme determinado por ^{13}C -RMN. A amostra foi depois dissolvida em água (32 ml) e mantida sob agitação a 70 °C durante 2 dias, de modo a hidrolisar os grupos epóxi. G7669 foi obtido depois da concentração e secagem por congelamento.

EXEMPLO 2 (G8661)

Uma amostra de UFH (2,11 g de lot. G3378) em 27 ml de NaOH a 1 N foi agitada a 60 °C durante 30 min. A neutralização, arrefecimento à temperatura ambiente e diálise, concentração e secagem por congelamento (como descrito no Exemplo 1) deram o intermediário G8637 (1,5 g). Uma vez que o seu espectro de ^{13}C -RMN indicou a presença de grupos epóxi, G8637 (1,5 g) foi dissolvido em água (32 ml) e mantido sob agitação a 70 °C durante 2 dias, de modo a hidrolisar os grupos epóxi. G8661 foi obtido (1,5 g) depois da concentração e secagem por congelamento.

EXEMPLO 3 (G8699)

Uma amostra de UFH (2,01 g de lot. G3378) foi processada como descrito no Exemplo 2 para dar o derivado

intermediário contendo epóxi G8638. Uma amostra de G8638 (1,4 g) foi dissolvida em água (32 ml) e aquecida sob agitação a 70 °C durante 24 horas, para dar, depois da concentração e secagem por congelamento, 1,3 g de G8699.

OXIDAÇÃO POR PERIODATO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA E DERIVADOS 2-O-DESSULFATADOS

EXEMPLO 4 (G7731)

Partindo da amostra G7669 do Exemplo 1 (1,8 g, 13 % de 2-O-dessulfatação) em água (52 ml), a solução foi arrefecida a 4 °C, agitada no escuro e foram adicionados 52 ml de NaIO₄ a 0,2 M. Após 16 horas, o excesso de periodato foi extinto pela adição de etilenoglicol (5,2 ml) e depois de 1 h a 4 °C a mistura de reação foi dessalinizada por diálise a 4 °C durante 16 horas. Depois da concentração sob pressão reduzida e secagem por congelamento, foi obtido o G7731 portando dialdeído (1,5 g), rendimento = 83 %. Uma pequena porção de amostra foi reduzida com NaBH₄ para medir MW = 8.242 Da e SO₃⁻/COO⁻ = 2,46, por titulação condutométrica.

EXEMPLO 5 (G8425)

Partindo de uma amostra de UFH (0,25 g, lot. G3378) e seguindo o mesmo procedimento descrito no Exemplo 4, foi obtido o G8425 portando dialdeído (0,24 g), rendimento = 96 % p/p.

EXEMPLO 6 (G8678)

Partindo de uma amostra de G8661 do Exemplo 2 (1,5 g) e realizando o mesmo procedimento descrito no Exemplo 4, foi obtido o G8678 portando dialdeído (1,5 g). Uma pequena porção de amostra foi reduzida com NaBH₄ para medir SO₃⁻/COO⁻ = 1,96 por titulação condutométrica.

EXEMPLO 7 (G8710)

Partindo de uma amostra de G8699 do Exemplo 3 (0,56 g) e seguindo o mesmo procedimento descrito no Exemplo 4, foi obtido o G8710 portando dialdeído (0,56 g). Uma pequena porção de amostra foi reduzida com NaBH_4 para medir $\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1,51$ por titulação condutométrica.

OXIDAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DE ÁCIDO URÔNICO DIALDEÍDICO
NOS DICARBOXILATOS CORRESPONDENTESEXEMPLO 8 (G7927)

Uma amostra de G7731 do Exemplo 4 (0,3 g) foi dissolvida em água (29 ml), arrefecida a 0 °C num balão de fundo redondo de dois gargalos e, sob agitação em atmosfera de azoto, foi tratada com uma solução aquosa (6 ml) contendo NaClO_2 (0,362 g). Depois de uma adição gota a gota de ácido acético glacial (0,118 ml) até alcançar pH 4,0, a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. Depois de 3 horas adicionais sob agitação à temperatura ambiente, por fluxo de N_2 , foi obtida uma solução incolor. A mistura de reação foi neutralizada com NaOH a 0,5 N e dessalinizada por diálise como descrito no Exemplo 4. A concentração e secagem por congelamento deu G7927 (0,228 g), rendimento=76 % p/p, tendo:

MW = 6.450 Da;

$\text{SO}_3^-/\text{COO}^- = 1,23$;

Incremento de carboxilo (I.C.) = 2

A análise de inibição de heparanase *in vitro* deu:

$\text{CI}_{50} = 10 \text{ ng/ml}$.

EXEMPLO 9 (G8437)

Partindo de uma amostra de G8425 do Exemplo 5 (0,25 g), na qual apenas os ácidos urónicos não sulfatados naturalmente presentes na cadeia da heparina (18 %) foram

oxidados seguindo o mesmo procedimento descrito no exemplo 8, G8437 (0,21 g) foi obtido através da redução do fluxo de N₂ a 1,5 horas antes da neutralização da mistura de reação, tendo:

MW = 12.100 Da;

SO₃⁻/COO⁻ = 1,62;

Incremento de carboxilo (I.C.): 1,43.

A análise de inibição de heparanase *in vitro* deu:

CI₅₀ = 10 ng/ml.

EXEMPLO 10 (G8767)

Partindo de amostras de G8678 do Exemplo 6 (1 g) e seguindo o procedimento descrito no Exemplo 8, foi obtido G8767 (1,05 g), tendo:

MW= 8.800 Da;

SO₃⁻/COO⁻ = 1,27;

Incremento de carboxilo (I.C.) = 1,55.

Análise de atividade antimieloma *in vivo* (60 mg/kg dia durante 14 dias) deu: 52 % de inibição tumoral e 20 % de inibição de K sérico.

EXEMPLO 11 (G8733)

Partindo da amostra G8710 do Exemplo 7 (0,56 g) e seguindo o mesmo procedimento descrito no Exemplo 8, foi obtido G8733 (0,453 g), rendimento = 80 % p/p, tendo:

MW = 5.540 Da;

SO₃⁻/COO⁻ = 0,97;

Incremento de carboxilo (I.C.)= 1,56.

Análise de atividade antimieloma *in vivo* (60 mg/kg dia durante 14 dias) deu: 53 % de inibição tumoral.

EXEMPLO 12 (G9685)

Partindo de uma amostra de UFH (lote G3378) e seguindo o mesmo procedimento descrito no Exemplo 4, foi

obtido o derivado de dialdeído. O derivado de dialdeído foi adicionalmente oxidado na presença de cloreto de sódio, seguindo o procedimento do Exemplo 8, obtendo o derivado carboxilado G9685, MW = 11.700 Da.

A análise de inibição de heparanase *in vitro* deu: CI_{50} = 10 ng/ml;

Análise de atividade antimieloma *in vivo* (60 mg/kg dia durante 14 dias) deu: 68 % de inibição tumoral.

EXEMPLO 13 (G7897)

Uma amostra de G7731 do Exemplo 4 (0,3 g) dissolvida em água (3 ml) e tratada com 1,36 ml de $NaClO_2$ até pH 8,2-8,5 com HCl a 4 %. Depois, 1 mg de TEMPO foi adicionado e o pH foi mantido a 7-7,5 com NaOH a 1 M durante 24 h. A mistura de reação foi dessalinizada por diálise, concentrada e seca por congelamento para dar G7897 (0,190 g), rendimento = 63 % p/p, tendo:

$$SO_3^-/COO^- = 1,92;$$

$$\text{Incremento de carboxilo (I.C.)} = 1,28.$$

EXEMPLO 14 (G9585)

Partindo de uma amostra de heparina 2-O-dessulfatada (G9416, $SO_3^-/COO^- = 1,39$), seguindo o procedimento descrito no Exemplo 4, foi obtido o derivado de dialdeído G9577. Uma amostra de G9577 (0,242 g) dissolvida em água (21 ml) foi arrefecida a 0 °C num balão de fundo redondo de dois gargalos e, sob agitação em atmosfera de azoto, foi tratada com uma solução aquosa (1 ml) contendo $NaClO_2$ (0,128 g). Depois de uma adição gota a gota de ácido acético glacial (0,084 ml) até alcançar pH 4,0, a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. Depois de 3 horas adicionais sob agitação à temperatura ambiente, por fluxo de N_2 , foi obtida uma solução incolor. A mistura de reação foi neutralizada com NaOH a 0,5 N e dessalinizada por diálise como descrito no

Exemplo 4. A concentração e secagem por congelamento deu G9585 (0,148 g), rendimento = 61 % p/p, tendo:

MW = 4.700 Da;

SO₃⁻/COO⁻ = 0,82;

Incremento de carboxilo (I.C.) = 1,69.

A análise de inibição de heparanase *in vitro* deu:

CI₅₀ = 44 ng/ml.

LISBOA, 22 de FEVEREIRO de 2018

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de um derivado de glicosaminoglicano que inibe a heparanase compreendendo:

- a) oxidação de 10 % a 100 %, de resíduos 2-O- e 2N-, 3-O-não sulfatados de um glicosaminoglicano, sob condições eficazes para converter dióis adjacentes e OH/NH₂ adjacentes em dialdeídos;
- b) oxidação do glicosaminoglicano oxidado sob condições eficazes para converter os ditos dialdeídos em grupos carboxilato

e em que o glicosaminoglicano é um glicosaminoglicano natural ou sintético selecionado a partir de heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados.

2. O processo de acordo com a reivindicação 1, em que o glicosaminoglicano é selecionado a partir de heparina não fracionada ou LMWH, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatadas.

3. O processo de acordo com as reivindicações 1 e 2 em que o glicosaminoglicano tem um grau de sulfatação (SO₃-/COO-), determinado por titulação condutométrica como definido no presente documento, de desde 0,8 até 2,8.

4. O processo de acordo com a reivindicação 3 em que o glicosaminoglicano tem um grau de sulfatação (SO₃-/COO-), determinado por titulação condutométrica como definido no presente documento, de desde 0,9 até 2,5.

5. O processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o derivado de glicosaminoglicano tem um incremento de carboxilo, conforme definido no presente documento, de desde 1,2 até 2,2.

6. O processo de acordo com as reivindicações 1 a 5 em

que na etapa a) a oxidação é realizada por periodato.

7. O processo de acordo com as reivindicações 1 a 6 em que na etapa a) desde 25 % até 100 %, de resíduos 2-O- e, opcionalmente, 2N-, 3-O-não sulfatados de um glicosaminoglicano são oxidados.

8. Heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados que inibem heparanase, obteníveis através do processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores.

9. A heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados que inibem heparanase, de acordo com a reivindicação 8 tendo uma massa molecular de desde 3000 até 20000 Da.

10. A heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados que inibem heparanase, de acordo com a reivindicação 8 tendo uma massa molecular de desde 3500 até 12000 Da.

11. Compostos oligossacáridos obteníveis por despolimerização parcial enzimática ou química da heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados que inibem heparanase, de acordo com as reivindicações 8 a 10.

12. A heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados que inibem heparanase, de acordo com as reivindicações 8 a 11 para utilização como um medicamento.

13. A heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados que inibem heparanase, de acordo com as reivindicações 8 a 11 para utilização como fármacos antimetastáticos ou antitumorais.

14. A heparina, heparinas de baixa massa molecular, sulfato de heparano, opcionalmente 2-O- e/ou 2-N-dessulfatados que inibem heparanase, de acordo com as reivindicações 8 a 11 para utilização como fármacos antimieloma.

LISBOA, 22 de FEVEREIRO de 2018

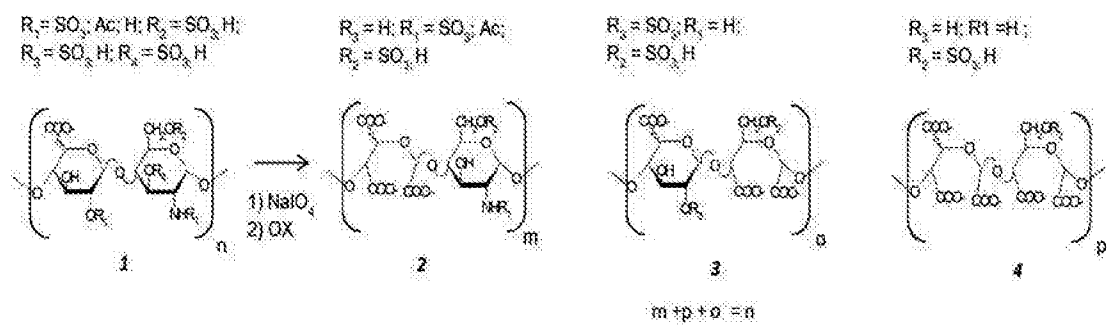


Figura 1

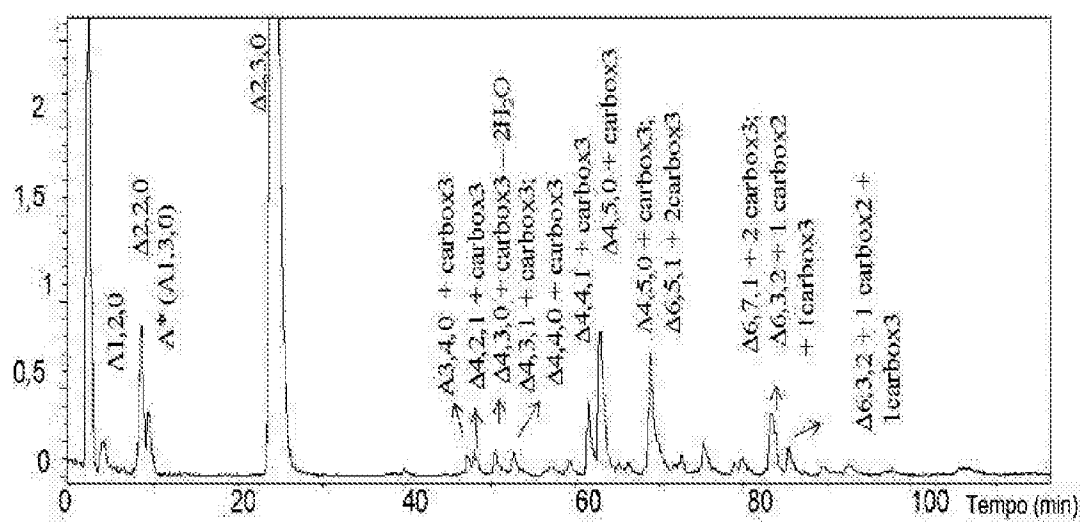


Figura 2

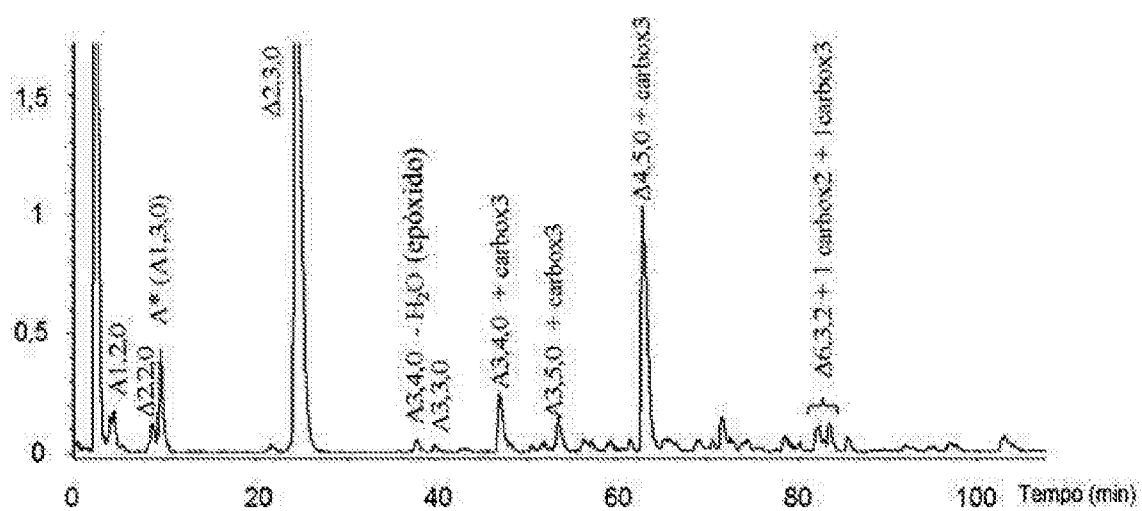


Figura 3