

ÖZET**N-DESÜLFATLANMIŞ GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN
TÜREVLERİ VE İLAÇ OLARAK KULLANIMI**

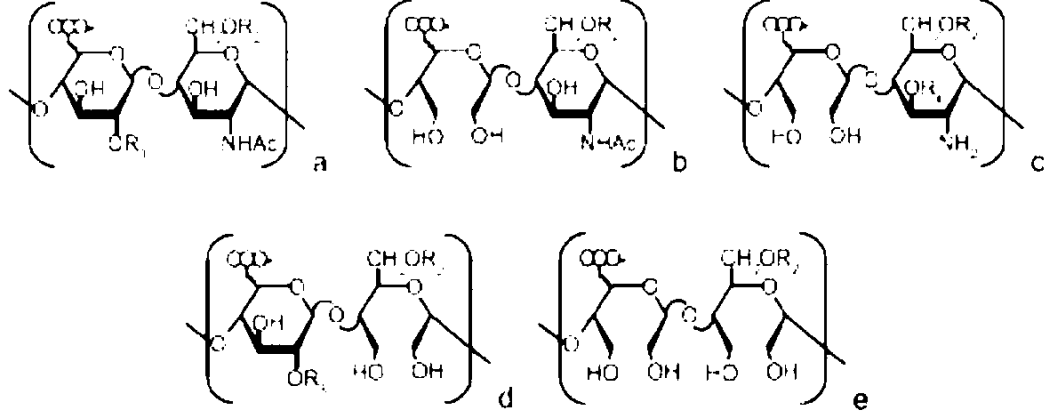
5

Buluş, N-desülfatlanmış ve opsiyonel olarak 2-O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevlerine ilişkin olup, burada bitişik diollerin ve OH/NH₂'nin en azından parçası ilgili aldehite dönüştürülmüştür ve bu aldehitler daha sonra ilgili alkole indirgenmiştir. Bu ürünler heparanaz engelleme aktivite ve anti-tümör aktivite ile donatılır. Bahsedilen glikozaminoglikan türevleri doğal veya sentetik glikozaminoglikandan, tercihen fraksiyone edilmemiş heparin, düşük moleküler ağırlıklı heparinler (LMWHs), heparan sülfat veya bunların türevlerinden elde edilir. Bu buluş ayrıca, bunların hazırlanma işlemine ve ayrıca bilinen yerleşik ilaçlar ve tedaviler ile kombinasyon halinde ilaçların etkin maddeleri olarak kullanımlarına ilişkindir. Mevcut buluş ayrıca, bir glikozaminoglikanın glikozamin kalıntılarının C 2 -C 3 bağıntı bahsedilen glikozaminoglikanın oksidasyonu ile kırmak için olan bir işleme ilişkindir.

20

İSTEMLER

1. N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın bir türevi **olup, özelliği**; bahsedilen türevin aşağıdaki yapıları içermesidir:



5

burada her bir R2, SO3 - veya H olabilir;

burada her bir R3, SO3 - veya H olabilir; ve

burada her bir R4, SO3 - veya H olabilir.

2. İstem 1'e göre N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; bahsedilen türevin (a) 3,000 ila 20,000 Da, veya (b) 3,500 ila 12,000 Da'dan seçilen bir moleküler ağırlığa sahip olmasıdır.

3. İstem 1 veya İstem 2'ye göre N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türetildiği başlatıcı glikozaminoglikanın bir doğal veya sentetik glikozaminoglikandan seçilmesi, tercihen burada doğal veya sentetik glikozaminoglikanın heparin, düşük moleküler ağırlıklı heparin, heparan sülfat veya bunların fraksiyonları olması, daha tercihen burada doğal veya sentetik glikozaminoglikanın, fraksiyone

edilmemiş heparin veya 3,500 ila 8,000 Da'lık bir moleküler ağırlığa sahip heparin olmasıdır.

4. Önceki istemlerden herhangi birine N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; bitişik diollerin ve OH/NH₂'nin ilgili aldehitlere ve sonra ilgili alkollere dönüştürüldüğü glikol ayırık kalıntılarının (RO), toplam glikozaminoglikan kalıntıları üzerinden yüzdelerinin, % 31 ve % 54 arasında olmasıdır.
5. Önceki istemlerden herhangi birine N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; 2-O-sülfatlanmış L-iduronik asidin (IdoA2S) toplam glikozaminoglikan kalıntıları üzerinden yüzdelerinin, % 29 ve % 40 arasında olmasıdır.
6. Önceki istemlerden herhangi birine N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; N-asetil D-glikozaminin (GlcNAc) toplam glikozaminoglikan kalıntıları üzerinden yüzdelerinin, % 6 ve % 30 arasında olmasıdır.
7. Önceki istemlerden herhangi birine N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; 2-NH₂ glikozaminin (GlcNH₂) toplam glikozaminoglikan kalıntıları üzerinden yüzdelerinin, % 4 ve % 13 arasında olmasıdır.
8. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; bahsedilen türevin heparanaz engelleyici aktiviteye sahip olmasıdır.

9. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; ilaç olarak kullanım için olmasıdır.
- 5 10. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi **olup, özelliği**; heparanazın inhibisyonundan fayda sağlayan bir endikasyonun tedavisinde kullanım için olmasıdır.
- 10 11. Oligosakkarit bileşikler **olup, özelliği**; istemler 1 ila 8'deki N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevinin enzimatik veya kimyasal kısmi depolimerizasyonu ile elde edilebilmesidir.
- 15 12. İstem 10'a göre oligosakkarit bileşikler **olup, özelliği**; ilaç olarak kullanım için olmasıdır.
- 20 13. İstem 9'a göre kullanım için N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi veya İstem 12'ye göre kullanım için oligosakkarit bileşikler **olup, özelliği**; bahsedilen ilaçların antimetastatik veya antitümöral ilaçlar olmasıdır.
- 25 14. İstem 9'a göre kullanım için N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevi veya İstem 12'ye göre kullanım için oligosakkarit bileşikler **olup, özelliği**; bahsedilen ilaçların antimiyelom ilaçlar olmasıdır.
15. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre N-desülfatlanmış glikozaminoglikanın türevini içeren farmasötik bileşim **olup, özelliği**;

opsiyonel olarak en az bir diğer etken madde, tercihen bir terapötik bileşik ile kombinasyon halinde olmasıdır.

5

10

15

20

TARİFNAME

N-DESÜLFATLANMIŞ GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN TÜREVLERİ VE İLAÇ OLARAK KULLANIMI

5

Özet

Buluş, N-desülfatlanmış ve opsiyonel olarak 2-O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevlerine ilişkin olup, burada bitişik diollerin ve OH/NH₂'nin en azından parçası ilgili aldehite dönüştürülmüştür ve bu 10 aldehitler daha sonra ilgili alkole indirgenmiştir. Bu ürünler heparanaz engelleyici aktiviteler ve anti-tümör aktivite ile donatılır. Bahsedilen glikozaminoglikan türevleri doğal veya sentetik glikozaminoglikandan, tercihen fraksiyone edilmemiş heparin, düşük moleküler ağırlıklı 15 heparinler (LMWHs), heparan sülfat veya bunların türevlerinden elde edilir. Doğal glikozaminoglikanlar, herhangi bir hayvan kaynağından elde edilebilir (farklı hayvan türleri ve organları uygulanabilir).

Bu buluş ayrıca, bunların hazırlanma işlemine ve ayrıca patolojik 20 koşullarda kullanışlı olan ilaçların etkin maddeleri olarak kullanımlarına ilişkindir. Özellikle, bahsedilen patolojik koşullar, metastatik formları dahil olmak üzere çoklu miyelom ve diğer kanserleri (yani sarkomlar, karsinomlar, hematolojik maligniteler) içermektedir. Buluşa ait glikozaminoglikan türevleri, onkolojik tedavi 25 olsun ya da olmasın diğer tedaviler ile kombinasyon halinde de ilaç olarak kullanılabilir. Dahası bu buluş, heparanazın (yani diyabetik nefropati, enflamatuvar bağırsak hastalığı, kolit, artrit, sedef hastalığı,

sepsis, ateroskleroz) engellenmesinden fayda elde eden herhangi bir terapötik endikasyonda, aynı zamanda bilinen var olan ilaçlarla veya tedavilerle kombinasyon halinde tercihen heparinlerden ve düşük moleküler ağırlıklı heparinlerden (LMWHs) elde edilen bahsedilen N-
5 desülfatlanmış ve opsiyonel olarak 2-O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevlerine ilişkindir.

Buluş aynı zamanda, etken madde olarak bahsedilen N-desülfatlanmış ve opsiyonel olarak O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevlerinin
10 en azından birini ihtiva eden farmasötik bileşimlere ilişkin olup, burada bitişik diollerin ve OH/NH₂'nin en azından parçası ilgili aldehite dönüştürülmüştür ve takiben ilgili alkole indirgenmiştir. Opsiyonel olarak bu buluş, en az bir diğer etken madde, daha tercihen bir terapötik bileşik ile kombinasyon halinde etken madde olarak bahsedilen
15 glikozaminoglikan türevlerinin en az birini ihtiva eden farmasötik bileşimlere ilişkindir. Tercihen, bahsedilen glikozaminoglikan türevleri heparin türevleri veya düşük moleküler ağırlıklı heparinlerdir (LMWHs).

20 **Buluşun Geçmişi**

Çoklu miyelom ikinci en yaygın hematolojik malignitedir ve her yıl yaklaşık 20.000 yeni vaka ve %50 üzerinde ölüm ile Birleşik Devletlerde tüm hematolojik kanserlerin %10'undan fazlasını
25 oluşturmaktadır (Graham-Rowe D., 2011, Multiple myeloma outlook. Nature 480, s34-s35).

Son birkaç yılda, proteazom inhibitörü (Velcade), bifosfonatlar, talidomit ve diğerlerinin uygulanması gibi umut verici tedaviler geliştirilmiştir. Bu maddelerin etkinliği, en azından kısmen, miyelom tümörü mikroçevresi üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır.

5

Miyeloma karşı etkinlik, bahsedilen maddeler ile gösterilmiş olmasına rağmen, miyelom ve diğer tümörleri tedavi etmek için yeni ve geliştirilmiş ilaçlara ihtiyaç vardır.

10 Heparanaz, sindekan-1 gibi proteoglikanların (PG-HS) heparan sülfat (HS) zincirlerini ayıran ve böylece HS-bağlı büyüme faktörlerini serbest bırakan bir endo- β -glukuronidazdır.

İnsanlarda, HS'yi ayırabilen bir tekli baskın işlevsel heparanaz
15 enziminin olduğu görülmektedir. Heparanaz, birçok insan tümörü ile ifade edilir ve burada bu, tümör hücrelerinin hem anjiyojenik hem de metastatik potansiyelini önemli ölçüde arttırmaktadır. Yükseltilmiş heparanaz seviyeleri aslında, birçok tümör tipinin gelişmiş ilerlemesi ve metastazı ilişkilendirilmiştir. Örneğin, yüksek seviyede heparanaz,
20 hastaların daha kısa bir postoperatif hayatta kalma süresi ile ilişkilidir. Tümör metastazında heparanazın bir doğrudan rolü, bize ait yeni inhibitörlerin test edilmiş olduğu Prof. Vlodavsky ve Prof. Sanderson'ın laboratuvarlarında gösterilmiştir.

HS-bağlı büyüme faktörlerinin serbest bırakılması ve invazif hücreler
25 tarafından ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkılmasını içeren enzimatik işlevlere ek olarak, heparanazın aynı zamanda tümör davranışını ve

mikroçevresini etkileyebilen bir enzimatik olmayan işlevi vardır. Sanderson'un grubu, heparanazın, kendi agresif tümör fenotipinin bir ana düzenleyicisi olarak görev yaptığını ortaya koyan, miyelomda heparanaz ve sindekan-1'in çalışmasına öncülük etmiştir. Bu, tümör
5 büyümesini, metastatik ve osteolitik kemik yıkımını birlikte stimüle eden VEGF ve NMP-9'un yukarı regülasyonunun yükseltilmesi ile meydana gelir. Aslında in vivo olarak gösterilmiştir ki heparanaz miyelom tümörlerinin ve spontan metastazın kemiğe büyümesini artırır ve tümör hücreleri ile heparanaz ifadesi, çığırından çıkmış
10 osteolisisi RANKL ifadesinin yukarı düzenlemesinden dolayı en azından kısmen teşvik eder. Heparanazın osteolisis artırıcı etkisi çok önemli olabilir çünkü kemiğe bağlı büyüme faktörleri kemik bozulduğunda serbest kalır. Ek olarak osteoklastlar, HGF gibi tümör büyümesini artırıcı faktörleri serbest bırakabilir. Bu faktörler birlikte,
15 tümör hücresi yuvalanması ve müteakip büyümeyi destekleyen kemik iliği içinde oyuklar oluşturulmasına yardımcı olabilir (Fux, L., ve ark. 2009, Heparanase: busy at the cell surface. Trends Biochem Sci 34 (10): 511-519 ; Sanderson R.D., ve Yang Y., 2008, Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. Clin. Exp Metastasis
20 25:149-59 ; Ilan N., ve ark. 2006. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. Int. J. Biochem. Cell Biol. 38: 2018-2039). Heparanazın inhibisyonu bu yüzden miyelom tedavisinin uygulanabilir bir hedefidir ve bir tekli enzimatik olarak aktif heparanaz olması gerçeği ve normal dokulardaki
25 ifadesinin nadir

olması gerçeği ile desteklenmektedir. Dahası, heparanaz nakavt farelerin yaşayabilir olduğu ve görünür bozukluk sergilemediği

gösterilmiştir. Bu, bir heparanaz inhibisyon stratejisinden hiçbir yan etkinin türeyemediğini ya da çok az türeyebildiğini göstermektedir (Casu B., ve ark. 2008. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 36: 195-203 ; Vlodavsky I., ve ark. 2007. Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. *Curr Pharm Des.* 13: 2057-2073 ; Naggi A., ve ark. 2005. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded N-Acetylation, and Glycol Splitting. *J. Biol. Chem.* 280: 12103-12113).

Heparin, antikoagulan ve antitrombotik aktivite ile donatılmış, glikozaminoglikan ailesinin lineer polidispers sülfatlanmış bir polisakkaritidir. Heparinin sakarridik zincirleri, alternatif üronik asit ve D-glikozamin kalıntılarından oluşur. Ana tekrarlayan birim, disakkarit 2-O-sülfatlanmış L-iduronik asit $\text{IdoA2S}\alpha(1\rightarrow4)$ ve N-, 6-O-sülfatlanmış D-glikozamindir (GlcN6S). Küçük bileşenler, N-asetil D-glikozamin ve N-, 3-O-, 6-O-trisülfatlanmış D-glikozamin ile birlikte sülfatlanmamış L-iduronik ve D-glukuronik asittir (Casu B., 2005. Structure and active domains of heparin. In: *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate.* Amsterdam: Elsevier. 1-28 ; Casu B. ve Lindahl U. 2001, Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 57: 159-206). Yapısal olarak HS'ye benzer olan Heparin, heparanazı etkin bir şekilde inhibe edebilmekte, ancak heparanaz inhibisyon stratejisinde yüksek dozlarda kullanımı, antikoagulan aktivitesi nedeniyle imkansızdır.

İlginç bir şekilde, heparinden daha fazla biyolojik olarak kullanılabilir ve daha az antikoagulan olan düşük moleküler ağırlıklı heparinlerin (LMWHs), muhtemelen tümör büyümesi ve metastaz üzerindeki doğrudan etkisi sebebiyle kanser hastalarının hayatta kalma süresini uzattığı görülmektedir. Bu, en azından kısmen, heparanaz enzimatik aktivitesinin inhibisyonundan kaynaklanabilir (Zacharski L.R., ve Lee, A.Y. 2008, Heparin as an anticancer therapeutic. *Expert Opin Investig Drugs* 17:1029-1037 ; Yang Y ve ark., 2007, The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood* 110:2041-2048).

Heparanazın enzimatik aktivitesinin etkili inhibitörleri önceki teknikte, heparanaz inhibisyonunun, çoğu glukosidik halkanın 2-3 bağda açılması ile modifiye edilen sülfatlanmamış üronik asit kalıntıları içeren antikoagulan olmayan heparinler ile araştırılması ile seçilmiştir. Bahsedilen inhibitörler, hem önceden var olan hem de aşamalı 2-O-desülfatlama ile üretilen sülfatlanmamış üronik asit kalıntılarının O-sülfatlama, N-asetilasyon ve glikol ayrılma dereceleri bakımından farklıdır (Naggi A., 2005. Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative. In: *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Amsterdam: Elsevier 461-481).

"Glikol ayrık" (ga) terimi geleneksel olarak, her biri bir hidroksil grubu taşıyan iki bitişik karbonun arasındaki bir bağın kırılmasından (glikol ayrılma) ötürü bazı monosakkarit kalıntılarının açılmasını temsil eden karbonhidrat polimerlerini ifade etmektedir. Birinci nesil glikol

bölünmüş heparinler, yani "indirgenmiş oksiheparinler" (RO-heparinler) olarak adlandırılan, büyük ölçüde, orijinal zincirler boyunca mevcut olan sülfatlanmamış glukuronik asit/iduronik asit kalıntılarına karşılık gelen glikol ayrık kalıntıları tarafından nadiren duraklatılan modifiye edilmemiş polisülfatlanmış bloklardan oluşur (Naggi A., 2005. Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative. In: Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Amsterdam: Elsevier 461-481). ATIII'nın bağlanma bölgesi içindeki glukuronik asit kalıntılarını modifiye eden heparin üzerindeki bu kimyasal etki, antikoagulan aktivitesini azaltır veya ortadan kaldırır, böylece bunun yüksek dozlarda kullanılmasını mümkün kılar.

WO 92/17188 sayılı doküman, antikoagulan olmayan bir heparin türünün, düz kas hücrelerine istinaden, anti-proliferatif aktivitesini açıklamaktadır. Bahsedilen heparin, doğal heparin zincirlerinin küçük bir bileşeni olan hidrazin içeren bir maddeye sahip N-asetil glukozamin birimlerinin N-deasetilasyonu ile hazırlanır ve ardından diollerin veya bitişik OH/NH₂ gruplarının karşılık gelen aldehidlere periyodat oksidasyonu yapılır. Oksidasyonun ardından, glikozaminoglikanın ciddi bir fragmentasyonu olmadan aldehidlerin alkollere indirgenmesi olur. N-sülfatlanmış birimler, oksidasyon-indirgenmesinden etkilenmez.

N-desülfatlanmış heparinler (Kimyasal Özet Kayıt numarası 53260-52-9), ayrıca Merck indeksinde (14. Editor,2006) "heparamin" olarak da bilinir, birçok etki ile donatıldığı bilinmektedir: VEGF ifadesi ve anjiyogenezin (Chen-J-L ve ark. 2007, World J. Gastroenterol 21, 457-

461) engellenmesi ile farelerde gastrik kanserin metastazına karşı bazı aktiviteler, indirgenmiş bir antikoagulan aktivitesi, ve iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu hepatik/renal hasarın engellenmesi (Chen-J-L ve ark. 2002, World J. Gastroenterol 8, 897-900). N-desülfatlanmış heparinler aynı zamanda, çeşitli N-asilatlı heparinlerin sentezi için ara ürünleri olarak bilinmektedir. N-desülfatlama derecesi, heparinlerde bulunan N-sülfatlanmış glikozamin kalıntılarının %10'u ila %100 arasında değişebilir (Huang L. ve Kerns R.J. 2006, Bioorg. Med Chem, 14,2300-2313).

10

WO 01/55221 sayılı doküman, toplam üronik asit birimlerinin %60'ından fazla olmayan bir 2-O-desülfatlama derecesine sahip glikozaminoglikanları açıklamaktadır. Bahsedilen glikozaminoglikanlar, antikoagulan aktivitesinden yoksundur ve FGF'nin inhibisyonuna dayanan antianjiyogenik aktivite göstermektedir. Heparanazın inhibisyonu için herhangi bir aktivite ön görülmemektedir.

US 2008/0051567 sayılı doküman, %100 N-asetillenmiş ve %25 glikol ayrılmış heparine karşılık gelen, çok az veya hiç antikoagulan aktivitesinin ve hücre dışı matristen büyüme faktörlerinin düşük salınmasını uygulayan, buna karşın Sanderson'un miyelom modeli de dahil olmak üzere deneysel hayvan modellerinde heparanaz, tümör büyümesi, anjiyogenez ve inflamasyonu inhibe eden bir bileşiği açıklamaktadır.

25

Bununla birlikte, daha yüksek heparanaz inhibisyon etkinliği, daha yüksek selektivite, gelişmiş biyolojik kullanılabilirlik ve miyelom ve diğer tümörler gibi heparanaz ile bağlantılı patolojilerin tedavisi için etkinliğe sahip gelişmiş bileşikler ortaya koyma ihtiyacı devam etmektedir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1: bir glikozaminoglikanın periyodat oksidasyonu ve borohidrid indirgenmesi ile üretilen yaygın yapılar.

(1) hidroksil grubunun (R4) bir sülfat grubu ile ikame edilebildiği veya ikame edilemediği, bir üronik asit (iduronik ve/veya glukuronik) ve bir glikozamin (2-N-asetillenmiş, 2-N-ikame edilmemiş ve/veya 2-N-sülfatlanmış) içeren bir glikozaminoglikan polimerinin disakkaridik birimi. N-desülfatlamasından sonra, glikozaminoglikan polimerleri, 2-N-asetillenmiş glukozaminler (2) ve 2-NH₂ glikozaminler (doğal ve/veya N-desülfatlanmış) (3) içeren disakkaridik birimleri içerebilir. Periyodik oksidasyon ve borohidrit indirgeme, 2-O-sülfatlanmamış üronik asit kalıntılarının (5, 6, 8) bitişik diolleri ve 2-N- ve 3-O-sülfatlanmamış glikozaminin (7, 8) bitişik OH/NH₂ gruplarının ilgili aldehitlere (oksidasyon ile) ve daha sonra ilgili alkollere (indirgeme ile) dönüşümüne yol açar. Bir N-desülfatlanmış glikozamin ve bir 2-O-sülfatlanmamış üronik asit içeren disakkarit birimlerde, her iki kalıntının da dialdehitlere ve sonra glikol ayrık kalıntılara (8) dönüştürüldüğünü unutmayınız.

Buluşun Açıklaması

Mevcut buluş yeni, kimyasal olarak modifiye edilmiş glikozaminoglikanlar, ve özellikle, heparanazı ve onun heparan sülfat bozucu aktivitesini ciddi şekilde inhibe eden heparin ve LMWH'lere ilişkindir.

5

Heparanaz engelleyici aktivite ile donatılmış olan mevcut buluşun yeni bileşikleri, N-desülfatlanmış ve opsiyonel olarak 2-O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevleri olup, burada bitişik diollerin ve OH/NH₂'nin en azından parçası ilgili aldehite dönüştürülmüştür ve bu aldehitler daha sonra ilgili alkole indirgenmiştir. Aldehitlere dönüşüm tercihen, sırasıyla amin ve hidroksil ornatıklarını taşıyan, hem üronik asit kalıntılarının bitişik diollerinin bağıni hem de glikozamininin C2-C3 bağıni kırılması için uygun koşullarda periyodat kullanılarak gerçekleştirilir. Başlatıcı bileşikler aynı zamanda 2-O-sülfatlanmamış üronik asit kalıntıları da içerir. Özellikle N-desülfatlama, N-sülfatlanmış glikozamin kalıntıları üzerinde meydana gelirken, O-desülfatlama ise 2-O-sülfatlanmış üronik asit kalıntılarında meydana gelir.

20

Tercihen, mevcut buluşun glikozaminoglikan türevleri doğal ya da sentetik glikozaminoglikanlardan ortaya çıkar ve ikincisi kimyasal ya da enzimatik olarak hazırlanır (Naggi A. ve ark., 2001, "Toward a biotechnological heparin through combined chemical and enzymatic modification of the Escherichia coli K5 polysaccharide. "Seminars in thrombosis and hemostasis, 27, 5437), örneğin fraksiyonlanmamış heparinler, düşük moleküler ağırlıklı heparinler (LMWH'ler), heparan

25

sülfatlar veya bunların fraksiyonları; daha tercihen glikozaminoglikan türevleri doğal veya sentetik heparinlerden ya da LMWH'lerden türer.

N-sülfatlanmış glikozamin kalıntılarının spesifik N-desüfatlaması, bu kalıntıların aynı zamanda 3-O-sülfatlanmamış olması koşuluyla bahsedilen kalıntıları ilgili aldehitlere (ve daha sonra ilgili alkollere) dönüşümünü büyük ölçüde elverişli kılar. Şekil 1'de, bir glikozaminoglikan zincirinde bulunabilen tüm disakkarit üniteleri ve bunların N-desüfatlama, oksidasyon ve indirgeme reaksiyonu sonrası değişimleri, şematik bir görünümde gösterilmiştir.

Bir örnek olarak, heparin zincirleri doğal olarak yaklaşık %5 ila yaklaşık %35 oranında 2-O-sülfatlanmamış üronik asit kalıntısı, %0 ila %50 oranında N-asetillenmiş glikozamin kalıntısı ve %0 ila %6 oranında N-ikame edilmemiş (ne N-sülfatlanmış ne de N-asetillenmiş) glikozamin kalıntıları içerebilir. Farklı bileşimler, heparin kaynağına (hayvan türleri, organ kaynakları) ve ekstraksiyon prosedürlerine bağlıdır.

Hem karbon 2 hem de karbon 3 üzerindeki, bir glikozaminoglikanın her bir sülfatlanmamış kalıntısı aldehite dönüşmeye elverişlidir. Sonuç olarak, mevcut buluşun işleminde yer alan kapsamlı N-desüfatlama ayrıca, bitişik OH/NH₂'nin ilgili aldehitlere dönüştürüldüğü (ve daha sonra ilgili alkollere) birimlerin yüzdesindeki bir artış ile birlikte doğal glikozaminoglikanların uygun birimlerinin yüzdesi üzerinden bahsedilen dönüşüme elverişli kalıntılar sağlar, ancak 2-O-sülfatlanmış iduronik asit kalıntılarının doğal içeriğini muhafaza eder. Seçene bağlı

olarak, glikozaminoglikanların kimyasal olarak başlatılmış 2-O-desülfatlaması, mevcut buluşa göre oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarına uygun olan glikozamin ve üronik asitin oranını modüle etmeye olanak tanır.

5

Buluş ayrıca, N- ve opsiyonel olarak 2-O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevlerine ilişkin olup, burada bitişik dioller ve OH/NH₂, halkanın açılması ile ilgili aldehite dönüştürülmüştür ve bu aldehitler daha sonra ilgili alkole indirgenmiştir. Buluş ayrıca, bahsedilen glikozaminoglikan türevlerini hazırlamak için bir işlemle ve ayrıca metastatik formları dahil olmak üzere çoklu miyelom ve diğer kanserler gibi patolojik durumların tedavisi için ilaçların etken maddeler olarak kullanımları ile ilgilidir. Dahası bu buluş, bahsedilen glikozaminoglikan türevlerinin, heparanazın inhibisyonundan fayda elde eden herhangi bir terapötik endikasyonda kullanımı ile ilgilidir. Buluş ayrıca, bahsedilen N-desülfatlanmış ve opsiyonel olarak 2-O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevlerini içeren farmasötik bileşimlere ilişkin olup, burada bitişik dioller ve OH/NH₂, açılan halka ile ilgili aldehite dönüştürülmüştür ve bu aldehitler daha sonra ilgili alkole indirgenmiştir.

15

20

Mevcut buluşun N- ve opsiyonel olarak 2-O-desülfatlanmış glikozaminoglikan türevleri aşağıdakileri içeren bir işlem ile elde edilebilir:

25

a) Bir glikozaminoglikanın N-sülfatlanmış glikozamin kalıntılarının %25 ila %100'ünün, tercihen %30 ila %90'ının, daha tercihen %45 ila %80'inin N-desülfatlaması; isteğe bağlı olarak işlem ayrıca, bir

glikozaminoglikanın 2-O sülfatlanmış kalıntılarının %50'ye kadar, tercihen %25'e kadar 2-O-desülfatlamasını içerir; elde edilen ürün tercihen %0 ila %50 N-asetillenmiş glikozamin kalıntıları, %50 ila %100 N-sülfatlanmamış glikozamin kalıntıları içerir;

- 5 b) ilgili aldehitlere dönüşüm, tercihen 2N-, 3-O-sülfatlanmamış glikozamin kalıntılarının bitişik OH/NH₂'sinin ve 2-O-sülfatlanmamış üronik asit kalıntılarının bitişik diollerinin periyodat oksidasyonu ile (orijinal zincir boyunca doğal olarak mevcut sülfatlanmamış olanların yanı sıra kimyasal olarak desülfatlanmış); 2N-, 3-O-sülfatlanmamış
- 10 glikozamin kalıntıları %25 ila %100 arasında mevcut olabilir

bahsedilen aldehitlerin, tercihen sodyum borohidrid tarafından ilgili alkollere indirgenmesi.

- Opsiyonel olarak, işlem ayrıca glikozaminoglikanın N-asetillenmiş
- 15 kalıntılarının kısmi ya da toplam deasetilasyonunu içerir.

- Tercih edilen düzenlemelerde, mevcut buluşa ait glikozaminoglikan türevleri doğal veya sentetik (kimyasal ya da enzimatik olarak hazırlanmış) glikozaminoglikanlardan, tercihen fraksiyone edilmemiş
- 20 heparinler, LMWH'ler, heparan sülfat veya bunların türevlerinden elde edilir. mevcut buluşa ait glikozaminoglikan türevleri heparinler veya LMWH'lerden elde edilir.

- Tercih edilen bir düzenlemede, oksidasyon, tercihen periyodat
- 25 oksidasyon, sırasıyla amino ve hidroksil ornatıklarını taşıyan hem

üronik asitlerin komşu diollerini hem de glikozaminin C2 ve C3'ü arasındaki bağı ayırmak üzere olan koşullar altında gerçekleştirilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, farklı derecelerde N-desülfatlama ile donatılan, modifiye edilmiş glikozaminoglikan örnekleri, tercihen modifiye heparin veya LMWH, bilinen yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirilen, periyodat oksidasyonuna ve sulu ortamda sodyum borohidrid indirgemesine tabi tutulur. Periyodat oksidasyonu, depolimerizasyonu indirmek için kullanılan bir şelatlama ve ayırma maddesi olan NTA (nitrilotriasetik asit) mevcudiyetinde, çözeltiyi alkalize etmek için NaHCO₃ veya piridin mevcudiyetinde veya NTA'lı veya NTA'sız MnCl₂ mevcudiyetinde gerçekleştirilebilir. Tercihen, periyodat oksidasyonu NTA mevcudiyetinde gerçekleştirilir. Tercihen oksidasyon, 5.5 ve 10.0 arasında yer alan, daha tercihen 6.0 ve 9.0 arasında yer alan pH'ta gerçekleştirilir.

Mevcut buluş ayrıca, bir glikozaminoglikanın glikozaminoglikan kalıntılarının C2-C3 bağı kırma için olan bir işleme ilişkin olup, şunları içerir: bahsedilen glikozaminoglikanın 5.5 ve 10.0 arasında yer alan, daha tercihen 6.0 ve 9.0 arasında yer alan bir pH'ta tercihen periyodat ile oksidasyon.

Tercihen, bitişik OH/NH₂'nin ilgili aldehite dönüştürüldüğü, bu aldehitlerin daha sonra ilgili alkollere indirgenmesi, glikozaminoglikan kalıntıları, glikozaminoglikanın glikozamin kalıntılarının %25 ila %100'ü, daha tercihen %50 ila %100'ü, en çok tercihen %60 ila %90'ıdır.

Yukarıdaki işlem ile elde edilebilir glikozaminoglikandan türetilmiş bileşikler tercihen, işlem koşullarına ve başlatma glikozaminoglikanına bağlı olarak 800 ila 30.000 Da'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. Fraksiyone edilmemiş heparin, başlatma materyali olarak
5 uygulandığında, yukarıdaki işlem ile elde edilebilir glikozaminoglikandan türetilmiş bileşikler tercihen, 3.000 ila 20.000 Da, tercihen 4.000 ila 12.000 Da'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir.

Mevcut buluşun yeni glikozaminoglikan türevlerinin beklenmedik bir
10 şekilde in vitro olarak güçlü heparanaz inhibitörler olduğu ve hayvan modellerinde miyelomu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bitişik diollerin ve OH/NH₂'nin ilgili aldehitlere dönüştürüldüğü ki bu aldehitlerin daha sonra ilgili alkollere indirgenmediği, daha fazla birim
15 sayısına sahip ürünler, aynı zamanda doğal glikozaminoglikanlara ve kendi RO türevlerine göre daha az sülfatlanır. Bu nedenle bunların, daha az modifiye kalıntı içeriğine sahip benzerlerinden daha az protein etkileşimi ve daha uygun farmakokinetikler göstermeleri umulmaktadır.

20 Mevcut buluş ayrıca, ilaç olarak kullanılmak üzere yukarıda açıklanan işlemlerle elde edilebilir olan bileşiklere de ilişkindir.

Mevcut buluş özellikle, antimetastatik maddeler olarak, antitümör olarak, tercihen antimiyelom olarak kullanılmak üzere yukarıda
25 açıklanan işlemlerle elde edilebilir olan bileşiklere de ilişkindir.

Mevcut buluşa göre hazırlanan heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparin türevleri, düşük sülfatlama derecelerine rağmen, çoklu bir miyelom deney modelinde heparanaz aktivitesinin hem in vitro hem de in vivo olarak etkili bir şekilde inhibe edildiğini göstermiştir.

5

Dahası, mevcut buluşun türevleri, düşük moleküler ağırlıklarda bile (bk. örnekler 5, 6 ve 8), benzer moleküler ağırlığa sahip 2-0-desülfatlanmış heparinlerden elde edilen RO heparinlerinkinden daha yüksek heparanaz inhibe edici aktivite göstermiştir. Sonrakiler Tablo 10

1'de gösterilmektedir.

TABLO 1

Örnek	glikol ayırık üronik asidin yüzdesi	Ortalama moleküler ağırlık, MW (kDa)	Heparanaz inhibisyonu IC50 (ng/ml)
RO 1	28	17	8
RO 2	26	10	50
RO 3	23	7	500
RO 4	23	5	750
Heparin			

Veriler, RO tipinde glikol ayırık heparinin moleküler ağırlığının azaltılmasıyla, indirgenmiş heparanaz inhibe edici aktiviteye genel bir eğilim göstermektedir.

15

Örnekler

Bileşiklerin hazırlanması

Aşağıdaki örneklerde açıklanan fraksiyone edilmemiş heparinin (buradan sonra UFH) N-desülfatlaması, bilinen yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Inoue Y ve Nagasawa K 1976. "Selective N-desulfation of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol." Carbohydr Res 46 (1) 87-95). N-desülfatlama derecesi ^{13}C -NMR ile belirlendi (Naggi A., ve ark. 2001, "Generation of anti-factor Xa active, 3-O-sulfated glucosamine-rich sequences by controlled desulfation of oversulfated heparins." Carbohydr. Res. 336, 4, , 283-290).

10

Farklı derecelerde N-desülfatlama ile donatılan modifiye heparin örnekleri, iki aldehit grubu ve sulu ortamda sodyum borohidrid (NaBH_4) indirgemesi ile bölünmüş birimler vermek ve nihai heparin türevleri vermek için periyodat oksidasyona tabi tutuldu; her iki reaksiyon da bilinen yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Periyodat oksidasyonu tercihen, NaHCO_3 , piridin, MnCl_2 veya NTA'lı MnCl_2 mevcudiyetinde gerçekleştirilmiştir. UFH'nin aşamalı

2-O-desülfatlaması, bilinen yöntemlerin modifikasyonunu takiben gerçekleştirildi (Jaseja M. ve ark. 1989 "Novel regio- and stereo-selective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence." Canad J Chem,67, 1449-1455 ; R. N. Rej Arthur S. Perlin 1990 "Base-catalyzed conversion of the α -L-iduronic acid 2-sulfate unit of heparin into a unit of α -L-galacturonic acid, and related reactions." Carbohydr. Res. 200, 25, 437-447 ; Casu B. ve ark. 2004 "Undersulfated and Glycol-Split Heparins Endowed with Antiangiogenic Activity." J. Med. Chem., 47, 838-848). Bundan sonra "RO", bitişik diollerin ve OH/ NH_2 'nin, ilgili aldehite

ve daha sonra ilgili alkole glikozaminoglikan kalıntıları üzerinden dönüştürüldüğü glikol ayrık kalıntılarının yüzdesini göstermektedir.

In vitro test

5

Bisio ve ark.'nın önceki çalışmalarına dayanarak, (Bisio A. ve ark. 2007 "High-performance liquid chromatographic/mass spectrometric studies on the susceptibility of heparin specie to cleavage by heparanase." Sem Thromb hemost 33 488-495), heparanaz inhibe edici aktivite, Hammond ve ark. tarafından açıklanan yöntemle göre Haifa Üniversitesi, İsrail'de Prof. Vlodavsky'nin grubu tarafından in vitro olarak belirlenmiştir (Hammond ve ark. 2010 "Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening." Anal Biochem. 396, 112-6). Kısaca heparanaz, yapısal olarak heparinin antitrombin bağlama bölgesine karşılık gelen bir antitrombotik ilaç olan sentetik pentasakkarit Fondaparinuksu ayırabilir. Heparanaz ile hidrolizden sonra, bir trisakkarit ve bir indirgeyici disakkarit elde edilir. İkincisi, heparanaz aktivitesini değerlendirmek amacıyla kolayca ölçülebilir. Mevcut örneklerde, analiz çözeltisi, inhibitör örnekli veya örneksiz (100 µl) 40 mM sodyum asetat tamponu pH 5.0 ve 100 mM Fondaparinuks (GlaxoSmithKline) içermektedir. Heparanaz 140 pM'lik bir nihai konsantrasyona analizin başlangıcında ilave edildi. Levhalar yapışkan bant ile mühürlendi ve 37°C'de 2-24 saat boyunca inkübe edildi. Analiz, 0.1M NaOH'de bir 1.69 mM 4-[3-(4-iyodofenil)-IH-5 tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat (WST-1, Aspep, Melbourne, Avustralya) çözeltisi ilave edilerek durduruldu. Levhalar yapışkan bant ile tekrar mühürlendi

25

ve 60°C'de 60 dakika boyunca tab edildi. Soğurum 584 nm'de ölçüldü (Fluostar, BMG, Labtech). Her bir levhada, indirgeyici şeker standardı olarak D-galaktoz ile inşa edilen standart bir eğri, aynı tamponda ve hacimde, 2 ila 100 uM'luk bir konsantrasyon aralığında hazırlandı. IC50 değeri belirlendi. Yukarıda alıntılanan kolorimetrik deney kullanılarak elde edilen sonuçlar, substrat olarak radyoaktif sülfat ile etiketlenmiş bir hücre dışı matriks (ECM) uygulayan farklı bir test kullanılarak doğrulandı. Kısacası, ECM substratı kültürlenmiş kornea endotel hücreleri tarafından biriktirilir ve dolayısıyla, bileşimindeki, biyolojik fonksiyonunda ve bariyer özelliklerindeki subendotelyal bazal membrana oldukça benzemektedir. Sülfat etiketli ECM hazırlanması ve bunun heparanaz tahlili için kullanımı hakkında ayrıntılı bilgi aşağıda bulunabilir: Vlodavsky, I., Current Protocols in Cell Biology, Bölüm 10: Birim 10.4, 2001 .

15

In vivo test

In vivo olarak antimiyelom aktivitesi büyük ölçüde Yang Y ve ark. (Yang Y., ve ark. 2007. "The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy." Blood 110:2041-2048) içinde açıklanan prosedürün takiben test edilmiştir. Kısaca, 5 ila 6 haftalık olan CB17scid/scidmice Arlan (Indianapolis, IN) veya Charles River Laboratuvarlarından (ABD) alınmıştır. Fareler, Birmingham'daki Alabama Üniversitesi'nin hayvan tesisinde tutulmuş ve izlenmiştir. Tüm deneyler prosedürler ve protokoller, Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından onaylanmıştır. 1×10^6 heparanaz ifade eden CAG miyelom hücreleri (yüksek veya düşük ifade eden) her

25

farenin sol yanına deri altından enjekte edildi. Tümör hücrelerinin enjekte edilmesinden 10 gün sonra farelere sağ yanından Alzet geçişim pompası (Durect Corporation, Cupertino, CA) aşılandı. Pompalar, deney bileşiklerinin her çözeltisini (yeni heparin türevleri) veya kontrol olarak fosfat tamponu (PBS) ihtiva etmekteydi. Çözelti 14 gün boyunca sürekli verildi. 14 gün sonra, hayvanlar öldürülmüş ve deri altı tümörlerinin yaş ağırlığı ve ortalama sera kappa seviyesi analiz edilmiş ve deney grupları arasında log-rank testi ile karşılaştırılmıştır ($p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir).

10

Haftalık lusiferaz biyoluminesans görüntüleme, birincil tümörler hakkında niceliksel veriler sağlar ve kemik ve de yumuşak dokulardaki metastazı takip eder. Dikkate alınmalıdır ki SCIDhu modeli, insan tümör hücrelerinin doğrudan, SCID farelerine deri altından aşıl原因an insan fetal kemiğinin ufak parçalarına enjekte edilmesi ve böylece insan miyelomunun yakın şekilde tekrarlanması bakımından benzersizdir.

15

NMR analizinin genel prosedürü

Spektrumlar, 5-mm'lik bir TCI kriyoprobı ile veya 10 mm'lik bir BBO probu ile donatılmış bir Bruker Avance 500 spektrometresinde (Karlsruhe, Almanya) 25°C'de kaydedilmiştir. Spektrumlardaki zirve alanı ve hacimlerinin entegrasyonu, standart Bruker TopSpin 2.0 yazılımı kullanılarak yapıldı.

25

FRAKSİYONE EDİLMEMİŞ HEPARİNİN N-DESÜLFATLAMASI

ÖRNEK 1 (G8220)

5 UFH (4.01 g, lot G3378), su (32 ml) içerisinde çözündürüldü ve Amberlite IR 120 (H+, 144 ml) ile karıştırılma altında muamele edildi. Filtrelenen asit çözeltisi, piridin ile pH 7'ye getirildi, daha sonra azaltılmış basınç altında kuruluğa konsantre edildi. Elde edilen piridinyum tuzu, DMSO:H₂O'nin (95:5 hacmen) 40 ml'lik bir
10 karışımında çözündürüldü ve daha sonra 25°C'de 48 saat karıştırıldı. 40 ml'lik su ile seyreltilmesinden sonra çözelti, membran içinde damıtılmış suya karşı 4°C'de 16 saat boyunca diyaliz edildi (kesilme: 3,500 Da). Azaltılmış basınç altında konsantrasyon ve liyofilizasyon şunları verir: G8220 (2.7 g), verim= %67 w/w, MW=19.100 Da, ¹³C-NMR ile
15 belirlenen N-desülfatlama derecesi = %74.7'lik toplam glikozamin kalıntıları, ¹³C-NMR ile belirlenen 2-0 sülfatlanmış üronik asit = toplam monosakkaritlerin &18'i.

ÖRNEK 2 (G8343)

20

Örnek 1'de açıklanan prosedürü takiben, UFH'nin (0.25 g, lot. G3378) bir örneği, bir DMSO:MeOH (95:5 hacmen) karışımında N-desülfatlanmış olan ilgili piridinyum tuzunda dönüştürülmüştür. 25°C'de 2 saat karıştırma sonrasında, G8343 (0.172 g) vermek için
25 Örnek 1'de açıklanan aynı nihai prosedürü takiben reaksiyon karışımı işlendi, verim= %69 w/w, MW=18.000 Da, ¹³C-NMR ile belirlenen N-

desülfatlama derecesi = %63.3'lük toplam glikozamin kalıntıları, ¹³C-NMR ile belirlenen 2-0 sülfatlanmış üronik asit = toplam monosakkaritlerin %19'u.

5 ÖRNEK 3 (G8516)

UFH'nin bir örneğinden başlayarak (0.25g, lot G3378) ve Örnek 2'de açıklanan prosedürü takiben, ancak N-desülfatlama zamanını 40 dakikaya indirerek G8516 elde edildi (0.17g) verim= %68, ¹³C-NMR ile belirlenen N-desülfatlama derecesi = %49.7'lik toplam glikozamin kalıntıları, ¹³C-NMR ile belirlenen 2-0 sülfatlanmış üronik asit = toplam monosakkaritlerin %17'si.

ÖRNEK 4 (G8147)

15 UFH (2.5g lot. G3378) suda (20 ml) çözüldü ve Amberlite IR 120 (H+, 90 ml) ile karıştırma altında işlem gördü. Filtrelenen asit çözeltisi, piridin ile pH 7'ye getirildi, daha sonra azaltılmış basınç altında kuruluğa konsantre edildi. Ortaya çıkan piridinyum tuzu DMSO'nun 25 ml'lik bir karışımında çözüldürüldü: MeOH (90:10 hacmen), daha sonra 25°C'de 18 saat karıştırıldı. 25 ml'lik su ile seyreltilmesinden sonra çözelti, membran içinde damıtılmış suya karşı 4°C'de 16 saat boyunca diyaliz edildi (kesilme: 3,500 Da). Azaltılmış basınç altında konsantrasyon ve liyofilizasyon şunları verir: G8147 (1.9 g), verim= %76 w/w, MW=18.200 Da, ¹³C-NMR ile N-desülfatlama derecesi= 25 %60'lık toplam glikozamin kalıntıları.

ÖRNEK 5 (G9416)

UFH (5 g lot. G3378) suda (40 ml) çözüldü ve Amberlite IR 120 (H+, 90 ml) ile karıştırma altında işlem gördü. Filtrelenen asit çözeltisi, piridin ile pH 7'ye getirildi, daha sonra azaltılmış basınç altında kuruluğa konsantre edildi. Ortaya çıkan piridinyum tuzu DMSO'nun 100 ml'lik bir karışımında çözüldürüldü: MeOH (95:5 hacmen), daha sonra 25°C'de 18 saat karıştırıldı. 100 ml'lik su ile seyreltilmesinden sonra çözelti, membran içinde damıtılmış suya karşı 4°C'de 16 saat boyunca diyaliz edildi (kesilme: 3,500 Da). Azaltılmış basınç altında konsantrasyon ve liyofilizasyon şunları verir: G9416 (3.65 g), verim= % 73 w/w, MW= 18.800 Da, ¹³C-NMR ile N-desülfatlama derecesi= % 77 'lik toplam glikozamin kalıntıları.

ÖRNEK 6 (G8079)

UFH (1 g lot. G3378) suda (8 ml) çözüldü ve Amberlite IR 120 (H+, 90 ml) ile 30 dakika boyunca karıştırma altında işlem gördü. Filtrelenen asit çözeltisi, piridin ile pH 7'ye getirildi, daha sonra azaltılmış basınç altında kuruluğa konsantre edildi. Ortaya çıkan piridinyum tuzu DMSO'nun 10 ml'lik bir karışımında çözüldürüldü: MeOH (95:5 hacmen), daha sonra 25°C'de 16 saat karıştırıldı. 10 ml'lik su ile seyreltilmesinden sonra çözelti, membran içinde damıtılmış suya karşı 4°C'de 3 gün boyunca diyaliz edildi (kesilme: 3,500 Da). Azaltılmış basınç altında konsantrasyon ve liyofilizasyon şunları verir: G8079 (1 g), verim= % 100 w/w, ¹³C-NMR ile N-desülfatlama derecesi= % 60 'lık toplam glikozamin kalıntıları.

25

N-DESÜLFATLANMIŞ HEPARİNLERİN PERİYODAT OKSİDASYONU VE SODYUM BOROHİDRİDİ

ÖRNEK 7 (G8340)

Suda (7.3 ml) çözünen ve 4 °C'ye soğutulan örnek 1'in bir G8220 örneği (0.25 g, N-desülfatlanmış heparin kalıntılarının % 74.4 'ü), 0.2 M NaIO₄'ün bir eşit hacmine eklenmiştir. PH değeri 2M NaHCO₃ (yaklaşık 2.1 ml) ile 6.8 'e ayarlandı, 4 °C'de karanlıkta karıştırma altında, 0.08 M nitrilotriasetik asit (NTA, 10 ml) çözeltiye eklendi. PH değeri 4.0 'dan 6.6 'ya 2M NaHCO₃ eklenerek getirildi ve reaksiyon karışımı 4 °C'de 8 saat boyunca karıştırma altında tutuldu. Periyodatın fazlalığı etilen glikol (0.73 ml) eklenmesi ile söndümlendi; 1 saat sonra reaksiyon karışımı membrandaki damıtılmış suya karşı (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca diyaliz ile tuzdan arındırıldı. Tuzdan arındırılan çözelti NaBH₄ (0.164 g, 3.4 mmol) ile muamele edildi, 25 °C'de 3 saat karıştırıldı, daha sonra pH değeri, NaBH₄ fazlalığını söndümlemek için 1N HCl ile 4'e getirildi ve 10 dakika karıştırıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile nötrlendi. Membranda (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca, damıtılmış suya karşı diyalizden sonra, azaltılmış basınç ve dondurarak kurutma altında konsantrasyon, G8340 'ın 0.202 g elde edildi, verim = % 90 w/w, MW = 8.400 Da. Toplam monosakkarit kalıntıları üzerinden RO (%53), IdoA2S (%35), GlcNAc (%9) ve GlcNH₂ (%12) yüzdeleri ¹³C-NMR ile belirlendi.

In vitro heparanaz inhibisyon: IC₅₀=20 ng/ml.

25 In vivo antimiyelom aktivite: 14 gün boyunca 60 mg/Kg/gün: % 75 tümör inhibisyonu ve % 60 serum K inhibisyonu.

ÖRNEK 8 (G8438)

Örnek 2'nin G8343'ünden başlayarak (N-desülfatlanmış heparin kalıntılarının % 63.3'ünün 0.171 g'mı) ve Örnek 7'de açıklanan aynı
 5 prosedürü takip ederek, G8438 elde edilir (91.4 mg), verim = % 82, MW = 6,800 Da. RO (%38), IdoA2S (%32), GlcNAc (%8), GlcNH₂(4%) yüzdeleri ¹³C-NMR ile belirlendi.

In vitro heparanaz inhibisyon IC₅₀: 60 ng/ml.

10 ÖRNEK 9 (G8588)

Örnek 3 'teki G8516 'dan başlayarak (N-desülfatlanmış heparin kalıntılarının % 44 'ünün 0.171 g'mı) ve Örnek 7'de açıklanan prosedürü takip ederek, G8588 elde edilir (0.136 mg), verim = % 80 , MW =
 15 11.000 Da. GlcNAc (%30), GlcNH₂(%13), IdoA2S (%34) RO (%37) yüzdeleri ¹³C-NMR ile belirlendi.

ÖRNEK 10 (G9578)

20 Örnek 5 'teki G9416 'dan başlayarak ve Örnek 7'de açıklanan prosedürü takip ederek, G9578 elde edilir, verim = % 89 , MW = 6,300 Da, ¹³C-NMR ile belirlenen N-desülfatlama derecesi = %48 'lik toplam glikozamin kalıntıları. Toplam glikozaminoglikan kalıntıları üzerinden RO (% 45) ve IdoA2S (% 35) yüzdeleri ¹³C-NMR ile belirlendi. Buluşa
 25 dair ürün üzerinde in vitro ve in vivo deney, aşağıdaki sonuçları vermiştir:

In vitro heparanaz inhibisyon: IC50 =75 ng/ml;

in vivo antimiyeleom aktivite 14 gün boyunca 60 mg/Kg gün: % 63 tümör inhibisyonu.

5 ÖRNEK 11 (G8188)

Suda (7.3 ml) çözünen ve 4 °C'ye soğutulan örnek 4 'teki N-desülfatlanmış heparinin G8147 bir örneği (0.25 g, N-desülfatlanmış heparin kalıntıları), 0.2 M NaIO4'ün bir eşit hacmine eklenmiştir. PH değeri, 4 °C'de 16 saat boyunca karanlıkta karıştırma altında, 2M NaHCO3 (yaklaşık 2.1 ml) ile 6.8 'e ayarlandı. Periyodatın fazlalığı etilen glikol (0.73 ml) eklenmesi ile söndümlendi ve 1 saat sonra reaksiyon karışımı membrandaki damıtılmış suya karşı (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca diyaliz ile tuzdan arındırıldı. Tuzdan arındırılan çözelti NaBH4 (0.164 g, 3.4 mmol) ile muamele edildi, 25 °C'de 3 saat karıştırıldı, daha sonra pH değeri, NaBH4 fazlalığını söndümlemek için 1N HCl ile 4'e getirildi ve 10 dakika karıştırıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile nötrlendi. Membranda (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca, damıtılmış suya karşı diyalizden sonra, azaltılmış basınç ve dondurarak kurutma altında konsantrasyon, 0.168 g G8188 elde edildi, verim = % 67 w/w, MW = 3.460 Da. RO (% 43), IdoA2S (% 40), GlcNAc (% 6), GlcNH2 (% 4) yüzdeleri ¹³C-NMR ile belirlendi.

25 ÖRNEK 12 (G8189)

Suda (7.3 ml) çözünen ve 4 °C'ye soğutulan bir G8147 örneği (0.25 g,

% 60 N-desülfatlanmış heparin kalıntıları), 0.2 M NaIO₄'ün bir eşit hacmine eklenmiştir. PH değeri, 4 °C'de 16 saat boyunca karanlıkta karıştırma altında, piridin (% 5 v/v, yaklaşık 730 µl) ile 6.8 'e ayarlandı. Periyodatın fazlalığı etilen glikol (0.73 ml) eklenmesi ile sönmüldü ve 1 saat sonra reaksiyon karışımı membrandaki damıtılmış suya karşı (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca diyaliz ile tuzdan arındırıldı. Tuzdan arındırılan çözelti NaBH₄ (0.164 g, 3.4 mmol) ile muamele edildi, 25 °C'de 3 saat karıştırıldı, daha sonra pH değeri, NaBH₄ fazlalığını sönmülemek için 1N HCl ile 4'e getirildi ve 10 dakika karıştırıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile nötrlendi. Membranda (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca, damıtılmış suya karşı diyalizden sonra, azaltılmış basınç ve dondurarak kurutma altında konsantrasyon, 0.181 g G8189 elde edildi, verim = %72 w/w, MW = 5.150 Da. RO (% 49), IdoA2S (% 39), GlcNAc (% 7), GlcNH₂ (% 7) yüzdeleri ¹³C-NMR ile belirlendi.

ÖRNEK 13 (G8217)

Suda (7.3 ml) çözünen ve 4 °C'ye soğutulan bir G8147 örneği (0.25 g, % 60 N-desülfatlanmış heparin kalıntıları), 0.2 M NaIO₄'ün bir eşit hacmine eklenmiştir. 4 °C'de 16 saat boyunca karanlıkta karıştırma altında, PH değeri 2M NaHCO₃ (yaklaşık 2.1 ml) ile 6.8 'e ayarlandı ve 30 ml MnCl₂0.05M (çözeltideki son konsantrasyon 0.00001M idi) eklendi. Periyodatın fazlalığı etilen glikol (0.73 ml) eklenmesi ile sönmüldü. Gece boyunca, örnek çöktüldü çünkü pH 8 oldu ve sonra pH değeri 1N HCl ile 6'ya getirildi. 1 saat sonra reaksiyon karışımı membrandaki damıtılmış suya karşı (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat

boyunca diyaliz ile tuzdan arındırıldı. Tuzdan arındırılan çözelti NaBH₄ (0.164 g, 3.4 mmol) ile muamele edildi, 25 °C'de 3 saat karıştırıldı, daha sonra pH değeri, NaBH₄ fazlalığını sönmlemek için 1N HCl ile 4'e getirildi ve 10 dakika karıştırıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile nötrlendi. Membranda (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca, damıtılmış suya karşı diyalizden sonra, azaltılmış basınç ve dondurarak kurutma altında konsantrasyon, 0.230 g G8217 elde edildi, verim = %92 w/w, MW = 7.455 Da. Toplam glikozaminoglikan kalıntılarındaki RO (% 31), IdoA2S (% 29), GlcNAc (% 8), GlcNH₂ (% 6) yüzdeleri ¹³C-NMR ile belirlendi.

ÖRNEK 14 (G8219)

Suda (7.3 ml) çözünen ve 4 °C'ye soğutulan bir G8147 örneği (0.25 g, % 60 N-desülfatlanmış heparin kalıntıları), 0.2 M NaIO₄'ün bir eşit hacmine eklenmiştir. PH değeri 2M NaHCO₃ (yaklaşık 1.2 ml) ile 6.8 'e ayarlandı, 4 °C'de karanlıkta karıştırma altında, 0.08 M nitrilotriasetik asit (NTA, 10 ml) ve 31 ml MnCl₂0.05M çözeltiye eklendi. PH değeri 4.0 'dan 6.3 'e 2M NaHCO₃ eklenerek getirildi ve reaksiyon karışımı 4 °C'de 8 saat boyunca karıştırma altında tutuldu. Periyodatın fazlalığı etilen glikol (0.73 ml) eklenmesi ile sönmüldü ve 1 saat sonra reaksiyon karışımı membrandaki damıtılmış suya karşı (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca diyaliz ile tuzdan arındırıldı. Diyaliz edilen çözelti, NaBH₄ (0.164 g, 3.4 mmol) ile muamele edildi, 25 °C'de 3 saat karıştırıldı, daha sonra pH değeri, NaBH₄ fazlalığını sönmlemek için 1N HCl ile 4'e getirildi ve 10 dakika karıştırıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile nötrlendi. Membranda (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca,

damıtılmış suya karşı diyalizden sonra, azaltılmış basınç ve dondurarak kurutma altında konsantrasyon, 0.202 g G8219 elde edildi, verim = %90 w/w, MW = 7.330 Da. RO (% 54), IdoA2S (% 36), GlcNAc (% 9), GlcNH₂ (% 8) yzdzeleri ¹³C-NMR ile belirlendi.

5

KARşILAşTIRMALI ÖRNEK 15 (G8092)

Suda (29.2 ml) ozünen ve 4°C'de soğutulan bir G8079 örneğine (1 g, N-desulfatlanmış heparin), eşit hacimde bir NaIO₄(pH5) eklendi ve reaksiyon karışımı 4°C'de 8 saat karıştırma altında tutuldu. Periyodatın fazlalığı etilen glikol (2.9 ml) eklenmesi ile snmlendi ve 1 saat sonra reaksiyon karışımı membrandaki damıtılmış suya karşı (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 16 saat boyunca diyaliz ile tuzdan arındırıldı. Diyaliz edilen ozelti, NaBH₄ (0.657 g, 3.4 mmol) ile muamele edildi, 25 °C'de 3 saat karıştırıldı, daha sonra pH değeri, NaBH₄ fazlalığını snmlmek için 1N HCl ile 4'e getirildi ve 10 dakika karıştırıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile nötrlendi. Membranda (kesilme: 3,500 Da) 4 °C'de 72 saat boyunca, damıtılmış suya karşı diyalizden sonra, azaltılmış basınç ve dondurarak kurutma altında konsantrasyon, 0.643 g G8092 elde edildi, verim = %64 w/w, MW = 6.064 Da. ¹³C-NMR analizi, N-desulfatlanmış glikozaminin 95ppm'inde bir zirveyi gösterir. Asidik pH'ta oksidasyon reaksiyonu meydana gelmez.

Mevcut buluş ayrıca, aşağıdaki maddelerde tanımlanan durumları da içermektedir (bunlar mevcut buluşun bir bölümünü oluşturur ancak Avrupa Patent Ofisi Yasal Temyiz Kurulu'nun J 15/88 sayılı kararı uyarınca istemler olarak kabul edilmez):

25

1. Heparanazı inhibe eden bir glikozaminoglikan türevinin hazırlanması için işlem olup, aşağıdakileri içerir:

5 a) Bir glikozaminoglikanın N-sülfatlanmış kalıntılarının % 25 ile %100'lük N-desüfatlaması;

10 b) oksidasyon, tercihen bir 5.5 ila 10.0 pH'ta periyodat ile, 2-N-, 3-O-sülfatlanmamış glikozaminoglikan kalıntılarının ve bahsedilen glikozaminoglikanın 2-O-sülfatlanmamış üronik asit kalıntılarının % 25 ile % 100, bitişik diolleri ve bitişik OH/NH₂'yi aldehitlere dönüştürmek için etkili koşullar altında;

15 c) bahsedilen aldehitleri alkollere dönüştürmek için etkili olan koşullar altında bahsedilen oksitlenmiş glikozaminoglikanın, tercihen sodyum borohidrid ile indirgenmesi.

2. Madde 1'deki işlem olup ayrıca:

20 d) N-desüfatlamadan önce veya sonra glikozaminoglikanın 2-O-sülfatlanmış kalıntılarının % 50'ye kadar tercihen % 25'e kadar 2-O-desüfatlamasını içermektedir.

3. Önceki maddelerden herhangi birinin işlemi olup ayrıca şunları içerir:

25 e) N-desüfatlamadan önce veya sonra, glikozaminoglikanın N-asetillenmiş kalıntılarının kısmen veya tamamen deasetilasyonu.

4. Önceki maddelerden herhangi birine göre işlem olup, burada glikozaminoglikan bir doğal veya sentetik glikozaminoglikandır, tercihen burada doğal veya sentetik glikozaminoglikan heparin, düşük moleküler ağırlıklı heparin, heparin sülfat veya bunların fraksiyonlarıdır, daha tercihen burada doğal veya sentetik glikozaminoglikan fraksiyone edilmemiş heparin veya 3,500 ila 8,000 Da'lık bir moleküler ağırlığa sahip heparindir.
- 5
- 10 5. Bir gliko glikozaminoglikanın sülfatlanmamış glikozamin kalıntılarının CrC3 bağının bölünmesi için işlem olup, şunları içerir: bahsedilen glikozaminoglikanın 5.5 ila 10.0'lık bir pH'ta, daha tercihen 6.0 ila 9.0'lık bir pH'ta tercihen periyodat ile oksidasyonu.
- 15
6. Bir glikozaminoglikanın türevsel bileşikleri olup, önceki maddelerden herhangi birinin işlemi ile elde edilebilir.
- 20 7. Madde 6'nın türevsel bileşikleri olup, 3,000 ila 20,000 Da'lık, tercihen 3,500 ila 12,000 Da'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir.
- 25 8. Oligosakkarit bileşikler olup, maddeler 6-7'deki bir glikozaminoglikanın türevsel bileşiklerinin enzimatik veya kimyasal kısmi depolimerizasyonu ile elde edilebilir.
9. İlaç olarak kullanım için maddeler 6 ila 8'in herhangi

birindeki bileşiklerdir.

10. Anti metastatik, antitümöral ilaçlar olarak kullanım için, tercihen antimiyelom ilaçlar olarak kullanım için madde 9'un bileşikleridir.

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- WO 9217188 A [0014]
- US 20080051567 A [0017]
- WO 0155221 A [0016]

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **GRAHAM-ROWE D.** Multiple myeloma outlook. Nature, 2011, vol. 480, s34-s35 [0004]
- **FUX, L. et al.** Heparanase: busy at the cell surface. Trends Biochem Sci, 2009, vol. 34 (10), 511-519 [0009]
- **SANDERSON R.D. ; YANG Y.** Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. Clin. Exp Metastasis, 2008, vol. 25, 149-59 [0009]
- **ILAN N. et al.** Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis.
- **CHEN-J-L et al.** World J. Gastroenterol, 2007, vol. 21, 457-461 [0015]
- **CHEN-J-L et al.** World J. Gastroenterol, 2002, vol. 8, 897-900 [0015]
- **HUANG L. ; KERNS R.J.** Bioorg. Med Chem, 2006, vol. 14, 2300-2313 [0015]
- **NAGGI A. et al.** Toward a biotechnological heparin through combined chemical and enzymatic modification of the Escherichia coli K5 polysaccharide. Seminars in thrombosis and hemostasis, 2001, vol. 27, 5437 [0022]
- **INOUE Y ; NAGASAWA K.** Selective N-desulfation

- Int. J. Biochem. Cell Biol., 2006, vol. 38, 2018-2039 [0009]
- **CASU B. et al.** Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. Pathophysiol Haemost Thromb., 2008, vol. 36, 195-203 [0009]
 - **VLODAVSKY I. et al.** Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. Curr Pharm Des., 2007, vol. 13, 2057-2073 [0009]
 - **NAGGI A. et al.** Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded N-Acetylation, and Glycol Splitting. J. Biol. Chem., 2005, vol. 280, 12103-12113 [0009]
 - Structure and active domains of heparin. **CASU B.** Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Elsevier, 2005, 1-28 [0010]
 - **CASU B. ; LINDAHL U.** Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. Adv Carbohydr Chem Biochem, 2001, vol. 57, 159-206 [0010]
 - **ZACHARSKI L.R. ; LEE, A.Y.** Heparin as an anticancer of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. Carbohydr Res, 1976, vol. 46 (1), 87-95 [0042]
 - **NAGGI A. et al.** Generation of anti-factor Xa active, 3-O-sulfated glucosamine-rich sequences by controlled desulfation of oversulfated heparins. Carbohydr. Res., 2001, vol. 336 (4), 283-290 [0042]
 - **JASEJA M. et al.** Novel regio- and stereo-selective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence. Canad J Chem, 1989, vol. 67, 1449-1455 [0043]
 - **R. N. REJ ARTHUR ; S. PERLIN.** Base-catalyzed conversion of the α -L-iduronic acid 2-sulfate unit of heparin into a unit of α -L-galacturonic acid, and related reactions. Carbohydr. Res., 1990, vol. 200 (25), 437-447 [0043]
 - **CASU B. et al.** Undersulfated and Glycol-Split Heparins Endowed with Antiangiogenic Activity. J. Med. Chem., 2004, vol. 47, 838-848 [0043]
 - **BISIO A. et al.** High-performance liquid chromatographic/ mass

- therapeutic. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, vol. 17, 1029-1037 [0011]
- **YANG Y et al.** The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood*, 2007, vol. 110, 2041-2048 [0011]
 - Glycol-splitting as a device for modulating inhibition of growth factors and heparanase inhibition by heparin and heparin derivative. **NAGGI A.** *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Elsevier, 2005, 461-481 [0012] [0013]
 - CHEMICAL ABSTRACTS, 260-52-9 [0015]
 - **YANG Y. et al.** The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood*, 2007, vol. 110, 2041-2048 [0045]
 - spectrometric studies on the susceptibility of heparin species to cleavage by heparanase. *Sem Thromb hemost*, 2007, vol. 33, 488-495 [0044]
 - **HAMMOND et al.** Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening. *Anal Biochem.*, 2010, vol. 396, 112-6 [0044]
 - **VLODAVSKY, I.** *Current Protocols in Cell Biology*. 2001 [0044]

