



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 001**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04763853 .1**  
96 Fecha de presentación : **06.08.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1660134**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Conjugados de almidón hidroxialquílico y de G-CSF.**

30 Prioridad: **08.08.2003 PCT/EP03/08859**  
**08.08.2003 PCT/EP03/08829**  
**08.08.2003 PCT/EP03/08858**  
**11.03.2004 EP 04005874**  
**11.03.2004 US 552281 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.04.2011**

73 Titular/es:  
**FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GmbH**  
**Else-Kröner-Strasse 1**  
**61352 Bad Homburg V.D.H., DE**

72 Inventor/es: **Eichner, Wolfram;**  
**Knoller, Helmut;**  
**Lutterbeck, Katharina;**  
**Zander, Norbert;**  
**Frank, Ronald;**  
**Sommermeier, Klaus;**  
**Conradt, Harald, S. y**  
**Grabenhorst, Eckart**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 001 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados de almidón hidroxialquílico y de G-CSF.

5 La presente invención se refiere a conjugados de almidón hidroxialquílico y a una proteína del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que estos conjugados se forman mediante un enlace covalente entre el almidón hidroxialquílico o un derivado del almidón hidroxialquílico y la proteína. La presente invención se refiere también al procedimiento para producir estos conjugados y al uso de estos conjugados.

10 Se acepta generalmente que se puede mejorar la estabilidad de las proteínas y reducirse la respuesta inmune frente a estas proteínas cuando estas proteínas se acoplan a moléculas poliméricas. El documento WO 94/28024 da a conocer que las proteínas fisiológicamente activas modificadas con el polietilenglicol (PEG) presentan inmunogenicidad y antigenicidad reducidas y circulan en el torrente sanguíneo considerablemente más tiempo que las proteínas no conjugadas, es decir, tienen una reducida velocidad de aclaramiento.

15 G-CSF es una glucoproteína de 21 kDa estabilizada mediante dos enlaces disulfuro intracadena que contienen un único resto carbohidrato unido a O. G-CSF madura tiene 174 aminoácidos. En el cuerpo animal, G-CSF se sintetiza en las células estromales, en macrófagos y en fibroblastos de la médula ósea. Su función principal es la de ser un factor de crecimiento y de diferenciación de los neutrófilos y de sus células precursoras. Sin embargo, se conoce en la materia  
20 que G-CSF activa los neutrófilos maduros. Además, estimula el crecimiento/diferenciación de otras diversas células progenitoras hematopoyéticas (en sinergia con factores de crecimiento hematopoyéticos adicionales) y promueve la proliferación y la migración de las células endoteliales. Clínicamente, G-CSF se administra para el tratamiento de las deficiencias en los niveles de neutrófilos (producidas, por ejemplo, por la anemia aplásica, la mielodisplasia, el SIDA, o la quimioterapia).

25 El documento WO 02/09766 da a conocer, entre otros, compuestos de proteína-polímero biocompatibles que se producen mediante conjugación de proteínas biológicamente activas con un derivado de polímero biocompatible. Los polímeros biocompatibles usados son polímeros ramificados muy reactivos, y los conjugados resultantes contienen un enlazante largo entre el derivado de polímero y la proteína. Como polímeros biocompatibles, se describen los  
30 polímeros de fórmula  $(P-OCH_2CO-NH-CHR-CO-)_n-L-Q_k-A$ , en la que P y Q son restos poliméricos y k puede ser 1 ó 0. Para P y Q, se mencionan polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxietileno, politrimetilenglicol, ácido poliláctico y sus derivados, ácido poliacrílico y sus derivados, poliaminoácido, alcohol polivinílico, poliuretano, polifosfaceno, poli (L-lisina) óxido de polialquileño, poliacrilamida, y polímeros solubles en agua tales como dextrano o polisacáridos. Como proteínas, se mencionan entre otras, interferones alfa, beta y gamma, factores de la sangre, citocinas tales como interleucinas, G-CSF, GM-CSF. En los ejemplos del documento WO 02/09766 se dan a conocer únicamente derivados  
35 de mono, di y tripolietilenglicol, que se acoplan exclusivamente al interferón y al factor de crecimiento epidérmico, y a la hormona del crecimiento humana.

40 El documento WO 94/01483 da a conocer conjugados de polímeros biocompatibles que se forman mediante enlace covalente de un polímero o derivado de polímero biológicamente inactivo con un polímero hidrófilo sintético farmacéuticamente puro mediante tipos específicos de enlaces químicos. Como polímeros que se producen naturalmente y sus derivados, se dan a conocer polisacáridos tales como ácido hialurónico, proteoglicanos tales como sulfatos A, B y C de condroitina, heparina, sulfato de heparina, dextranos tales como ciclodextrano, hidroxietil celulosa, éter de celulosa y almidón, lípidos tales como triglicéridos y fosfolípidos. Como polímeros sintéticos, entre otros, se describen polie-  
45 tilenos y sus derivados que tienen un peso molecular promedio de entre aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000. Como proteínas unidas al polímero o derivado de polímero, se describen citocinas y factores de crecimiento, entre los que se incluyen interferones, y se dan a conocer factores de necrosis tumoral, interleucinas, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento tales como extracto de factor osteogénico, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor ácido de crecimiento de fibro-  
50 blastos y otros. En todos los ejemplos de trabajo del documento WO 94/01483, se usan como polímeros derivados de polietilenglicol.

55 El documento WO 96/11953 da a conocer compuestos de proteínas modificadas químicamente en el extremo N y los procedimientos para su producción. Específicamente, se describen composiciones de G-CSF que son el resultado de acoplar un polímero soluble en agua en el extremo N de G-CSF. En el contexto del documento WO 96/11953, se dan a conocer interferones consenso acoplados en el extremo N a polímeros solubles en agua. Aunque se relaciona una amplia variedad de polímeros hídricos en el documento WO 96/11953 (por ejemplo, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros aleatorios), poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno o polioles polioxietilados), se describen solo composiciones de G-CSF PEGilado o  
60 composiciones de IFN consenso en los ejemplos del documento WO 96/11953.

65 El documento US 6.555.660 B2 da a conocer conjugados de polipéptidos que comprenden un polipéptido que presenta actividad G-CSF y que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de G-CSF humana en al menos un resto de aminoácido especificado y/o eliminado, en el que el conjugado comprende un grupo de unión de un resto no polipeptídico, y comprende además al menos un resto no polipeptídico unido al grupo de unión del polipéptido. El resto no polipeptídico puede ser un polímero tal como polietilenglicol o un oligosacárido.

En el documento US 6.555.660 B2 se define explícitamente y sin ambigüedad que PEG es de lejos la molécula de polímero más preferida debido a que tiene unos pocos grupos reactivos capaces de reticularse en comparación con polisacáridos tales como dextrano.

5 El documento WO 97/30148 se refiere a conjugados de polipéptidos con alergenicidad reducida que comprenden una molécula portadora polimérica que tiene dos o más moléculas de polipéptidos acopladas a la anterior. Estos conju-  
 10 gados son preferiblemente parte de las composiciones usadas en el mercado del cuidado personal. Dichos conjugados se producen activando una molécula portadora polimérica, haciendo reaccionar dos o más moléculas de polipépti-  
 dos con la molécula portadora polimérica activada y bloqueando los grupos residuales activos del conjugado. Como  
 15 molécula portadora polimérica, se relaciona una gran variedad en el documento WO 97/30148, que incluye los mencio-  
 nados grupos diferentes de compuestos homopoliméricos de tipo natural o sintético tales como polioles, poliaminas,  
 ácidos policarboxílicos, y heteropolímeros que comprenden al menos dos grupos de unión diferentes. Se propor-  
 cionan ejemplos, que comprenden PEG de tipo estrella, PEG ramificados, alcoholes polivinílicos, policarboxilatos,  
 polivinilpirrolidonas y poli-D,L-aminoácidos. Entre otros, se dan a conocer también dextranos tales como carboxi-  
 metil dextrano, celulosas tales como hidroxietilcelulosa o hidroxipropilcelulosa, hidrolizados de quitosán, almidones  
 20 tales como hidroxietil almidones o hidroxipropil almidones, glucógeno, agarosa, goma guar, inulina, pululano, goma  
 xantana, carragenatos, pectina, ácido algínico. Como polipéptidos, se dan a conocer únicamente de manera explícita  
 algunas enzimas.

20 Baldwin, J.E. y col., Tetrahedron, vol. 27 (1981), pp. 1723-1726 describen la modificación química del dextrano  
 y del hidroxietil almidón para dar polímeros sustituidos con aldehído que se dejan reaccionar con hemoglobina para  
 dar hemoglobinas unidas a polímeros. Se muestra que estas son capaces de unirse a oxígeno, pero los experimentos  
 de perfusión cardíaca indicaron claramente que las hemoglobinas unidas a polímeros no fueron adecuadas para el uso  
 como sustitutos de la sangre.

25 El documento WO 99/49897 describe conjugados de hemoglobina formados haciendo reaccionar polisacáridos  
 tales como dextrano o hidroxietil almidón con grupos amino de la hemoglobina. Como grupos funcionales de los  
 polisacáridos, se usan grupos aldehído producidos mediante apertura oxidativa de anillo de sacáridos. Como agen-  
 te reductor preferido usado, se da a conocer borano dimetilamina. Además, el documento WO 99/49897 se limita  
 30 exclusivamente a la hemoglobina.

El documento WO 03/074087 se refiere a un procedimiento para acoplar proteínas a un polisacárido modificado  
 derivado de almidón. La acción de unión entre la proteína y el polisacárido, el hidroxialquil almidón, es un enlace  
 35 covalente que se forma entre el grupo aldehído terminal o un grupo funcional resultante de una modificación química  
 de dicho grupo aldehído terminal de la molécula de hidroxialquil almidón, y un grupo funcional de la proteína. Como  
 grupo reactivo de la proteína, se dan a conocer grupos amino, grupos tio y grupos carboxilo, y no se mencionan  
 los grupos aldehído de la proteína. Además, aunque se proporciona una gran variedad de posibilidades de enlaces  
 diferentes en la forma de muchas listas, que incluyen diferentes grupos funcionales, moléculas enlazantes diferentes  
 40 teóricamente adecuadas, y diferentes procedimientos químicos, los ejemplos de trabajo describen solo dos alternativas;  
 en primer lugar se usa un hidroxietil almidón oxidado y se acopla directamente a las proteínas usando la activación  
 con etildimetilaminopropil carbodiimida (EDC), o se usa un hidroxietil almidón no oxidado y se acopla directamente  
 a una proteína formando una base de Schiff que se reduce posteriormente a la amina respectiva. De esta manera,  
 los ejemplos de trabajo del documento WO 03/074087 ni dan a conocer un conjugado individual acoplado mediante  
 un grupo tio o un grupo carboxilo de la proteína, ni describen un conjugado que comprende hidroxietil almidón, la  
 45 proteína, y una o más moléculas enlazantes. Adicionalmente, se usa una molécula sin G-CSF en los ejemplos de  
 trabajo.

Por tanto, ha sido un objeto de la presente invención proporcionar conjugados de hidroxialquil almidón, preferi-  
 50 blemente hidroxietil almidón, y G-CSF, que no se habían descrito todavía en la técnica anterior.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar procedimientos para producir estos conjugados.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un conjugado que comprende una  
 55 proteína y un derivado polimérico en el que el polímero es un hidroxialquil almidón (HAS) y la proteína es un factor  
 estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar al menos un  
 grupo A funcional del derivado polimérico con al menos un grupo Z funcional de la proteína y formar por tanto un  
 enlace covalente, en el que Z es un grupo amino, y en el que A se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo  
 aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal.

- 60 - en el que el procedimiento comprende además introducir A en el polímero para dar un derivado polimérico
- haciendo reaccionar el polímero con al menos un compuesto bifuncional, un grupo funcional, el cual reacciona  
 con el polímero y al menos otro grupo funcional adicional el cual es un grupo aldehído, un grupo ceto o un  
 grupo hemiacetal, o es un grupo funcional que está modificado químicamente de manera adicional para dar un  
 65 grupo aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal, y en el que la reacción del derivado polimérico con la  
 proteína es una aminación reductora.

## ES 2 357 001 T3

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere también a un conjugado que es obtenible mediante un procedimiento que se describe anteriormente.

Se puede producir el G-CSF mediante procedimientos de síntesis química o puede proceder de cualquier fuente humana (véanse, por ejemplo, Burgess, A.W. y col. 1977, Stimulation by human placental conditioned medium of hemopoietic colony formation by human marrow cells, *Blood* 49 (1977), 573-583; Shah, RG. Y col. 1977, Characterization of colony-stimulating activity produced by human monocytes and phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes, *Blood* 50 (1977), 811) u otra animal y se puede obtener mediante purificación de fuentes que se producen naturalmente similares a la placenta humana, sangre humana u orina humana. Adicionalmente, una elevada cantidad de carcinomas epiteliales, células de leucemia mieloide aguda, y varias líneas de células tumorales (carcinomas de vejiga, meduloblastomas), son capaces de expresar este factor.

Además, la expresión de G-CSF abarca también una variante de G-CSF en la que uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1 a 25, preferiblemente 1 a 10, más preferiblemente 1 a 5, lo más preferido 1 ó 2) se han intercambiado por otro aminoácido y que presenta actividad G-CSF (véanse por ejemplo, Riedhaar-Olson, J.F. y col. 1996, Identification of residues critical to the activity of human granulocyte colony stimulating factor, *Biochemistry* 35: 9034-9041 1996; Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup>. 5.581.476; 5.214.132; 5.362.853; 4.904.584). Se ha descrito en la técnica la medida de la actividad de G-SCF (para la medida de la actividad de G-SCF *in vitro* véase por ejemplo Shirafuji, N. y col. 1989, A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders, *Exp. Hematol.* 1989, 17, 116-119; para la medida de la actividad de G-CSF *in vivo* véase por ejemplo Tanaka, H. y col. 1991, Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats, *Cancer Research* 51, 3710-3714, 1991). Publicaciones adicionales donde se muestran ensayos para la medida de la actividad de G-CSF son la Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.555.660; Nohynek, G.J. y col. 1997, Comparison of the potency of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic and non neutropenic CD rats, *Cancer Chemother Pharmacol* (1997) 39; 259-266.

Preferiblemente, el G-SCF se produce de forma recombinante. Esta incluye la expresión en huéspedes procariotas o eucariotas de secuencias de ADN exógeno obtenidas mediante genómica o clonación de ADNc o mediante síntesis de ADN. Los huéspedes procariotas adecuados incluyen diversas bacterias tales como *E. coli*. Los huéspedes eucariotas adecuados incluyen levaduras tales como *S. cerevisiae* y células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino y células de monos.

Se conoce en la técnica la producción recombinante de una proteína. En general, esta incluye la transfección de células huésped con un vector de expresión apropiado, el cultivo de células huésped en condiciones que permitan la producción de la proteína y la purificación de la proteína de las células huésped. Para información detallada véanse por ejemplo Souza, L.M. y col. 1986, Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells, *Science* 1986 232: 61-65, 1986; Nagata, S. y col. 1986, Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor, *Nature* 319: 415-418, 1986; Komatsu, Y. y col. 1987, Cloning of granulocyte colony-stimulating factor cDNA from human macrophages and its expression in *Escherichia coli*, *Jpn J Cancer Res.* 1987 78(11): 1179-1181.

En una forma de realización preferida, el G-CSF tiene la secuencia de aminoácidos del G-SCF maduro humano (véase por ejemplo; Nagata, S. y col. 1986, Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor, *Nature* 319: 415-418, 1986), y puede contener además una metionina en su extremo amino, que da como resultado a continuación una proteína de 175 aminoácidos. Además, en vez de la metionina, G-CSF puede contener un resto de serina o una treonina.

El G-CSF usado en los procedimientos de la presente invención y los conjugados de acuerdo con la presente invención pueden comprender una cadena secundaria de carbohidrato unida al G-CSF mediante glicosilación unida a O en la posición Thr 133, es decir, el G-CSF está glicosilado (V. Gervais y col., *Eur. J. Biochem.* 1997, 247, 386-395). La estructura de la cadena secundaria de carbohidrato puede ser NeuNAc(alfa2-3)Gal(beta1-3)[NeuNAc(alfa2-6)]GalNAc y (alfa2-3)Gal(beta1-3)GalNAc (NeuNAc = ácido N-acetilneurámico, GalNAc = N-acetilgalactosamina).

Se ha sugerido la modificación de G-CSF y de otros tipos de polipéptidos con el fin de introducir al menos una cadena adicional de carbohidrato en comparación con el polipéptido natural (patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.218.092). Dependiendo del hospedador empleado, se puede glicosilar el producto de expresión de G-CSF con carbohidratos de mamíferos u otros eucariotas. Normalmente, cuando se produce G-CSF en células eucariotas, la proteína se glicosila después de la traducción. Consecuentemente, la cadena secundaria de carbohidrato se puede haber unido al G-CSF durante la biosíntesis en mamíferos, especialmente en células de seres humanos, insectos o levaduras.

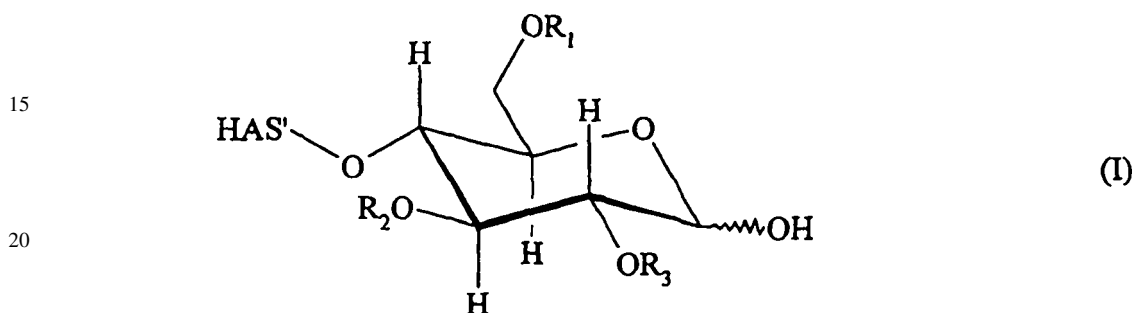
Se usa generalmente G-CSF recombinante humano (rhG-CSF) para tratar diversas formas de leucopenia. De esta manera, están disponibles preparaciones comerciales de rhG-CSF con los nombres filgrastim (Gran<sup>®</sup> and Neupogen<sup>®</sup>), lenograstim (Neutrogin<sup>®</sup> y Granocyte<sup>®</sup>) and nartograstim (Neu-up<sup>®</sup>). Gran<sup>®</sup> y Neupogen<sup>®</sup> no están glicosiladas y se producen en células de *E. coli* recombinantes. Neutrogin<sup>®</sup> y Granocyte<sup>®</sup> están glicosiladas y se producen en células CHO recombinantes y Neu-up<sup>®</sup> no está glicosilada y tiene 5 aminoácidos sustituidos en la región N terminal del rhG-CSF intacto producido en las células de *E. coli* recombinantes.

## ES 2 357 001 T3

Como proteína glicosilada, se puede emplear cualquier G-CSF glicosilado tal como Granocyte<sup>®</sup>, como G-CSF no glicosilado, se puede emplear cualquier G-CSF no glicosilado tal como Neupogen<sup>®</sup> en los procedimientos y en los conjugados de acuerdo con la presente invención.

5 Además, en la posición -1, G-CSF puede contener un resto de aminoácido metionina, un resto serina, o un resto treonina.

En el contexto de la presente invención, el término “almidón hidroxialquílico” (HAS) se refiere a un derivado de almidón que se ha sustituido por al menos un grupo hidroxialquilo. Un almidón hidroxialquílico de la presente invención tiene una constitución de acuerdo con la fórmula (I)



25 en la que se muestra el extremo reductor de la molécula de almidón en la forma no oxidada y se muestra la unidad de sacárido terminal en la forma acetal que, dependiendo por ejemplo, del disolvente, puede estar en equilibrio con la forma aldehído.

30 El término hidroxialquil almidón tal como se usa en la presente invención no está limitado a los compuestos en los que el resto carbohidrato terminal comprende restos hidroxialquilo R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, y/o R<sub>3</sub> tal como se representan, por brevedad, en la fórmula (I), pero se refiere también a compuestos en los que al menos un grupo hidroxilo presente de cualquier forma, tanto en el resto carbohidrato terminal como y/o en la parte restante de la molécula de almidón, HAS', está sustituido por un grupo hidroxialquilo R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, o R<sub>3</sub>.

35 Son también posibles almidones hidroxialquílicos que comprenden dos o más grupos hidroxialquilo diferentes.

40 El al menos un grupo hidroxialquilo comprendido en HAS puede contener dos o más grupos hidroxilo. De acuerdo con una forma de realización preferida, el al menos un grupo hidroxialquílico comprendido en HAS contiene un grupo hidroxilo.

La expresión “almidón hidroxialquílico” incluye también derivados en los el grupo alquilo está mono o polisustituido. En este contexto, se prefiere que el grupo alquilo esté sustituido con un halógeno, especialmente flúor, o con un grupo arilo. Por tanto, el grupo hidroxilo de un grupo hidroxialquilo puede estar esterificado o eterificado.

45 Además, en vez de alquilo, se pueden usar también grupos alqueno lineales o ramificados sustituidos o no sustituidos.

Almidón hidroxialquílico es un derivado de éter de almidón. Además de dichos derivados de éter, se pueden usar también otros derivados de éter en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, son útiles los derivados que comprenden grupos hidroxilo esterificados. Estos derivados pueden ser, por ejemplo, derivados de ácidos mono o dicarboxílicos no sustituidos con 2-12 átomos de carbono o de sus derivados sustituidos. Especialmente útiles son los derivados de ácidos monocarboxílicos no sustituidos con 2-6 átomos de carbono, especialmente derivados del ácido acético. En este contexto, se prefieren acetil almidón, butil almidón y propil almidón.

55 Por tanto, se prefieren derivados de ácidos dicarboxílicos no sustituidos con 2-6 átomos de carbono.

60 En el caso de derivados de ácidos dicarboxílicos, es útil que el segundo grupo carboxilo del ácido dicarboxílico esté también esterificado. Por tanto, en el contexto de la presente invención son también adecuados los derivados de monoalquil ésteres de ácidos dicarboxílicos.

Para los ácidos mono o dicarboxílicos sustituidos, los grupos sustitutos pueden ser preferiblemente los mismos que los mencionados anteriormente para los restos alquilo sustituidos.

65 Se conocen en la materia las técnicas para la esterificación del almidón (véase por ejemplo, Klemm D. y col., Comprehensive Cellulose Chemistry Vol. 2, 1998, Wiley-VCH, Weinheim, Nueva York, especialmente el capítulo 4.4, Esterification of Cellulose (ISBN 3-527-29489-9).

## ES 2 357 001 T3

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, se emplea almidón hidroxialquílico de acuerdo con la fórmula (I). En la fórmula (I), el anillo de sacárido descrito explícitamente y el resto denotado como HAS' representan juntos la molécula de almidón hidroxialquílico preferida. Las otras estructuras de anillo de sacárido comprendidas en HAS' pueden ser iguales que o diferentes del anillo de sacárido descrito explícitamente.

Siempre que estén implicados los restos  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  de acuerdo con la fórmula (I), no existen limitaciones específicas. De acuerdo con una forma de realización preferida,  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquílico, un grupo hidroxiarilo, un grupo hidroxialquilo, un grupo hidroxialcarilo que tiene de entre 2 a 10 átomos de carbono en el resto alquilo respectivo. Se prefieren los grupos hidrógeno e hidroxialquilo que tienen de entre 2 a 10. Más preferiblemente, el grupo hidroxialquilo tiene entre 2 y 6 átomos de carbono, más preferiblemente entre 2 y 4 átomos de carbono, e incluso más preferiblemente entre 2 y 4 átomos de carbono. "Almidón hidroxialquílico" comprende por tanto preferiblemente almidón hidroxietílico, almidón hidroxipropílico y almidón hidroxibutílico, en el que se prefieren particularmente almidón hidroxietílico y almidón hidroxipropílico y se prefiere más almidón hidroxietílico.

El grupo alquilo, arilo, aralquilo y/o alcarilo puede ser lineal o ramificado y sustituido de forma adecuada.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente en el que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquílico lineal o ramificado con entre 1 a 6 átomos de carbono.

De esta manera,  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  pueden ser preferiblemente hidroxihexilo, hidroxipentilo, hidroxibutilo, hidroxipropilo tal como 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 2-hidroxisopropilo, hidroxietilo tal como 2-hidroxietilo, hidrógeno y se prefiere especialmente el grupo 2-hidroxietilo.

Así, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente en el que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo, una forma de realización en la que se prefiere que al menos uno de los restos  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  sea 2-hidroxietilo.

Almidón hidroxietílico (HES) es el más preferido para todas las realizaciones de la presente invención.

Por tanto, la presente invención se refiere al procedimiento y al conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el polímero es almidón hidroxietílico y el derivado polimérico es un derivado de almidón hidroxietílico.

El almidón hidroxietílico (HES) es un derivado de amilopectina que se produce naturalmente y se degrada mediante la alfa amilasa en el cuerpo. HES es un derivado sustituido del polímero de carbohidrato amilopectina, que está presente en el almidón de maíz a una concentración de hasta un 95% en peso. HES presenta propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de sustitución del volumen de la sangre y en una terapia de hemodilución en el ámbito clínico (Sommermeier y col., 1987, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278; y Weidler y col., 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498).

La amilopectina está constituida por restos de glucosa, en los que están presentes enlaces alfa-1,4-glucosídicos en la cadena principal y se encuentran enlaces alfa-1,6-glucosídicos en los sitios de ramificación. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula se determinan principalmente por el tipo de enlaces glucosídicos. Debido al enlace alfa-1,4-glucosídico desnudo, se producen estructuras helicoidales con aproximadamente 6 monómeros de glucosa por vuelta. Las propiedades fisicoquímicas así como las propiedades bioquímicas del polímero se pueden modificar mediante sustitución. Se puede conseguir la introducción de un grupo hidroxietilo mediante hidroxietilación alcalina. Adaptando las condiciones de reacción es posible aprovechar la diferente reactividad del grupo hidroxilo respectivo en el monómero de glucosa no sustituido con respecto a la hidroxietilación. Debido a este hecho, la persona experta es capaz de influenciar el modelo de sustitución en una extensión limitada.

HES se caracteriza principalmente por la distribución de pesos moleculares y el grado de sustitución. Existen dos posibilidades para describir el grado de sustitución:

1. Se puede describir el grado en relación a la porción de monómeros de glucosa sustituidos con respecto a todos los restos de glucosa.
2. Se puede describir el grado de sustitución como la sustitución molar, en la que se describen el número de grupos hidroxietilo por resto de glucosa.

En el contexto de la presente invención, el grado de sustitución, denotado como DS, se refiere a la sustitución molar, tal como se ha descrito anteriormente.

Las soluciones de HES se presentan en forma de composiciones polidispersas, en las que cada molécula difiere de otra con respecto al grado de polimerización, el número y el modelo de sitios de ramificación, y el modelo de sustitución. HES es por tanto una mezcla de compuestos con diferente peso molecular. Por consiguiente, se determina una solución HES particular mediante el peso molecular promedio con la ayuda de medios estadísticos. En este contexto,

## ES 2 357 001 T3

se calcula  $M_n$  como la media aritmética dependiendo del número de moléculas. Alternativamente,  $M_w$  (o MW), el peso promedio, representa una unidad que depende de la masa del HES.

5 En el contexto de la presente invención, el almidón hidroxietílico puede tener preferiblemente un peso molecular promedio (peso promedio) de entre 1 a 300 kD. El almidón hidroxietílico puede presentar adicionalmente un grado de sustitución molar preferido de entre 0,1 a 0,8 y una relación de sustitución preferida entre  $C_2:C_6$  en el intervalo de entre 2 y 20 con respecto a los grupos hidroxietilo.

10 El término "peso molecular promedio" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere al peso tal como se determinó de acuerdo con Sommermeyer y col., 1987, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278; y Weidler y col., 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498.

15 De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el peso molecular promedio del almidón hidroxietílico empleado es de 1 a 300 kD, más preferiblemente de 2 a 200 kD, más preferiblemente de 4 a 130 kD, más preferiblemente de 4 a 70 kD.

20 Un ejemplo de HES con un peso molecular promedio de aproximadamente 130 kD es Voluven<sup>®</sup> de Fresenius. Voluven<sup>®</sup> es un coloide artificial, empleado por ejemplo, para sustitución del volumen usado en la indicación terapéutica para la terapia y la profilaxis de la hipovolemia. Las características de Voluven<sup>®</sup> son un peso molecular promedio de 130.000 +/- 20.000 D, una sustitución molar de 0,4 y una relación  $C_2:C_6$  de aproximadamente 9:1.

25 Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a los conjugados tal como se han descrito anteriormente en el que almidón hidroxietílico es almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de entre 4 a 70 kD.

Los intervalos preferidos del peso molecular promedio son, por ejemplo, 4 a 70 kD o 10 a 70 kD o 12 a 70 kD o 18 a 70 kD o 50 a 70 kD o 4 a 50 kD o 10 a 50 kD o 12 a 50 kD o 18 a 50 kD o 4 a 18 kD o 10 a 18 kD o 12 a 18 kD o 4 a 12 kD o 10 a 12 kD o 4 a 10 kD.

30 De acuerdo con las formas de realización particularmente preferidas de la presente invención, el peso molecular promedio del almidón hidroxietílico empleado está en el intervalo de entre más de 4 kD y por debajo de 70 kD, tal como aproximadamente 10 kD, o en el intervalo de entre 9 a 10 kD o entre 10 a 11 kD o entre 9 a 11 kD, o aproximadamente 12 kD, o en el intervalo de entre 11 a 12 kD o entre 12 a 13 kD o entre 11 a 13 kD, o aproximadamente 18 kD, o en el intervalo de entre 17 a 18 kD o entre 18 a 19 kD o entre 17 a 19 kD, o aproximadamente 50 kD, o en el intervalo de entre 49 a 50 kD o entre 50 a 51 kD o entre 49 a 51 kD.

35 Siempre que esté implicado el grado de sustitución (DS), DS es preferiblemente al menos 0,1, más preferiblemente al menos 0,2, y más preferiblemente al menos 0,4. Los intervalos preferidos de DS son de 0,1 a 0,8, más preferiblemente de 0,2 a 0,8, más preferiblemente de 0,3 a 0,8 e incluso más preferiblemente de 0,4 a 0,8, aún más preferiblemente de 0,1 a 0,7, más preferiblemente de 0,2 a 0,7, más preferiblemente de 0,3 a 0,7 y más preferiblemente de 0,4 a 0,7. Los valores de DS particularmente preferidos son, por ejemplo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8, siendo más preferidos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8, siendo incluso más preferidos 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8, siendo incluso aún más preferidos 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 y, por ejemplo, siendo particularmente preferidos 0,4 y 0,7.

45 Las combinaciones particularmente preferidas de pesos moleculares del almidón hidroxialquílico, preferiblemente almidón hidroxietílico, y su grado de sustitución DS son, por ejemplo, 10 kD y 0,4 o 10 kD y 0,7 o 12 kD y 0,4 o 12 kD y 0,7 o 18 kD y 0,4 o 18 kD y 0,7 o 50 kD y 0,4 o 50 kD y 0,7.

50 En otra forma de realización preferida de la presente invención, el almidón hidroxietílico (como el empleado así como el contenido en los conjugados descritos en el presente documento) tiene un peso molecular de entre 20 kD a 130 kD (es decir, 40 kD, 50 kD, 60 kD, 70 kD, 80 kD, 90 kD, 100 kD, 110 kD, 120 kD, 130 kD) preferiblemente un peso molecular promedio de 30 kD a 100 kD, más preferiblemente de 40 a 70 kD, y un grado de sustitución de 0,4 a 0,8, más preferido de 0,5 a 0,8.

55 En este contexto, se entiende que el término "30 kD" se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 25 kD a 34 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33 o 34 kD.

60 En este contexto, se entiende que el término "40 kD" se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 35 kD a 44 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43 o 44 kD.

65 En este contexto, se entiende que el término "50 kD" se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 45 kD a 54 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 46, 47, 48, 49, 51, 52, 53 o 54 kD.

## ES 2 357 001 T3

En este contexto, se entiende que el término “60 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 55 kD a 64 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63 o 64 kD.

5 En este contexto, se entiende que el término “70 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 65 kD a 74 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73 o 74 kD.

10 En este contexto, se entiende que el término “80 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 75 kD a 84 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83 o 84 kD.

15 En este contexto, se entiende que el término “90 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 85 kD a 94 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93 o 94 kD.

20 En este contexto, se entiende que el término “100 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 95 kD a 104 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 96, 97, 98, 99, 101, 102, 103 o 104 kD.

En este contexto, se entiende que el término “110 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 105 kD a 114 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 106, 107, 108, 109, 111, 112, 113 o 114 kD.

25 En este contexto, se entiende que el término “120 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 115 kD a 124 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 116, 117, 118, 119, 121, 122, 123 o 124 kD.

30 En este contexto, se entiende que el término “130 kD” se refiere a un peso molecular promedio en el intervalo de entre 125 kD a 134 kD, es decir incluyendo también los almidones que tienen un peso molecular promedio de 126, 127, 128, 129, 131, 132, 133 o 134 kD.

35 De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 30 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

40 De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 40 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

45 De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

50 De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 60 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

55 De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 70 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

60 De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 80 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

65 De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 90 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.



## ES 2 357 001 T3

De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 100 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 110 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 120 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

De acuerdo con esto, la forma de realización descrita anteriormente comprende también un almidón hidroxietílico (y los conjugados descritos en el presente documento que comprenden el almidón hidroxietílico así como los procedimientos descritos en el presente documento que emplean almidón hidroxietílico) que tiene un peso molecular promedio de 130 kD y un grado de sustitución de 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8, preferiblemente 0,6, 0,7 o 0,8.

Un ejemplo de HES que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 130 kD es un HES con un grado de sustitución de 0,2 a 0,8 tal como 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, o 0,8, preferiblemente de 0,4 a 0,7 tal como 0,4, 0,5, 0,6, o 0,7.

Siempre que esté implicada la relación de sustitución  $C_2:C_6$ , dicha sustitución está preferiblemente en el intervalo de entre 2 a 20, más preferiblemente en el intervalo de entre 2 a 15, e incluso más preferiblemente en el intervalo de entre 3 a 12.

De acuerdo con una forma de realización adicional de la presente invención, se pueden emplear también mezclas de almidones hidroxietílicos que tengan diferentes pesos moleculares promedio y/o diferentes grados de sustitución y/o diferentes relaciones de sustitución  $C_2:C_6$ . Por tanto, se pueden emplear mezclas de almidones hidroxietílicos que tengan diferentes pesos moleculares promedio y diferentes grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución  $C_2:C_6$ , o que tengan diferentes pesos moleculares promedio y diferentes grados de sustitución y la misma relación de sustitución  $C_2:C_6$ , o que tengan diferentes pesos moleculares promedio y los mismos grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución  $C_2:C_6$ , o que tengan los mismos pesos moleculares promedio y diferentes grados de sustitución y la misma relación de sustitución  $C_2:C_6$ , o que tengan diferentes pesos moleculares promedio y el mismo grado de sustitución y la misma relación de sustitución  $C_2:C_6$ , o que tengan los mismos pesos moleculares promedio y diferentes grados de sustitución y la misma relación de sustitución  $C_2:C_6$ , o que tengan los mismos pesos moleculares promedio y los mismos grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución  $C_2:C_6$ , o que tengan los mismos pesos moleculares promedio y los mismos grados de sustitución y las mismas relaciones de sustitución  $C_2:C_6$ .

En diferentes conjugados y/o en diferentes procedimientos de acuerdo con la presente invención, se pueden emplear diferentes almidones hidroxialquílicos, preferiblemente diferentes mezclas de almidones hidroxietílicos y/o diferentes mezclas de almidones hidroxialquílicos, preferiblemente diferentes mezclas de almidones hidroxietílicos.

La reacción de aminación reductora de acuerdo con la invención, en la que el polímero o derivado polimérico se une covalentemente mediante al menos un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal a al menos un grupo amino de la proteína, se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de entre 0 a 40°C, más preferiblemente de entre 0 a 25°C y de manera especialmente preferible de entre 4 a 21°C. El tiempo de reacción varía preferiblemente de entre 0,5 a 72 h, más preferiblemente de entre 2 a 48 h y de manera especialmente preferible de entre 4 a 7 h. Como disolvente de la reacción, se prefiere un medio acuoso.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 a 21°C.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo en un medio acuoso.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 a 21°C en un medio acuoso.

## ES 2 357 001 T3

El término “medio acuoso”, tal como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a un disolvente o a una mezcla de disolventes que comprende agua en el intervalo de entre al menos 10% en peso, más preferiblemente al menos 20% en peso, más preferiblemente al menos 30% en peso, más preferiblemente al menos 40% en peso, más preferiblemente al menos 50% en peso, más preferiblemente al menos 60% en peso, más preferiblemente al menos 70% en peso, más preferiblemente al menos 80% en peso, incluso más preferiblemente al menos 90% en peso o hasta 100% en peso, basándose en el peso de los disolventes implicados. El medio de reacción preferido es agua.

El valor del pH del medio de reacción está generalmente en el intervalo de entre 4 a 9 o entre 4 a 8 o entre 4 a 7,3.

De acuerdo con la forma de realización preferida de la presente invención, el pH al cual se lleva a cabo la reacción de aminación reductora está por debajo de 7,3, más preferiblemente más pequeño o igual a 7 y lo más preferible por debajo de 7, es decir, en el intervalo ácido. Los intervalos preferidos son por tanto de entre 3 a por debajo de 7, más preferiblemente de entre 3,5 a 6,5, aún más preferiblemente de entre 4 a 6, aún más preferiblemente de entre 4,5 a 5,5 y de manera especialmente preferible aproximadamente 5,0, es decir, 4,6 o 4,7 o 4,8 o 4,9 o 5,0 o 5,1 o 5,2 o 5,3 o 5,4. Intervalos preferidos son, entre otros, 3 a 6,9 o 3 a 6,5 o 3 a 6 o 3 a 5,5 o 3 a 5 o 3 a 4,5 o 3 a 4 o 3 a 3,5 o 3,5 a 6,9 o 3,5 a 6,5 o 3,5 a 6 o 3,5 a 5,5 o 3,5 a 5 o 3,5 a 4,5 o 3,5 a 4 o 4 a 6,9 o 4 a 6,5 o 4 a 6, o 4 a 5,5 o 4 a 5 o 4 a 4,5 o 4,5 a 6,9 o 4,5 a 6,5 o 4,5 a 6 o 4,5 a 5,5 o 4,5 a 5 o 5 a 6,9 o 5 a 6,5 o 5 a 6 o 5 a 5,5 o 5,5 a 6,9 o 5,5 a 6,5 o 5,5 a 6 o 6 a 6,9 o 6 a 6,5 o 6,5 a 6,9.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo a pH 7 o inferior, más preferiblemente a un pH de 6 o inferior.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 a 21°C a un pH de 7 o inferior, preferiblemente de 6 o inferior.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo en un medio acuoso a un pH de 7 o inferior, preferiblemente de 6 o inferior.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado y al como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 a 21°C en un medio acuoso a un pH de 7 o inferior, preferiblemente de 6 o inferior.

La relación molar de derivado polimérico:proteína usada para la reacción está preferiblemente en el intervalo de 200:1 a 5:1, más preferiblemente de entre 100:1 a 10:1 y de manera especialmente preferible de entre 75:1 a 20:1.

Se encontró sorprendentemente que era posible, especialmente a los intervalos de pH preferidos proporcionados anteriormente, particularmente a un pH por debajo de 7 y mayor o igual a 4, hacer reaccionar el derivado polimérico predominantemente con el grupo amino localizado en el extremo N de la proteína. El término “predominantemente” tal como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a una forma de realización en la que al menos un 80%, preferiblemente al menos un 85% de los grupos amino N terminales disponibles se hacen reaccionar mediante aminación reductora. Es también posible hacer reaccionar al menos un 90% o al menos un 95% o al menos un 96% o al menos un 97% o al menos un 98% o al menos un 99% de los grupos amino N terminales disponibles. Aunque no se puede descartar completamente el acoplamiento con grupos amino diferentes del grupo amino N terminal, se piensa que el acoplamiento mediante aminación reductora de acuerdo con la presente invención a un pH por debajo de 7, preferiblemente por debajo de 6, tiene lugar esencialmente de manera selectiva en el grupo amino del extremo N.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la proteína comprende el grupo amino del extremo N y al menos un grupo amino adicional, dicho conjugado comprende el polímero que se está acoplando predominantemente con el grupo amino del extremo N.

De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento de unión del almidón hidroxialquílico funcionalizado con aldehído o ceto o hemiacetal o un derivado de almidón hidroxialquílico funcionalizado con aldehído o ceto o hemiacetal con el grupo amino del extremo N de una proteína, comprendiendo dicho procedimiento someter dicho almidón hidroxialquílico o derivado del mismo a una reacción de aminación reductora, a un pH de 7 o inferior, preferiblemente a un pH de 6 o inferior, llevándose a cabo dicha reacción de aminación reductora preferiblemente en un medio acuoso.

De acuerdo con la presente invención, se prefiere el almidón hidroxialquílico funcionalizado con aldehído o un derivado de almidón hidroxialquílico funcionalizado con aldehído.

De acuerdo con una forma de realización más adicional preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento de unión de un almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído o ceto o hemiacetal o un derivado de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído o ceto o hemiacetal de manera selectiva al grupo amino del extremo N de

## ES 2 357 001 T3

una proteína, comprendiendo dicho procedimiento someter dicho almidón hidroxialquílico o un derivado del mismo a una reacción de aminación reductora, a un pH de 7 o inferior, preferiblemente a un pH de 6 o inferior, llevándose a cabo dicha reacción de aminación reductora preferiblemente en un medio acuoso, siendo el almidón hidroxietílico empleado almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10 kD y un DS de aproximadamente 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 10 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 12 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 12 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,7.

La reacción del derivado polimérico y la proteína entre el grupo aldehído o el grupo ceto o el grupo hemiacetal y el grupo amino es una aminación reductora en la que se produce una base de Schiff. Posteriormente después de la reacción, se puede reducir esta base por al menos un agente reductor para dar un enlace estable entre el derivado polimérico y la proteína. Es también posible llevar a cabo la reacción en presencia de al menos un agente reductor. De acuerdo con una forma de realización preferida, la reacción de aminación reductora se lleva a cabo en presencia de al menos un agente reductor.

Los agentes reductores preferidos son borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, compuestos complejos de borano orgánico tales como complejo de 4-(dimetilamina)piridina borano, complejo de N-etildisopropilamina borano, complejo de N-etilmorfolina borano, complejo de N-metilmorfolina borano, complejo de N-fenilmorfolina borano, complejo de lutidina borano, complejo de trietilamina borano, o complejo de trimetilamina borano. Particularmente preferido es el cianoborohidruro de sodio.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo en presencia de  $\text{NaCNBH}_3$ .

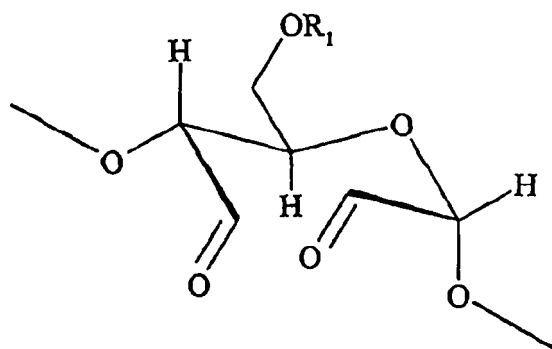
Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo en un medio acuoso a un pH de 7 o inferior, preferiblemente de 6 o inferior, en presencia de un agente reductor, preferiblemente  $\text{NaCNBH}_3$ .

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la aminación reductora se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 a 21°C en un medio acuoso a un pH de 7 o inferior, preferiblemente de 6 o inferior, en presencia de un agente reductor, preferiblemente  $\text{NaCNBH}_3$ .

La relación molar del derivado polimérico:proteína usada para la reacción está preferiblemente en el intervalo de entre 200:1 a 10:1, más preferiblemente de entre 100:1 a 10:1 y de manera especialmente preferible de entre 75:1 a 20:1.

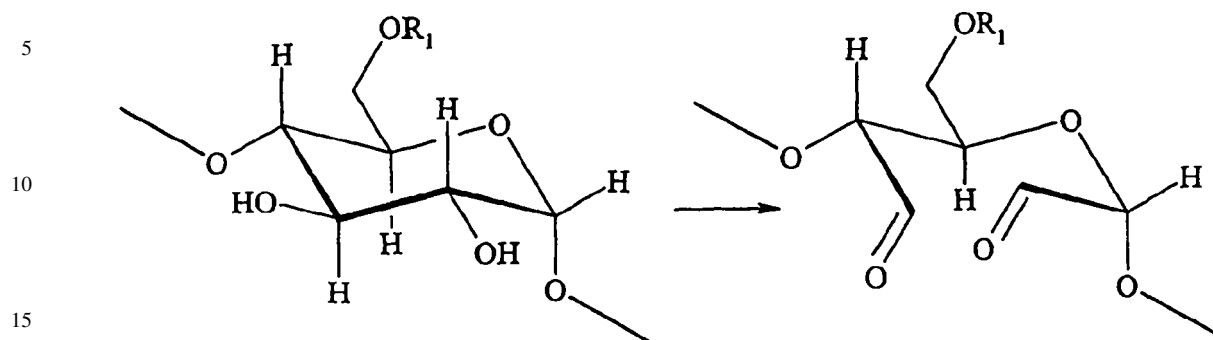
Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento para producir un conjugado, comprendiendo dicho procedimiento hacer reaccionar un polímero o un derivado polimérico que comprende un grupo aldehído en un medio acuoso con un grupo amino de la proteína en presencia de un agente reductor, siendo preferiblemente dicho agente reductor  $\text{NaCNBH}_3$ .

De acuerdo con la primera forma de realización preferida de la presente invención, de acuerdo con la cual el polímero comprende al menos dos grupos aldehído que se introducen en el polímero mediante una reacción de oxidación de apertura de anillo, el polímero comprende preferiblemente al menos una estructura de acuerdo con la fórmula



De acuerdo con esta forma de realización de la presente invención, se puede emplear cada agente de oxidación o combinación de agentes de oxidación que sea capaz de oxidar al menos un anillo de sacárido del polímero para dar un anillo de sacárido abierto que tiene al menos uno, preferiblemente al menos dos grupos aldehído. Esta reacción se

ilustra por el siguiente esquema de reacción que muestra un anillo de sacárido del polímero que se oxida para dar un anillo abierto que tiene dos grupos aldehído:



Los agentes oxidantes adecuados son, entre otros, periodatos tales como periodatos de metales alcalinos o mezclas de dos o más de los mismos, prefiriéndose el periodato de sodio y el periodato de potasio.

20 Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el polímero se somete a una reacción de oxidación de apertura de anillo usando un periodato para dar un derivado polimérico que tiene al menos uno, preferiblemente al menos dos grupos aldehído.

25 Para esta reacción de oxidación, se puede emplear el polímero con su extremo reductor tanto en la forma oxidada como en la no oxidada, prefiriéndose la forma no oxidada.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que emplea el polímero con su extremo reductor en la forma no oxidada.

30 La temperatura de reacción está en un intervalo preferido de entre 0 a 40°C, más preferiblemente de entre 0 a 25°C y de manera especialmente preferible de entre 0 a 5°C. El tiempo de reacción está en un intervalo preferido de entre 1 min a 5 h y de manera especialmente preferible de entre 10 min a 4 h. Dependiendo del grado deseado de oxidación, es decir, del número de grupos aldehído resultantes de la reacción de oxidación, se puede escoger apropiadamente la relación molar de periodato:polímero.

35 Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la reacción de oxidación de apertura de anillo se lleva a cabo a una temperatura de entre 0 a 5°C.

40 La reacción de oxidación del polímero con el periodato se lleva a cabo preferiblemente en un medio acuoso, lo más preferible en agua.

45 Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la reacción de oxidación de apertura de anillo se lleva a cabo en un medio acuoso. El valor de pH adecuado de la mezcla de reacción puede ajustarse añadiendo al menos un tampón adecuado. Entre los tampones preferidos, se pueden mencionar tampón de acetato de sodio, tampones de fosfato o borato.

50 El almidón hidroxietílico sometido a dicha reacción de apertura de anillo es preferiblemente almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 10 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 10 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 12 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 12 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,7.

55 Se puede purificar el derivado polimérico resultante de la mezcla de reacción mediante al menos un procedimiento adecuado. Si es necesario, se puede precipitar el derivado polimérico antes del aislamiento mediante al menos un procedimiento adecuado.

60 Si el derivado polimérico se precipita en primer lugar, es posible, por ejemplo, poner en contacto la mezcla de reacción con al menos un disolvente o mezcla de disolventes diferente que el disolvente o la mezcla de disolventes presente en la mezcla de reacción a temperaturas adecuadas. De acuerdo con una forma de reacción particularmente preferida de la presente invención en la que un medio acuoso, preferiblemente agua, se usa como disolvente, se pone en contacto la mezcla de reacción con 2-propanol o con una mezcla de acetona y etanol, preferiblemente una mezcla 1:1 (v/v), que indica volúmenes iguales de dichos compuestos, a una temperatura, preferiblemente en el intervalo de entre -20 a +50°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de entre -20 a 25°C.

## ES 2 357 001 T3

Se puede llevar a cabo el aislamiento del derivado polimérico mediante un procedimiento adecuado que puede comprender una o más etapas. De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el derivado polimérico se separa en primer lugar de la mezcla de reacción o la mezcla de la mezcla de reacción con, por ejemplo, una mezcla acuosa de 2-propanol, mediante un procedimiento adecuado tal como centrifugación o filtración. En una  
5 segunda etapa, el derivado polimérico separado se puede someter a un tratamiento adicional tal como una diálisis de tipo postratamiento, filtración centrífuga o filtración a presión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa, HPLC, MPLC, filtración en gel y/o liofilización. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, el derivado polimérico separado se dializa en primer lugar, preferiblemente frente a agua, y a continuación se liofiliza hasta que el contenido de disolvente del producto de reacción es suficientemente bajo de acuerdo con las  
10 especificaciones deseadas del producto. Se puede llevar a cabo la liofilización a una temperatura de entre 20 a 35°C, preferiblemente de entre 20 a 30°C.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el polímero oxidado resultantes de la reacción de oxidación se purifica usando al menos un procedimiento adecuado tal como ultrafiltración y/o diálisis con el fin de, por ejemplo,  
15 eliminar sales indeseables de bajo peso molecular y componentes poliméricos, ofreciendo por tanto también un medio de controlar el intervalo de pesos moleculares del polímero oxidado.

Se puede usar directamente el polímero oxidado para la reacción con la proteína o se recupera adecuadamente en una primera etapa, por ejemplo, mediante liofilización, y se vuelve a disolver en agua para la conjugación con la  
20 proteína en una segunda etapa. Como para el acoplamiento de al menos un grupo amino de la proteína con al menos un grupo aldehído del polímero mediante aminación reductora, se hace referencia a la anterior divulgación detallada que se refiere a los parámetros de reacción específicos de la reacción de aminación reductora tales como el pH o la temperatura.

De acuerdo con la segunda forma de realización preferida, se hace reaccionar el polímero con al menos un compuesto bifuncional que comprende al menos un grupo funcional M capaz de hacerse reaccionar con el polímero y al  
25 menos un grupo funcional Q que es un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal y que se hace reaccionar con un grupo amino de la proteína mediante aminación reductora.

Se puede usar directamente el polímero oxidado para la reacción con la proteína o se recupera adecuadamente en una primera etapa, por ejemplo, mediante liofilización, y se vuelve a disolver en agua para la conjugación con la  
30 proteína en una segunda etapa. Como para el acoplamiento de al menos un grupo amino de la proteína con al menos un grupo aldehído del polímeros mediante aminación reductora, se hace referencia a la anterior divulgación detallada que se refiere a los parámetros de reacción específicos de la reacción de aminación reductora tales como el pH o la  
35 temperatura. De acuerdo con las formas de realización especialmente preferidas de la presente invención, la aminación reductora se lleva preferiblemente a cabo a una temperatura de entre 0 a 5°C tal como aproximadamente 4°C a un pH de aproximadamente 4,5 a 5,5 tal como aproximadamente 5,0 y para un tiempo de reacción de aproximadamente 20 a 30 h tal como aproximadamente 24 h.

De acuerdo con la segunda forma de realización preferida, se hace reaccionar el polímero con al menos un compuesto bifuncional que comprende al menos un grupo funcional M capaz de hacerse reaccionar con el polímero y al  
40 menos un grupo funcional Q que es un grupo aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal y que se hace reaccionar con un grupo amino de la proteína mediante aminación reductora.

Se prefiere emplear un compuesto que tenga, aparte del grupo aldehído o grupo ceto o grupo hemiacetal, al menos un grupo carboxilo o al menos un grupo carboxilo reactivo, preferiblemente un grupo carboxilo o un grupo carboxilo  
45 reactivo. Se puede separar el grupo aldehído o el grupo ceto o el grupo hemiacetal y el grupo carboxilo o el grupo carboxilo reactivo mediante cualquier separador adecuado. Entre otros, el separador puede ser un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico opcionalmente sustituido. Generalmente, el resto hidrocarburo tiene entre 1 y 60, preferi-  
50 blemente entre 1 y 40, más preferiblemente entre 1 y 20, más preferiblemente entre 2 y 10, más preferiblemente entre 2 y 6 y de manera especialmente preferible entre 2 y 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo separador comprende generalmente entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 8 y de manera especialmente preferible entre 1 y 4 heteroátomos. El resto hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificado o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, entre 5 y 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo,  
55 un grupo alcarilo en el que la parte alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, el resto hidrocarburo es un resto arilo que tiene 5 a 7 y preferiblemente 6 átomos de carbono. Lo más preferible, el resto hidrocarburo es el resto benceno. De acuerdo con esta forma de realización preferida, el grupo carboxilo y el grupo aldehído se pueden localizar en el anillo de benceno en la posición 1,4, posición 1,3 o posición 1,2, prefiriéndose la posición 1,4.

Como grupos carboxilo reactivos se pueden mencionar, un éster reactivo, isotiocianatos o isocianatos. Los ésteres reactivos preferidos se derivan de N-hidroxisuccinimidas tales como N-hidroxisuccinimida o sulfo-N-hidroxisuc-  
65 cinimida, fenoles sustituidos adecuados tales como p-nitrofenol, o,p-dinitrofenol, o,o'-dinitrofenol, triclorofenol tal como 2,4,6-triclorofenol o 2,4,5-triclorofenol, trifluorofenol tal como 2,4,6-trifluorofenol o 2,4,5-trifluorofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, o hidroxiazoles tales como hidroxibenzotriazol. Especialmente preferidas son las N-hidroxisuccinimidas, prefiriéndose especialmente la N-hidroxisuccinimida y la sulfo-N-hidroxisuccinimida. Se pueden emplear todos los alcoholes individualmente o como una combinación adecuada de dos o más de los mismos. Como éster reactivo, se prefieren especialmente pentafluorofenil éster y éster de N-hidroxisuccinimida.

## ES 2 357 001 T3

De esta manera, de acuerdo con una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado como se ha descrito anteriormente, en el que el polímero se hace reaccionar con ácido formilbenzoico.

5 De acuerdo con otra forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado como se ha descrito anteriormente, en el que el polímero se hace reaccionar con pentafluorofenil éster del ácido formilbenzoico.

10 De acuerdo con otra forma más de realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado como se ha descrito anteriormente, en el que se hace reaccionar el polímero con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido formilbenzoico.

15 De acuerdo con otra forma más de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado como se ha descrito anteriormente, en el que se hace reaccionar el polímero con ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi) butírico.

El almidón hidroxietílico sometido a la reacción con el compuesto que comprende M, siendo M preferiblemente un grupo carboxilo o un grupo carboxilo reactivo y siendo Q un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal, es más preferiblemente un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 10 kD y un DS de 0,7. Son también posibles almidones hidroxietílicos que tienen un peso molecular promedio de 10 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 12 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 12 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,7 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,7. Particularmente preferible, el almidón hidroxietílico e incluso más preferiblemente el almidón hidroxietílico se emplea con un extremo reductor en la forma oxidada.

El derivado polimérico resultante con el grupo aldehído o el grupo ceto o el grupo hemiacetal se hace reaccionar posteriormente con un grupo amino de la proteína mediante aminación reductora. Como para el acoplamiento de al menos un grupo amino de la proteína con al menos un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal del polímero mediante aminación reductora, se hace referencia a la anterior divulgación detallada que se refiere a los parámetros de reacción específicos de la reacción de aminación reductora tales como el pH o la temperatura. De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida de la presente invención, la reacción con el grupo amino de la proteína se lleva preferiblemente a cabo a una temperatura de entre 0 a 40°C, más preferiblemente de entre 0 a 25°C y de manera especialmente preferible de entre 4 a 21°C El tiempo de reacción varía preferiblemente de entre 30 min a 72 h, más preferiblemente de entre 2 a 48 h y de manera especialmente preferible de entre 4 a 17 h. Como disolvente para la reacción, se prefiere un medio acuoso. El valor del pH del medio de reacción está preferiblemente en el intervalo de entre 4 a 9, más preferiblemente de entre 4 a 8 y de manera especialmente preferible de entre 4,5 a 5,5.

40 De acuerdo con la tercera forma de realización preferida, se hace reaccionar el polímero en su extremo reductor opcionalmente oxidado con al menos un compuesto bifuncional que comprende un grupo amino M y un grupo funcional Q, en el que dicho grupo amino M se hace reaccionar con el extremo reductor opcionalmente oxidado y en el que el grupo funcional Q está modificado químicamente para dar un derivado polimérico funcionalizado con aldehído que se hace reaccionar con un grupo amino de la proteína mediante aminación reductora.

Como para el grupo funcional Q, se van a mencionar, entre otros, los siguientes grupos funcionales:

- dobles enlaces C-C o triples enlaces C-C o enlaces C-C aromáticos;
- 50 - el grupo tio o los grupos hidroxilo;
- hidrazida del ácido alquil sulfónico, hidrazida del ácido aril sulfónico;
- 55 - 1,2-dioles;
- 1,2 amino-tioalcoholes;
- azidas;
- 60 - 1,2 -aminoalcoholes;
- el grupo amino -NH<sub>2</sub> o los derivados de los grupos amino que comprenden la unidad de estructura -NH- tal como grupos aminoalquilo, grupo aminoarilo, grupos aminoaralquilo, o grupos alcarilamino;
- 65 - el grupo hidroxilamino -O-NH<sub>2</sub>, o los derivados del grupo hidroxilamino que comprende la unidad de estructura -O-NH-, tales como grupos hidroxialquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino, o grupos hidroxialcarilamino;

## ES 2 357 001 T3

- grupos alcoxiamino, grupos ariloxiamino, grupos aralquioxiamino, grupos alcariloxiamino, comprendiendo cada uno la unidad de estructura -NH-O-;

5

- restos que tienen un grupo carbonilo, -Q-C(=G)-M, en el que G es O u S, y M es, por ejemplo,

-- -OH o -SH;

-- un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo aralquioxilo, o un grupo alcariloxilo;

10

-- un grupo alquiltio, un grupo ariltio, un grupo aralquiltio, o un grupo alcariltio;

-- un grupo alquilcarboniloxilo, un grupo arilcarboniloxilo, un grupo aralquilcarboniloxilo, un grupo alcaril-carboniloxilo;

15

-- ésteres activados tales como ésteres de hidroxilaminas que tienen estructura de imida tal como N-hidroxi-succinimida o que tienen una unidad de estructura O-N en la que N es parte de un compuesto heteroarilo o, con G = O y Q ausente, tal como compuestos ariloxilo con un resto de arilo sustituido tal como penta-fluorofenilo, paranitrofenilo o triclorofenilo;

20

en el que Q está ausente o es NH o un heteroátomo tal como S u O;

- -NH-NH<sub>2</sub>, o -NH-NH-;

25

- -NO<sub>2</sub>;

- el grupo nitrilo;

- grupos carbonilo tales como el grupo aldehído o el grupo ceto;

30

- el grupo carboxilo;

- el grupo -N=C=O o el grupo -N=C=S;

35

- grupos de haluro de vinilo tales como el grupo yoduro de vinilo o el bromuro de vinilo o triflato;

- -C=C-H;

- -(C=NH<sub>2</sub>Cl)-OAlquilo

40

- grupos -(C=O)-CH<sub>2</sub>-Hal en los que Hal es C, Br, o I;

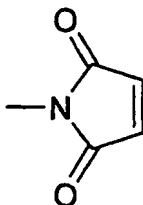
- -CH=CH-SO<sub>2</sub>-;

45

- un grupo disulfuro que comprende la estructura -S-S-;

- el grupo

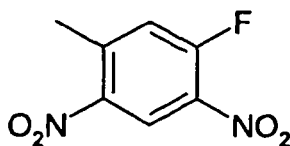
50



55

- el grupo

60



65

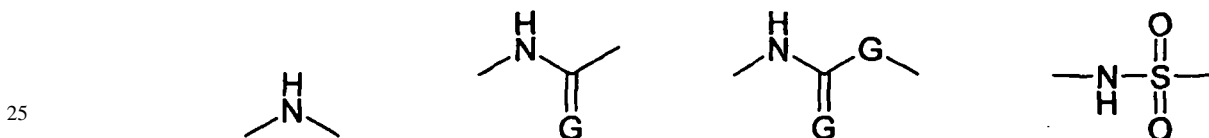
## ES 2 357 001 T3

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el término “grupo funcional Q” se refiere a un grupo funcional Q que comprende la estructura química -NH-.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo funcional M es un grupo que tiene la estructura R'-NH- en la que R es un hidrógeno o un resto alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo en el que el resto cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo puede unirse directamente al grupo NH o, de acuerdo con otra forma de realización, puede unirse mediante un puente de oxígeno al grupo NH. Los restos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo, o cicloalquilarilo se pueden sustituir adecuadamente. Como sustituyentes preferidos, se pueden mencionar halógenos tales como F, Cl o Br. Los restos R' especialmente preferidos son grupos hidrógeno, alquilo y alcoxilo, e incluso más preferidos son los grupos hidrógeno y alquilo y alcoxilo no sustituidos.

Entre los grupos alquilo y alcoxilo, se prefieren los grupos con 1, 2, 3, 4, 5, o 6 átomos de carbono. Son más preferidos los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, e isopropoxilo. Se prefieren especialmente metilo, etilo, metoxilo, etoxilo, y se proporciona preferencia particular a metilo o metoxi.

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, el grupo funcional M tiene la estructura R'-NH-R''- en el que R'' comprende preferiblemente la unidad de estructura -NH- y/o la unidad de estructura -(C=G) en la que G es O u S, y/o la unidad de estructura -SO<sub>2</sub>-. Los ejemplos específicos del grupo funcional R'' son

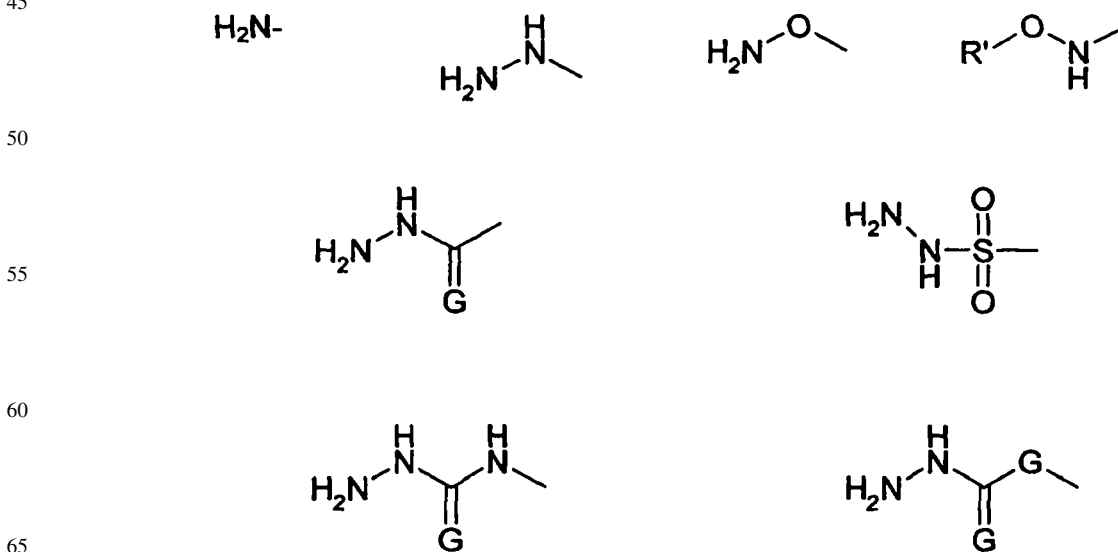


30 y



40 en el que, si G está presente dos veces, es independientemente O u S.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha mencionado anteriormente en el que el grupo funcional M se selecciona entre el grupo que consiste en



en las que G es O u S y, si está presente dos veces, independientemente O u S, y R' es metilo.



## ES 2 357 001 T3

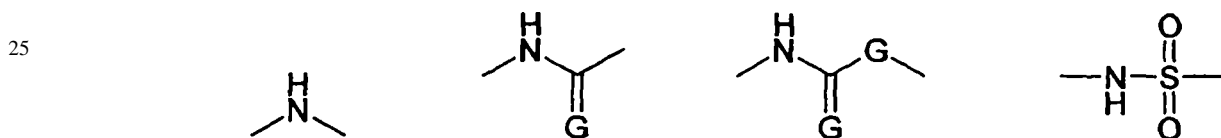
De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el grupo funcional M es un grupo amino  $\text{-NH}_2$ .

El término "grupo amino Q" se refiere a un grupo funcional Q que comprende la estructura química  $\text{-NH-}$ .

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo funcional Q es un grupo que tiene la estructura  $\text{R}'\text{-NH-}$  en la que  $\text{R}'$  es hidrógeno o un resto alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo en el que el resto cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo se puede unir directamente al grupo  $\text{NH}$  o, de acuerdo con otra forma de realización, se puede unir mediante un puente de oxígeno al grupo  $\text{NH}$ . Los restos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo se pueden sustituir adecuadamente. Como sustituyentes preferidos, se pueden mencionar halógenos tales como F, Cl o Br. Los restos  $\text{R}'$  especialmente preferidos son grupos hidrógeno, alquilo y alcoxilo, e incluso más preferidos son hidrógeno y los grupos alquilo y alcoxilo no sustituidos.

Entre los grupos alquilo y alcoxilo, se prefieren grupos con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de C. Más preferidos son los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, e isopropoxilo. Especialmente preferidos son metilo, etilo, metoxilo, etoxilo, y se proporciona particular preferencia a metilo o metoxilo.

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, el grupo funcional Q tiene la estructura  $\text{R}'\text{-NH-R}''$  en la que  $\text{R}''$  comprende preferiblemente la unidad de estructura  $\text{-NH-}$  y/o la unidad de estructura  $\text{-(C=G)-}$  en la que G es O u S, y/o la unidad de estructura  $\text{-SO}_2\text{-}$ . De acuerdo con las formas más preferidas, el grupo funcional  $\text{R}''$  se selecciona entre el grupo que consiste en

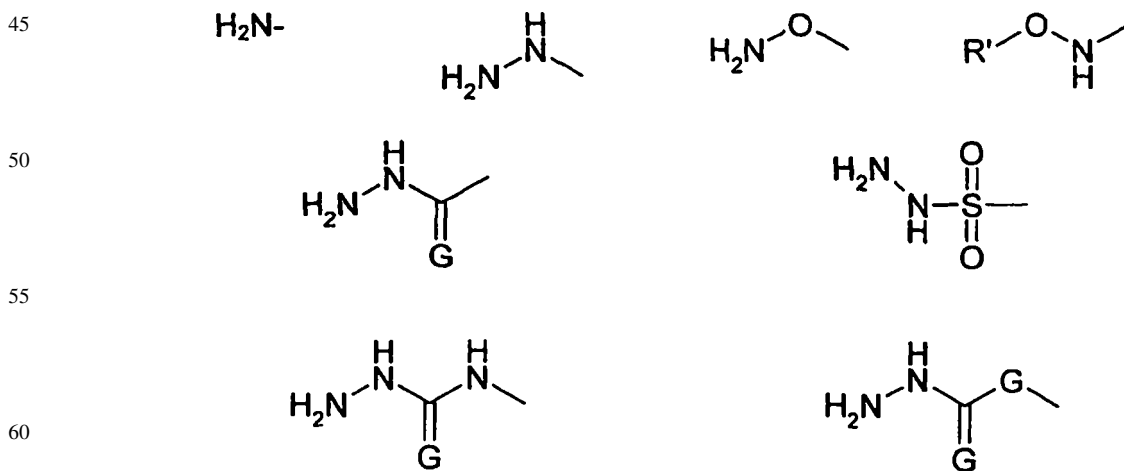


30 y



40 en las que, si G está presente dos veces, es independientemente O u S.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha mencionado anteriormente en el que el grupo funcional Q se selecciona entre el grupo que consiste en



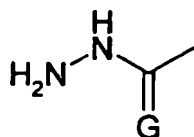
65 en las que G es O u S y, si está presente dos veces, es independientemente O u S, y  $\text{R}'$  es metilo.

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el grupo funcional Q es un grupo amino  $\text{-NH}_2$ .

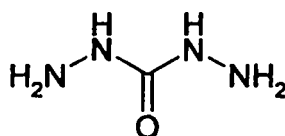
## ES 2 357 001 T3

De acuerdo con una forma más adicional preferida de la presente invención, M y Q comprenden un grupo amino -NH-. De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, M y Q son un grupo amino NH<sub>2</sub>.

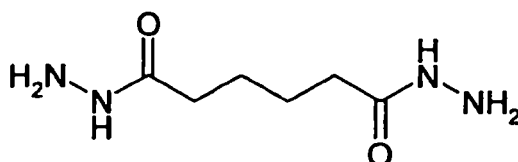
De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto que comprende M y Q es un compuesto homobifuncional, mas preferiblemente un compuesto homobifuncional que comprende, como grupos funcionales M y Q, lo más preferible el grupo amino -NH<sub>2</sub>, o, de acuerdo con otras formas de realización, el grupo hidroxilamino -O-NH<sub>2</sub> o el grupo



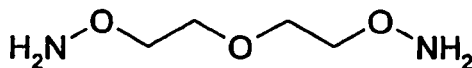
siendo G preferiblemente O. Los ejemplos específicos de estos compuestos que comprenden M y Q son



o



o



El almidón hidroxietílico sometido a la reacción con el compuesto que comprende M, siendo M preferiblemente un grupo amino -NH- y siendo más preferiblemente un grupo amino -NH<sub>2</sub>, comprendiendo aún más preferiblemente M y Q un grupo amino -NH- y de manera particularmente preferible, comprendiendo M y Q un grupo amino -NH<sub>2</sub>, es preferiblemente almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 10 kD y un DS de 0,4 o un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 10 kD y un DS de 0,7. Son también posibles almidones hidroxietílicos que tienen tanto un peso molecular de 12 kD y un DS de 0,4 como un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 12 kD y un DS de 0,7 como un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,4 como un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 18 kD y un DS de 0,7 como un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,4 como un almidón hidroxietílico que tiene un peso molecular promedio de 50 kD y un DS de 0,7.

En ambos casos M y Q son un grupo amino -NH<sub>2</sub>, M y Q se pueden separar mediante cualquier separador adecuado. Entre otros, el separador puede ser un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico sustituido. Generalmente, el resto hidrocarburo tiene entre 1 y 60, preferiblemente entre 1 y 40, más preferiblemente entre 1 y 20, más preferiblemente entre 2 y 10, más preferiblemente entre 2 y 6 y de manera especialmente preferible entre 2 y 40 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo separador comprende generalmente entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 8 y de manera especialmente preferible entre 1 y 4 heteroátomos. El resto hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, entre 5 y 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, el resto hidrocarburo es una cadena de alquilo de entre 1 y 20, preferiblemente entre 2 y 10, más preferiblemente entre 2 y 6, y de manera especialmente preferible entre 2 y 4 átomos de carbono.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que se hace reaccionar el polímero con 1,4 diaminobutano, 1,3-diaminopropano o 1,2-diaminoetano para dar un derivado polimérico.

## ES 2 357 001 T3

La reacción de al menos el compuesto bifuncional que comprende M y Q con el polímero se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de entre 0 y 100°C, más preferiblemente de entre 4 y 80°C y de manera especialmente preferible de entre 20 y 80°C; el tiempo de reacción varía preferiblemente de entre 4 h a 7 d, más preferiblemente de entre 10 h a 5 d, y de manera especialmente preferible de entre 17 a 4 h. La relación molar del al menos compuesto bifuncional: polímero está preferiblemente en el intervalo de entre 10 a 200, especialmente entre 50 y 100.

Como disolvente de la reacción del al menos compuesto bifuncional con el polímero, se prefiere al menos un disolvente aprótico, de manera particularmente preferible un disolvente aprótico anhidro que tenga un contenido de agua de no más de un 0,5 por ciento en peso, preferiblemente de no más de un 0,1 por ciento en peso. Los disolventes adecuados son, entre otros, dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidona, dimetil acetamida (DMA), dimetil formamida (DMF) y las mezclas de dos o más de los mismos.

Como disolvente de la reacción del al menos compuesto bifuncional con el polímero, se puede usar también un medio acuoso.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el derivado polimérico que comprende el polímero y el al menos compuesto bifuncional está modificado químicamente en el grupo funcional libre Q para dar un derivado polimérico que comprende un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal. De acuerdo con esta forma de realización, se prefiere hacer reaccionar el derivado polimérico con al menos uno de al menos un compuesto bifuncional que comprende un grupo funcional capaz de hacerse reaccionar con el grupo funcional Q y un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal.

Como el al menos compuesto bifuncional, es adecuado que cada compuesto tenga un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal y al menos un grupo funcional que sea capaz de formar un enlace con el grupo funcional Q del derivado polimérico. El al menos un grupo funcional se selecciona entre la misma combinación de grupos funcionales que Q y se escoge para ser capaz de hacerse reaccionar con Q. En el caso preferido en que Q es un grupo amino -NH<sub>2</sub>, se prefiere emplear un compuesto que tenga, aparte del grupo aldehído o del grupo ceto o del grupo hemiacetal, al menos un grupo carboxilo o al menos un grupo carboxilo reactivo, preferiblemente un grupo carboxilo o un grupo carboxilo reactivo. El grupo aldehído o el grupo ceto o el grupo hemiacetal y el grupo carboxilo o el grupo carboxilo reactivo se pueden separar mediante cualquier separador adecuado. Entre otros, el separador puede ser un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico opcionalmente sustituido. Generalmente, el resto hidrocarburo tiene entre 1 y 60, preferiblemente entre 1 y 40, más preferiblemente entre 1 y 20, más preferiblemente entre 2 y 10, más preferiblemente entre 2 y 6, y de manera especialmente preferible entre 2 y 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo separador comprende generalmente entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 8, y de manera especialmente preferible entre 1 y 4 heteroátomos. El resto hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo alquilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, entre 5 y 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, el resto hidrocarburo es un resto arilo que tiene 5 a 7 y preferiblemente 6 átomos de carbono. Lo más preferible, el resto hidrocarburo es el resto benceno. De acuerdo con esta forma de realización preferida, el grupo carboxilo y el grupo aldehído se pueden localizar en el anillo del benceno en la posición 1,4, posición 1,3 o posición 1,2, prefiriéndose la posición 1,4.

Como grupo carboxilo reactivo, se puede mencionar un éster reactivo, isotiocianatos o isocianato. Los ésteres reactivos preferidos se derivan de N-hidroxisuccinimidas tales como N-hidroxisuccinimida o sulfo-N-hidroxisuccinimida, fenoles sustituidos adecuados, tales como p-nitrofenol, o,p-dinitrofenol, o,o'-dinitrofenol, triclorofenol tal como 2,4,6-triclorofenol o 2,4,5-triclorofenol, trifluorofenol tal como 2,4,6-trifluorofenol o 2,4,5-trifluorofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, o hidroxiazoles tales como hidroxí benzotriazol. Especialmente preferidas son las N-hidroxisuccinimidas, prefiriéndose especialmente la N-hidroxisuccinimida y la sulfo-N-hidroxisuccinimida. Se pueden emplear todos los alcoholes solos o como una combinación adecuada de dos o más de los mismos. Como ésteres reactivo, se prefieren especialmente el pentafluorofenil éster y el éster de N-hidroxisuccinimida.

De esta manera, de acuerdo con una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el derivado polimérico que contiene Q, siendo Q un grupo amino -NH<sub>2</sub>, se hace reaccionar adicionalmente con ácido formilbenzoico.

De acuerdo con otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el derivado polimérico que comprende Q, siendo Q un grupo amino, se hace reaccionar adicionalmente con pentafluorofenil éster del ácido formilbenzoico.

De acuerdo con otra forma de realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el derivado polimérico que comprende Q, siendo Q un grupo amino, se hace reaccionar adicionalmente con el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido formilbenzoico.

De acuerdo con otra forma de realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el derivado polimérico que comprende Q, siendo Q un grupo amino, se hace reaccionar adicionalmente con el ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi)butírico.

Como disolvente de la reacción del derivado polimérico que comprende un grupo amino y, por ejemplo, ácido formilbenzoico, se prefiere al menos un disolvente aprótico, de manera particularmente preferible un disolvente aprótico anhidro que tenga un contenido de agua de no más de un 0,5 por ciento en peso, preferiblemente de no más de un 0,1 por ciento en peso. Los disolventes adecuados son, entre otros, dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidona, dimetil acetamida (DMA), dimetil formamida (DMF) y las mezclas de dos o más de los mismos.

La reacción se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de entre 0 a 40°C, más preferiblemente de entre 0 a 25°C y de manera especialmente preferible de entre 15 a 25°C para un tiempo de reacción preferible de entre 0,5 a 24 h y de manera especialmente preferible de entre 1 a 17 h.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la reacción se lleva a cabo en presencia de un agente activador. Los agentes activadores adecuados son, entre otros, carbodiimidas tales como diisopropil carbodiimida (DIC), dicitclohexil carbodiimidas (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), prefiriéndose especialmente diisopropil carbodiimida (DIC).

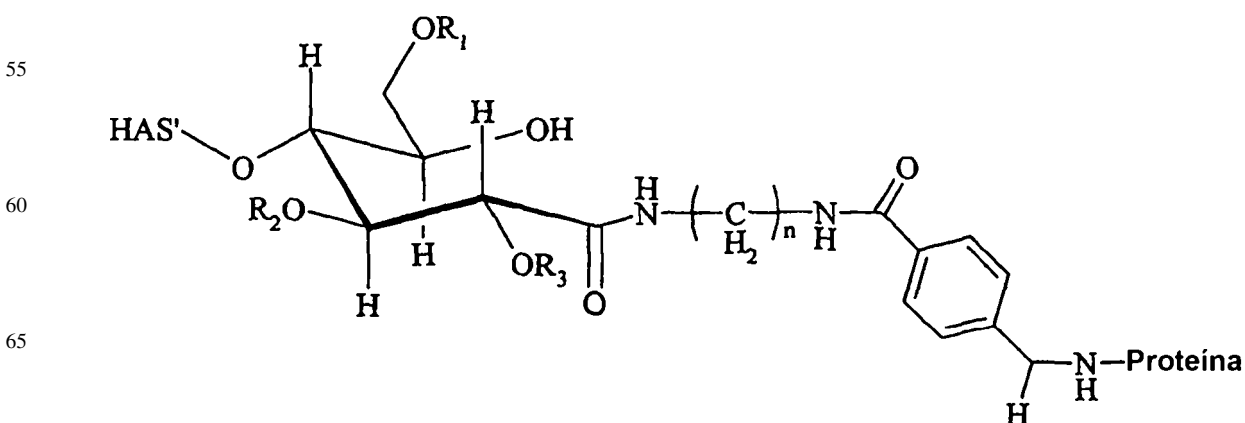
El derivado polimérico resultante se puede purificar de la mezcla de reacción mediante al menos un procedimiento adecuado. Si es necesario, se puede precipitar el derivado polimérico antes del aislamiento mediante al menos un procedimiento adecuado.

Si se precipita en primer lugar el derivado polimérico, es posible, por ejemplo, poner en contacto la mezcla de reacción con al menos un disolventes o mezcla de disolventes diferente que la del disolvente o la mezcla de disolventes presente en la mezcla de reacción a temperaturas adecuadas. De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, en la que se usa un medio acuoso, preferiblemente agua, como disolvente, la mezcla de reacción se pone en contacto con 2-propanol o con una mezcla de acetona y etanol, preferiblemente una mezcla 1:1 (v/v), que indica volúmenes iguales de dichos compuestos, a una temperatura, preferiblemente en el intervalo de entre -20 a +50°C y, de manera especialmente preferible en el intervalo de entre -20 a 25°C.

El aislamiento del derivado polimérico se puede llevar a cabo mediante procedimientos adecuados que pueden comprender una o más etapas. De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el derivado polimérico se separa en primer lugar de la mezcla de reacción o de la mezcla de la mezcla de reacción con, por ejemplo, una mezcla acuosa de 2-propanol, mediante un procedimiento adecuado tal como centrifugación o filtración. En una segunda etapa, el derivado polimérico separado se puede someter a tratamiento adicional tal como diálisis de tipo postratamiento, filtración centrífuga o filtración a presión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa, HPLC, MPLC, filtración en gel y/o liofilización. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, el derivado polimérico separado se dializa en primer lugar, preferiblemente frente a agua, y a continuación se liofiliza hasta que el contenido de disolvente del producto de reacción es suficientemente bajo de acuerdo con las especificaciones deseadas del producto. Se puede llevar a cabo la liofilización a una temperatura de entre 20 y 35°C, preferiblemente de entre 20 y 30°C.

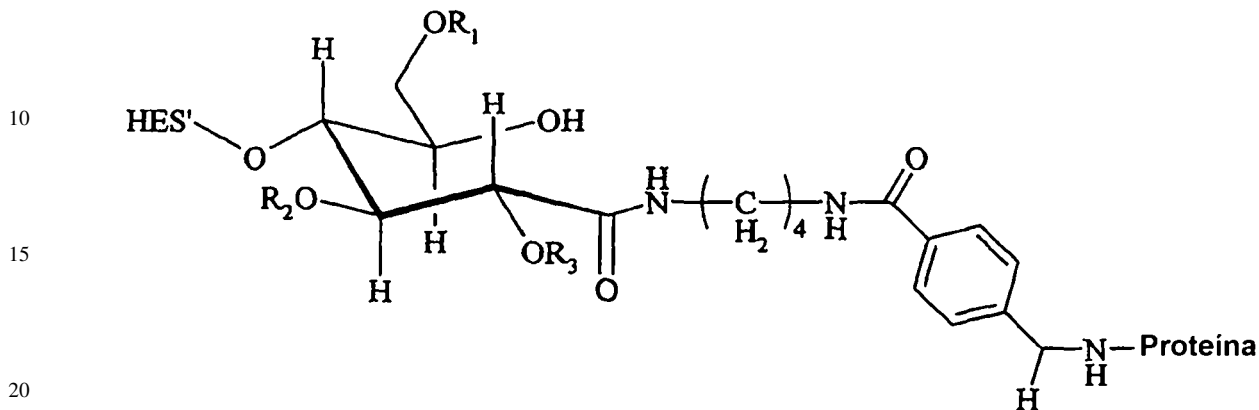
El derivado polimérico resultante con el grupo aldehído o el grupo ceto o el grupo hemiacetal se hace reaccionar posteriormente con un grupo amino de la proteína mediante aminación reductora. Como para el acoplamiento de al menos un grupo amino de la proteína con al menos un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal del polímero mediante aminación reductora, se hace referencia a la anterior divulgación detallada que se refiere a los parámetros de reacción específicos de la reacción de aminación reductora tales como el pH o la temperatura. De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida de la presente invención, la aminación reductora se lleva a cabo a una temperatura de entre 0 a 10°C tal como entre 1 a 8°C o entre 2 a 6°C tal como aproximadamente 4°C a un pH de aproximadamente 4,5 a 5,5 tal como aproximadamente 5,0. El tiempo de reacción es de 10 a 20, tal como de 12 a 19 o de 14 a 18, tal como 17 h o 20 a 30 h tal como 24 h.

De esta manera, de acuerdo con las formas de realización anteriormente mencionadas preferidas, la presente invención se refiere también, en el caso de que se hiciera reaccionar el polímero mediante su extremo reductor oxidado, a un conjugado de acuerdo con la fórmula



De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida, el polímero es almidón hidroxietílico, es decir, HAS' es HES', y n = 2, 3, ó 4, lo más preferible 4, tal como se ha descrito anteriormente. Por tanto, en el caso de que se hiciera reaccionar el polímero mediante su extremo reductor oxidado, la presente invención se refiere también a un conjugado de acuerdo con la fórmula

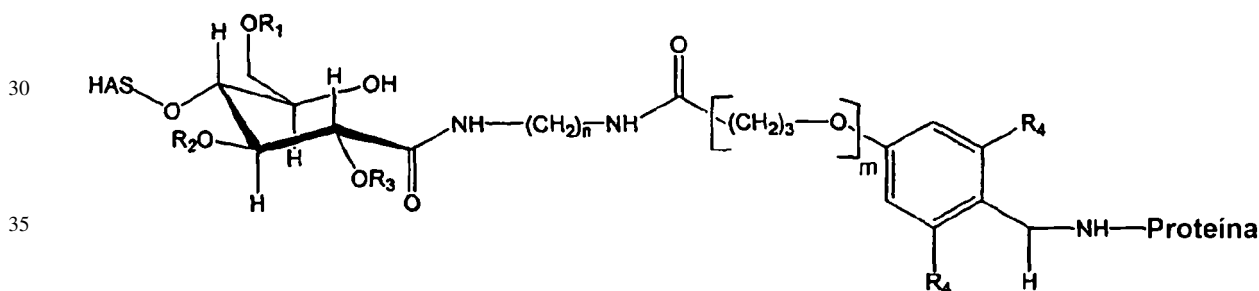
5



20

De acuerdo con otra forma de realización preferida, la presente invención se refiere también, en el caso de que se hiciera reaccionar el polímero con su extremo reductor oxidado, a un conjugado de acuerdo con la fórmula

25



35

en la que n = 2, 3, ó 4, siendo R<sub>4</sub> independientemente hidrógeno o un grupo metoxilo, y m = 0 en el caso de que R<sub>4</sub> sea hidrógeno y m = 1 en el caso de que R<sub>4</sub> sea metoxilo, siendo HAS preferiblemente HES'.

40

En cada una de las fórmulas anteriores, el nitrógeno unido a la proteína deriva del grupo amino de la proteína que se une al derivado polimérico mediante el grupo aldehído.

45

Con respecto a las formas de realización anteriormente mencionadas de acuerdo con las cuales los grupos funcionales M y Q comprenden un grupo amino -NH<sub>2</sub>, es también posible que M sea un grupo amino -NH<sub>2</sub> y Q comprende un grupo beta hidroxilo amino -CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> y preferiblemente es un grupo beta hidroxilo amino.

50

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el grupo amino Q del compuesto que comprende dos grupos amino M y Q es un grupo beta hidroxilo amino -CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

55

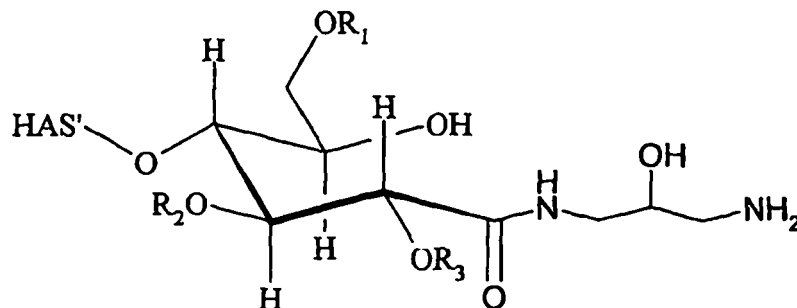
En este caso, M y Q se pueden separar mediante cualquier separador adecuado. Entre otros, el separador puede ser un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico opcionalmente sustituido. Generalmente, el resto hidrocarburo tiene entre 1 y 60, preferiblemente entre 1 y 40, más preferiblemente entre 1 y 20, más preferiblemente entre 2 y 10, más preferiblemente entre 1 y 6 y de manera especialmente preferible entre 1 y 12 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo separador comprende generalmente entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 8 y de manera especialmente preferible entre 1 y 4 heteroátomos. El resto hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tenga, por ejemplo, entre 5 y 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, el resto hidrocarburo es una cadena de alquilo de entre 1 a 20, preferiblemente entre 1 a 10, más preferiblemente entre 1 a 6, más preferiblemente entre 1 a 4 átomos de carbono y de manera especialmente preferible entre 1 a 2 átomos de carbono. Aún más preferiblemente, M y Q están separados por un grupo metileno.

65

## ES 2 357 001 T3

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el polímero se hace reaccionar con 1,3-diamino-2-hidroxiopropano.

En el caso de que se haga reaccionar el polímero mediante su extremo reductor oxidado, resulta especialmente preferible un derivado polimérico de acuerdo con la fórmula



con HAS' = HES'.

La reacción del al menos compuesto bifuncional que comprende M y Q, de manera particularmente preferible 1,3-diamino-2-hidroxiopropano, con el polímero, se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de entre 40 a 120°C, más preferiblemente de entre 40 a 90°C y de manera especialmente preferible de entre 60 a 80°C. El tiempo de reacción varía preferiblemente de 17 a 168 h, más preferiblemente de 17 a 96 h y de manera especialmente preferible de 48 a 96 h. La relación molar del al menos compuesto bifuncional:polímero está preferiblemente en el intervalo de entre 200:1 a 10:1, especialmente de 50:1 a 100:1.

Como disolvente de la reacción del al menos un compuesto bifuncional con el polímero, se prefiere al menos un disolvente aprótico, preferiblemente un disolvente aprótico anhidro que tiene un contenido de agua de no más de un 0,5 por ciento en peso, preferiblemente de no más de un 0,1 por ciento en peso. Los disolventes adecuados son, entre otros, dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidona, dimetil acetamida (DMA), dimetil formamida (DMF) y las mezclas de dos o más de los mismos.

Se puede hacer reaccionar generalmente el grupo beta hidroxí amino de Q del derivado polimérico con el al menos compuesto bifuncional capaz de hacerse reaccionar con Q y que comprende adicionalmente al menos un grupo funcional capaz de modificarse para dar un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal. De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, el grupo beta hidroxí amino está modificado químicamente de manera directa para dar un grupo aldehído mediante oxidación química.

Se puede llevar a cabo esta oxidación con todos los agentes de oxidación adecuados que son capaces de convertir el grupo beta hidroxí amino en un grupo aldehído. Los reactivos de oxidación preferidos son periodatos tales como periodatos de metales alcalinos. Se prefiere especialmente el periodato de sodio, que se emplea preferiblemente como solución acuosa. Esta solución tiene una concentración de yodato preferida de entre 1 a 50 mM más preferiblemente de entre 1 a 25 mM y de manera especialmente preferible de entre 1 a 10 mM. Se lleva a cabo la oxidación a una temperatura de entre 0 a 40°C, preferiblemente de entre 0 a 25°C y de manera especialmente preferible de entre 4 a 20°C.

Se puede purificar el derivado polimérico resultante de la mezcla de reacción mediante al menos un procedimiento adecuado. Si es necesario, se puede precipitar el derivado polimérico antes del aislamiento mediante al menos un procedimiento adecuado.

Si el derivado polimérico se precipita en primer lugar, es posible, por ejemplo, poner en contacto la mezcla de reacción con al menos un disolvente o mezcla de disolventes diferentes del disolvente o la mezcla de disolventes presentes en la mezcla de reacción a temperaturas adecuadas. De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la presente invención en la que se usa un medio acuoso, preferiblemente agua, como disolvente, la mezcla de reacción se pone en contacto con 2-propanol o con una mezcla de acetona y etanol, preferiblemente una mezcla 1:1 (v/v), que indica volúmenes iguales de dichos compuestos, a una temperatura, preferiblemente en el intervalo de entre -20 a +50°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de entre -20 a 25°C.

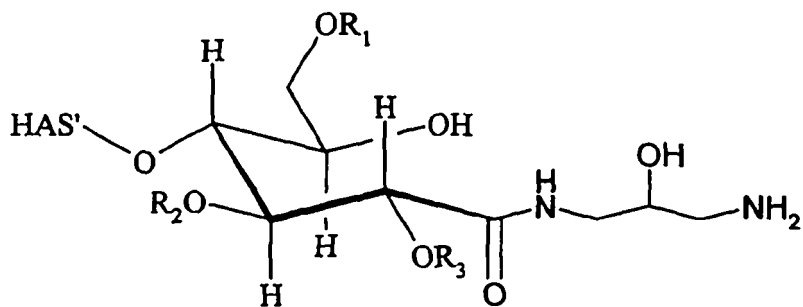
Se puede llevar a cabo el aislamiento del derivado polimérico mediante cualquier procedimiento adecuado que puede comprender una o más etapas. De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el derivado polimérico se separa en primer lugar de la mezcla de reacción o de la mezcla de la mezcla de reacción con, por ejemplo, una mezcla acuosa de 2-propanol, mediante un procedimiento adecuado tal como centrifugación o filtración. En una segunda etapa, se puede someter el derivado polimérico separado a un tratamiento adicional tal como una diálisis de tipo postratamiento, filtración centrífuga o filtración a presión, cromatografía de intercambio

## ES 2 357 001 T3

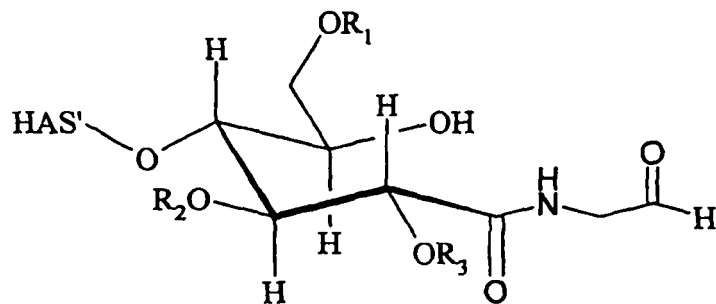
iónico, cromatografía en fase inversa, HPLC, MPLC, filtración en gel y/o liofilización. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, se dializa en primer lugar el derivado polimérico separado, preferiblemente frente a agua, y a continuación se liofiliza hasta que el contenido de disolvente del producto de reacción es suficientemente bajo de acuerdo con las especificaciones deseadas del producto. Se puede llevar a cabo la liofilización a una temperatura de entre 20 a 35°C, preferiblemente de entre 20 a 30°C.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento y a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que la oxidación del grupo beta hidroxilo amino de Q se lleva a cabo usando un periodato.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento de producción de un conjugado, en el que, en el caso de que se empleara el polímero con el extremo reductor oxidado, se oxida un derivado polimérico que tiene un grupo beta hidroxilo amino, de manera especialmente preferible

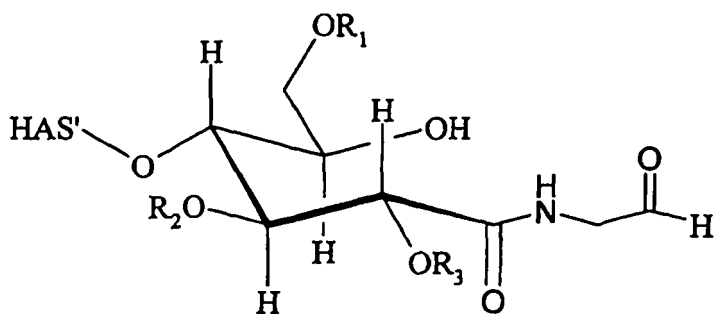


y particularmente con HAS' = HES', preferiblemente con periodato, a un derivado polimérico que tiene un grupo aldehído, de manera especialmente preferible



y particularmente con HAS' = HES'.

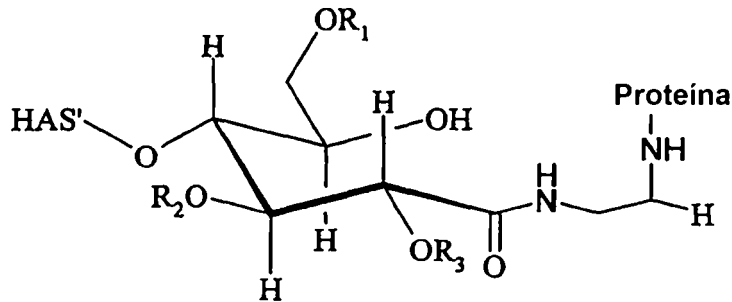
El derivado polimérico resultante con el grupo aldehído A se hace reaccionar posteriormente con la proteína. Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento de producción de un conjugado, comprendiendo dicho procedimiento hacer reaccionar un derivado polimérico que tiene un grupo beta hidroxilo amino, en el caso de que se empleara el polímero con el extremo reductor oxidado, de manera especialmente preferible de acuerdo con la fórmula



y particularmente con HAS' = HES', con un grupo amino de la proteína.

El derivado polimérico resultante con el grupo aldehído se hace reaccionar posteriormente con un grupo amino de la proteína mediante aminación reductora. Como para el acoplamiento de al menos un grupo amino de la proteína con al menos un grupo aldehído del polímero mediante aminación reductora, se hace referencia a la anterior divulgación detallada.

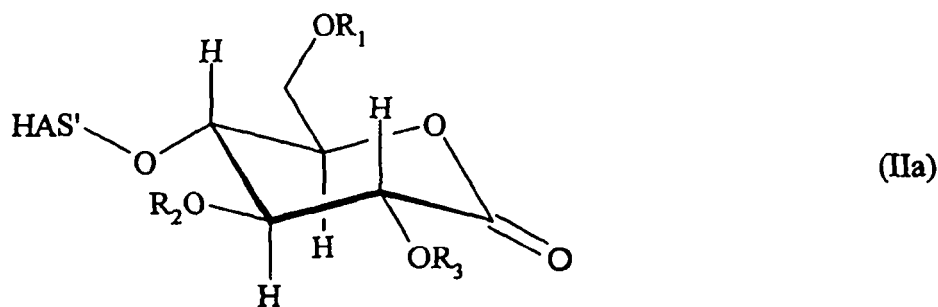
De esta manera, de acuerdo con la forma de realización anteriormente mencionada preferida, la presente invención se refiere también a un conjugado de acuerdo con la fórmula



particularmente con HAS' = HES', en el caso de que se empleara el polímero con el extremo reductor oxidado. En la fórmula anterior, el nitrógeno unido a la proteína deriva del grupo amino de la proteína que se une al derivado polimérico mediante el grupo aldehído.

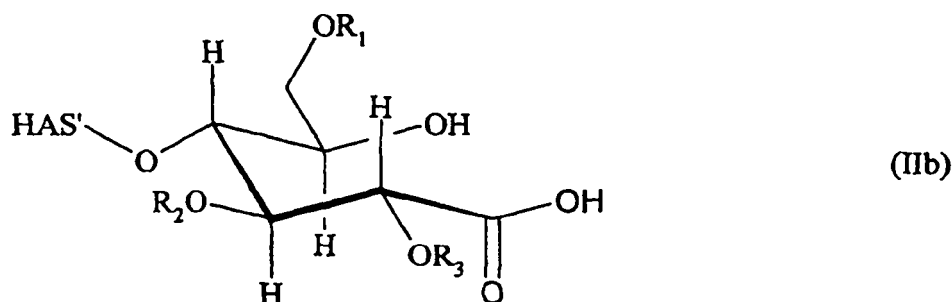
De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, se hace reaccionar el polímero en primer lugar con un compuesto adecuado para dar un primer derivado polimérico que comprende al menos un grupo carboxilo reactivo. Este primer derivado polimérico se hace reaccionar a continuación con al menos un compuesto bifuncional adicional en el que al menos un grupo funcional de este compuesto adicional se hace reaccionar con al menos un grupo carboxilo reactivo del derivado polimérico y al menos otro grupo funcional del compuesto adicional es un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal o es un grupo funcional que está modificado químicamente para dar un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal, y en el que el derivado polimérico resultante que comprende dicho grupo aldehído o grupo ceto o grupo hemiacetal se hace reaccionar mediante aminación reductora, tal como se ha descrito anteriormente, con al menos un grupo amino de la proteína. Es también posible alterar la secuencia para hacer reaccionar los respectivos compuestos entre sí.

De acuerdo con una primera alternativa de dicha forma de realización adicional, el polímero que comprende al menos un grupo carboxilo reactivo se prepara oxidando selectivamente el polímero en su extremo reductor y haciendo reaccionar posteriormente el polímero oxidado con una lactona



y/o un ácido carboxílico





15 o una sal adecuada del ácido carboxílico tal como una sal de metal alcalino, preferiblemente tal como una sal de sodio y/o potasio, y siendo HAS' preferiblemente HES', con un compuesto adecuado para dar el polímero que comprende al menos un grupo carboxilo reactivo.

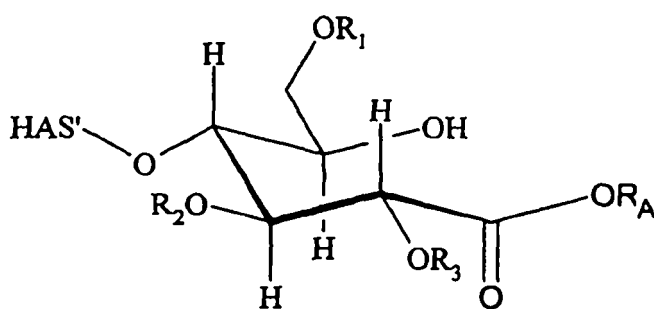
20 Se puede llevar a cabo la oxidación del polímero, preferiblemente almidón hidroxietílico, de acuerdo con cada procedimiento o combinación de procedimientos que de cómo resultado compuestos que tengan las estructuras (IIa) y/o (IIb) anteriormente mencionadas.

25 Aunque se puede llevar a cabo la oxidación de acuerdo con el procedimiento o todos los procedimientos adecuados que den como resultado el extremo reductor oxidado del almidón hidroxialquílico, se lleva a cabo preferiblemente usando una solución de yodo alcalino tal como se describe, por ejemplo, en el documento DE 196 28 705 A1 (ejemplo A, columna 9, líneas 6 a 24).

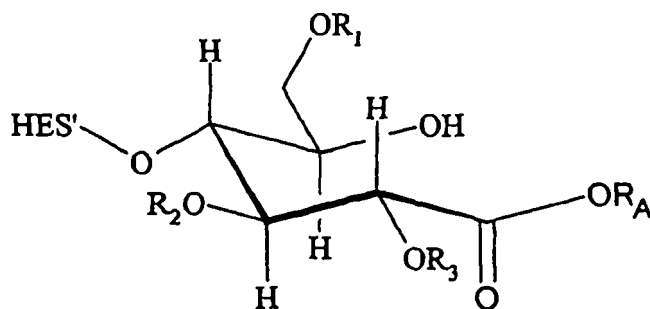
30 Se puede llevar a cabo la introducción del grupo carboxilo reactivo en el polímero que se oxida selectivamente en su extremo reductor mediante todos los procedimientos concebibles y todos los compuestos adecuados.

35 De acuerdo con un procedimiento específico de la presente invención, el polímero que se oxida selectivamente en su extremo reductor se hace reaccionar en su extremo reductor con al menos un alcohol, preferiblemente con al menos un alcohol ácido tal como alcoholes ácidos que tienen un valor de  $pK_A$  en el intervalo de entre 6 a 12 o de entre 7 a 11 a 25°C. El peso molecular del alcohol ácido puede estar en el intervalo de entre 80 a 500 g/mol, tal como de entre 90 a 300 g/mol o de entre 100 a 200 g/mol.

40 Los alcoholes ácidos adecuados son todos los alcoholes H-O- $R_A$  que tienen un protón ácido y son capaces de hacerse reaccionar con el polímero oxidado para dar el éster polimérico reactivo respectivo, preferiblemente de acuerdo con la fórmula



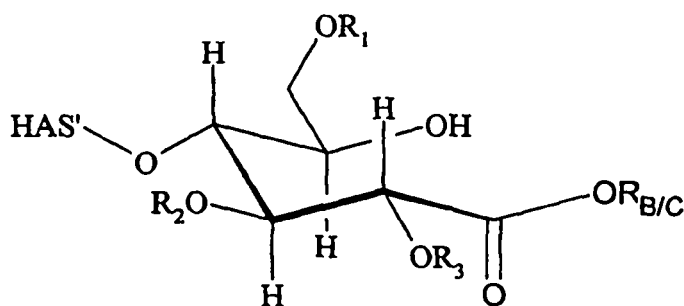
de manera aún más preferible de acuerdo con la fórmula



Los alcoholes preferidos son N-hidroxisuccinimidas tales como N-hidroxisuccinimida o sulfo-N-hidroxisuccinimida, fenoles sustituidos adecuados tales como o,p-dinitrofenol, o,o'-dinitrofenol, triclorofenol tal como 2,4,6-triclorofenol o 2,4,5-triclorofenol, trifluorofenol tal como 2,4,6-trifluorofenol o 2,4,5-trifluorofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, o hidroxiazoles tal como hidroxibenzotriazol. Se prefieren especialmente las N-hidroxisuccinimidas, prefiriéndose especialmente N-hidroxisuccinimida y sulfo-N-hidroxisuccinimida. Se pueden emplear todos los alcoholes solos o como una combinación adecuada de dos o más de los mismos. En el contexto de la presente invención, es también posible emplear un compuesto que libere el alcohol respectivo, por ejemplo, añadiendo diésteres de ácido carbónico.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, en el que el polímero que se oxida selectivamente en su extremo reductor se activa haciendo reaccionar el polímero oxidado con un alcohol ácido, preferiblemente con N-hidroxisuccinimida y/o sulfo-N-hidroxisuccinimida.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el polímero que se oxida selectivamente en su extremo reductor se hace reaccionar en el extremo reductor con al menos un diéster carbónico  $R_B-O-(C=O)-O-R_C$ , en el que  $R_B$  y  $R_C$  pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, este procedimiento proporciona polímeros reactivos de acuerdo con la fórmula



en la que  $HAS'$  es preferiblemente  $HES'$ .

Como compuestos diésteres carbónicos adecuados, se pueden emplear compuestos cuyos componentes alcohólicos son independientemente N-hidroxisuccinimidas tales como N-hidroxisuccinimida o sulfo-N-hidroxisuccinimida, fenoles sustituidos adecuados tales como o,p-dinitrofenol, o,o'-dinitrofenol, triclorofenol tal como 2,4,6-triclorofenol o 2,4,5-triclorofenol, trifluorofenol tal como 2,4,6-trifluorofenol o 2,4,5-trifluorofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, o hidroxiazoles tal como hidroxibenzotriazol. Se prefieren especialmente carbonato de N,N'-disuccinimidilo y carbonato de Sulfo-N,N'-disuccinimidilo, prefiriéndose especialmente carbonato de N,N'-disuccinimidilo.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, en el que el polímero que se oxida selectivamente en su extremo reductor se activa haciendo reaccionar el polímero oxidado con carbonato de N,N'-disuccinimidilo.

El alcohol se hace reaccionar con el polímero oxidado o la sal del polímero oxidado con una relación molar de alcohol ácido:polímero preferiblemente de entre 5:1 a 50:1, más preferiblemente de entre 8:1 a 20:1, a una temperatura de reacción preferida de entre 2 a 40°C, más preferiblemente de entre 10 a 30°C y de manera especialmente preferible de entre 15 a 25°C. El tiempo de reacción está preferiblemente en el intervalo de entre 1 a 10 h, más preferiblemente de entre 2 a 5 h, más preferiblemente de entre 2 a 4 h y particularmente de entre 2 a 3 h.

El compuesto de diéster carbónico se hace reaccionar con el polímero oxidado o la sal del polímero oxidado a una relación molar de compuesto de diéster:polímero generalmente de entre 1:1 a 3:1, tal como de entre 1:1 a 1,5:1. El tiempo de reacción está generalmente en el intervalo de entre 0,1 a 12 h, igualmente de entre 0,2 a 6 h, o de entre 0,5 a 2 h o de entre 0,75 a 1,25 h.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la reacción del polímero oxidado con el alcohol ácido y/o el diéster carbónico se lleva a cabo en al menos un disolvente aprótico, tal como en un disolvente aprótico anhidro que tiene un contenido de agua de no más de un 0,5 por ciento en peso, preferiblemente de no más de un 0,1 por ciento en peso. Los disolventes adecuados son, entre otros, dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidona, dimetil acetamida (DMA) dimetil formamida (DMF) y las mezclas de dos o más de los mismos. Las temperaturas de reacción están preferiblemente en el intervalo de entre 2 a 40°C, más preferiblemente de entre 10 a 30°C.

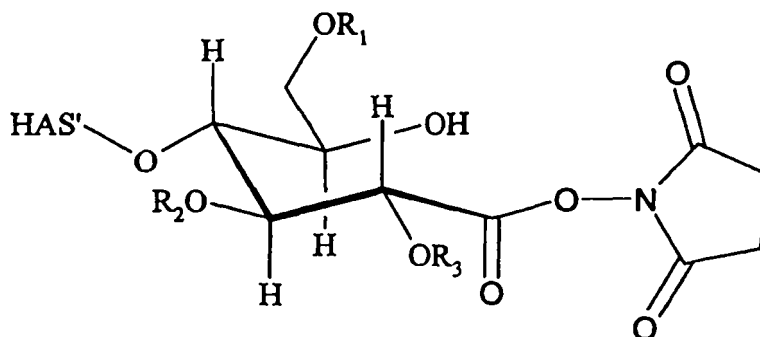
## ES 2 357 001 T3

Para hacer reaccionar el polímero oxidado con el al menos un alcohol ácido, se emplea al menos un agente activador adicional.

5 Por tanto, la presente invención también se refiere al procedimiento que se ha descrito anteriormente, en el que el polímero que se oxida en su extremo reductor se hace reaccionar con un alcohol ácido en presencia de un agente activante adicional para par el polímero de éster reactivo.

10 De acuerdo con una forma de realización de la presente invención la reacción del polímero oxidado con el diéster carbónico y/o el alcohol ácido se lleva a cabo a una actividad básica baja que se puede determinar añadiendo la mezcla de reacción a agua con una relación volumétrica del agua a la mezcla de reacción de 10:1. Antes de la adición, el agua que no comprende esencialmente tampón, tiene un valor de pH de 7 a 25°C. Después de la adición de la mezcla de reacción y midiendo el valor del pH, se obtiene la actividad básica de la mezcla de reacción, que tiene un valor de preferiblemente no más de 9,0, más preferiblemente de no más de 8,0, y de manera especialmente preferible de no más de 7,5.

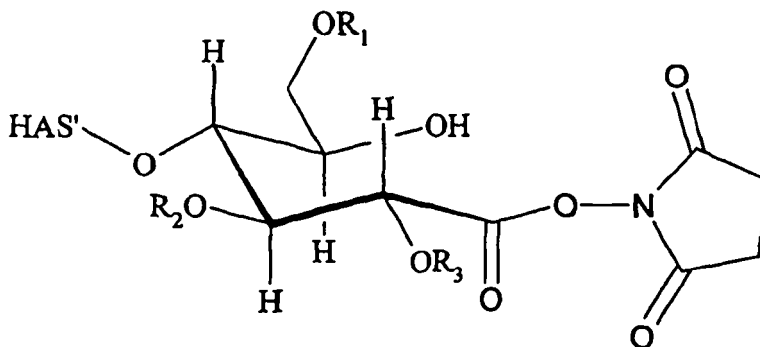
15 De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, el polímero oxidado se hace reaccionar con N-hidroxisuccinimida en DMA seco en ausencia de agua con EDC para proporcionar selectivamente el éster de N-hidroxisuccinimida polimérico de acuerdo con la fórmula



35 siendo HAS' de manera más preferible HES'.

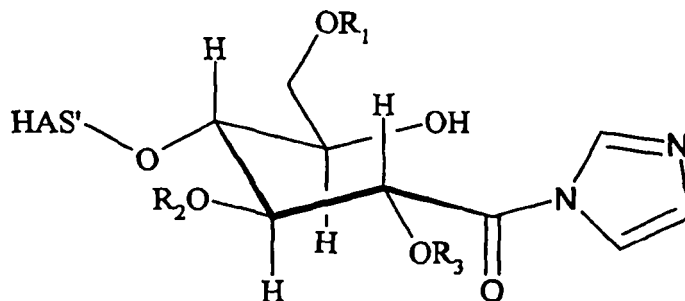
40 Sorprendentemente, esta reacción no da subproductos resultantes de las reacciones del EDC con los grupos OH de HES, y se suprime de manera sorprendente la reacción de redistribución de la O-acil isourea formada por el EDC y el polímero oxidado con la N-acil urea respectiva.

45 De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, se hace reaccionar el polímero oxidado con carbonato de N,N'-disuccinimidilo en DMF seco en ausencia de agua en ausencia de un agente activador para dar selectivamente el éster de N-hidroxisuccinimida polimérico de acuerdo con la fórmula



65 siendo HAS' de manera más preferible HES'.

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, el polímero que se oxida selectivamente en su extremo reductor se hace reaccionar en su extremo reductor con una azolida tal como carbonildiimidazol o carbonil dibencimidazol para dar un polímero que tiene un grupo carboxilo reactivo. En el caso del carbonildiimidazol, da como resultado un derivado polimérico reactivo de imidazolida de acuerdo con la fórmula



siendo HAS' de manera más preferible HES'.

De acuerdo con una segunda alternativa de dicha forma de realización adicional de la presente invención con respecto a la introducción de al menos un grupo carboxilo reactivo en el polímero, el grupo carboxilo reactivo se introduce en el polímero cuyo extremo reductor no se oxida, haciendo reaccionar al menos un grupo hidroxilo del polímero con un diéster carbónico.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento o a unos conjugados en los que el grupo carboxilo reactivo se introduce en el polímero cuyo extremo reductor no se oxida, haciendo reaccionar al menos un grupo hidroxilo del polímero con al menos un diéster carbónico  $R_B-O-(C=O)-O-R_C$ , en el que  $R_B$  y  $R_C$  pueden ser iguales o diferentes.

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, el polímero cuyo extremo reductor no se oxida, se hace reaccionar en al menos un grupo hidroxilo con una azolida tal como carbonildiimidazol, carbonil-di-(1,2,4-triazol) o carbonil dibencimidazol para dar un polímero que tiene un grupo carboxilo reactivo.

Como compuestos diésteres carbónicos adecuados, se pueden emplear compuestos cuyos componentes alcohólicos son independientemente N-hidroxisuccinimidias tales como N-hidroxisuccinimida o sulfo-N-hidroxisuccinimida, fenoles sustituidos adecuados tales como p-nitrofenol, p-dinitrofenol, o,o'-dinitrofenol, triclorofenol tal como 2,4,6-triclorofenol o 2,4,5-triclorofenol, trifluorofenol tal como 2,4,6-trifluorofenol o 2,4,5-trifluorofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, o hidroxiazoles tal como hidroxibenzotriazol.

Se prefieren especialmente compuestos diésteres carbónicos simétricos, siendo  $R_B$  y  $R_C$  iguales. El componente alcohólico del diéster carbónico se selecciona preferiblemente entre el grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida, N-hidroxisuccinimida sulfonada, N-hidroxi benzotriazol, y fenoles nitro y halógeno sustituidos. Entre otros, se prefieren nitrofenol, dinitrofenol, triclorofenol, trifluorofenol, pentaclorofenol, y pentafluorofenol. Se prefieren especialmente carbonato de N,N'-disuccinimidilo y carbonato de sulfo-N,N'-disuccinimidilo, prefiriéndose especialmente carbonato de N,N'-disuccinimidilo.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un derivado de almidón hidroxialquílico, preferiblemente un derivado de almidón hidroxietílico, en el que al menos un grupo hidroxilo, preferiblemente al menos dos grupos hidroxilo de dicho almidón se han hecho reaccionar con un compuesto de diéster carbónico para dar el éster reactivo respectivo.

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, la reacción del polímero cuyo extremo reductor no está oxidado, con el al menos un compuesto de diéster carbónico se lleva a cabo a una temperatura de entre 2 a 40°C, más preferiblemente de entre 10 a 30°C y especialmente de entre 15 a 25°C. Un tiempo de reacción preferido varía de 0,5 a 5 h, más preferiblemente de 1 a 3 h, y de manera especialmente preferible de 2 a 3 h.

La relación molar de compuesto de diéster carbónico: polímero depende del grado de sustitución del polímero con respecto al número de grupos hidroxilo que se hacen reaccionar con el compuesto de diéster carbónico con respecto al número de grupos hidroxilo presentes en el polímero sin reaccionar.

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, la relación molar de compuesto de diéster carbónico: unidades de anhidroglucosa está en el intervalo de 1:2 a 1:100, más preferiblemente de 1:3 a 1:100 y especialmente preferiblemente de 1:10 a 1:50, para dar un grado de sustitución en el intervalo de 0,5 a 0,001, preferiblemente de 0,33 a 0,01 y especialmente preferiblemente de 0,1 a 0,02.

## ES 2 357 001 T3

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, la reacción del polímero cuyo extremo reductor no se oxida, con diéster carbónico se lleva a cabo en al menos un disolvente aprótico, de manera particularmente preferible en un disolvente aprótico anhidro que tiene un contenido de agua de no más de un 0,5 por ciento en peso, preferiblemente de no más de un 0,1 por ciento en peso. Los disolventes adecuados son, entre otros, dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidona, dimetil acetamida (DMA), dimetil formamida (DMF) y las mezclas de dos o más de los mismos.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente en el que la reacción de el al menos un grupo hidroxilo del polímero cuyo extremo reductor no se oxida, con el diéster carbónico para dar un grupo carboxilo reactivo se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro, siendo preferiblemente el disolvente dimetil acetamida, dimetil formamida o una mezcla de los mismos.

El derivado polimérico reactivo que comprende al menos un grupo carboxilo reactivo, resultante preferiblemente de la reacción del polímero con el alcohol ácido, el carbonato y/o la azolida, tal como se ha descrito anteriormente, se hace reaccionar adicionalmente con un al menos compuesto bifuncional adicional en el que al menos un grupo  $F_1$  funcional de este compuesto adicional se hace reaccionar con al menos un grupo carboxilo reactivo del derivado polimérico. Como para al menos un grupo  $F_1$  funcional del compuesto adicional, no existen limitaciones específicas que faciliten que sea posible una reacción con el al menos un grupo carboxilo reactivo del polímero. Los grupos  $F_1$  funcionales preferidos son, por ejemplo, un grupo amino o un grupo hidroxilo o un grupo tio o un grupo carboxilo.

El al menos compuesto bifuncional adicional comprende al menos otro grupo  $F_2$  funcional que es un grupo aldehído o un grupo  $F_2$  funcional que es capaz de modificarse químicamente para dar un grupo aldehído. La modificación química puede ser, por ejemplo, una reacción del grupo  $F_2$  funcional con un grupo  $F_3$  funcional, un compuesto enlazante adicional o una oxidación o una reducción de un grupo  $F_2$  funcional adecuado.

En el caso en el que se hace reaccionar  $F_2$  con un grupo  $F_3$  funcional de un compuesto adicional, el grupo  $F_2$  funcional se puede seleccionar de, entre otros,

- dobles enlaces C-C o triples enlaces C-C o enlaces C-C aromáticos;
- el grupo tio o el grupo hidroxilo;
- hidrazida del ácido alquil sulfónico, hidrazida del ácido aril sulfónico;
- 1,2-dioles;
- 1,2-aminoalcoholes;
- 1,2 amino-tioalcoholes;
- azidas;
- el grupo amino  $-NH_2$  o derivados de los grupos amino que comprenden la unidad de estructura  $-NH-$  tales como grupos aminoalquílicos, grupos aminoarilo, grupos aminoaralquilo, o grupos alcarilamino;
- el grupo hidroxilamino  $-O-NH_2-$ , o derivados del grupo hidroxilamino que comprende la unidad de estructura  $-O-NH-$ , tales como grupos hidroxilalquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino, o grupos hidroxilalcarilamino;
- grupos alcoxi-amino, grupos ariloxi-amino, grupos aralquilo-xi-amino, o grupos alcarilo-xi-amino, comprendiendo cada uno la unidad de estructura  $NH-O-$ ;
- restos que tienen un grupo carbonilo,  $Q-C(=G)-M$  en el que G es O u S, y M es, por ejemplo,
  - $-OH$  o  $-SH$ ;
  - un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo aralquilo-xilo, o un grupo alcarilo-xilo;
  - un grupo alquiltio, un grupo ariltio, un grupo aralquiltio, o un grupo alcariltio;
  - un grupo alquilcarbonilo-xilo, un grupo arilcarbonilo-xilo, un grupo aralquilcarbonilo-xilo, un grupo alcarilcarbonilo-xilo;
  - ésteres activados tales como ésteres de hidroxilaminas que tienen estructura de imida tales como N-hidroxisuccinimida o que tienen una unidad de estructura  $O-N$  en la que N es parte de un compuesto heteroarilo o, con G = O y Q ausente, tales como compuestos de ariloxilo con un resto arilo sustituido tales como pentafluorofenilo, paranitrofenilo o triclorofenilo;

## ES 2 357 001 T3

en el que Q está ausente o es NH o un heteroátomo tal como S u O;

- -NH-NH<sub>2</sub>, o -NH-NH-;

5 - -NO<sub>2</sub>;

- el grupo nitrilo

- grupos carbonilo tales como el grupo aldehído o el grupo ceto;

10

- el grupo carboxilo;

- el grupo -N=C=O o el grupo -N=C=S;

15 - grupos de haluro de vinilo tales como el grupo yoduro de vinilo o el bromuro de vinilo o triflato;

- -C=C-H;

- -(C=NH<sub>2</sub>Cl)-OAlquilo

20

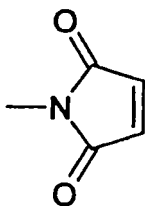
- Grupos -(C=O)-CH<sub>2</sub>-Hal en el que Hal es Cl, Br, o I;

- -CH=CH-SO<sub>2</sub>-;

25 - un grupo disulfuro que comprende la estructura -S-S-;

- el grupo

30



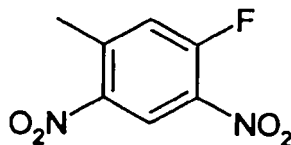
;

35

40

- el grupo

45



50

55 en la que F<sub>3</sub> es un grupo capaz de formar un enlace químico con uno de los grupos anteriormente mencionados y se selecciona preferiblemente entre los grupos anteriormente mencionados. Además, el segundo compuesto enlazante tiene preferiblemente al menos un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal que es capaz de hacerse reaccionar con un grupo amino de la proteína mediante aminación reductora.

60 El grupo F<sub>1</sub> funcional y el grupo aldehído o el grupo ceto o el grupo hemiacetal del al menos compuesto de unión bifuncional que se hace reaccionar con el polímero, y/o los grupos F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> funcionales del al menos compuesto de unión bifuncional que se hace reaccionar con el polímero, y/o el grupo F<sub>3</sub> funcional y el grupo aldehído o el grupo ceto o el grupo hemiacetal del al menos compuesto de unión bifuncional adicional, se pueden separar independiente mediante un separador adecuado. Entre otros, el separador puede ser un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico alifático y/o aromático opcionalmente sustituido. Generalmente, el resto hidrocarburo tiene hasta 60, preferiblemente hasta 40, más preferiblemente hasta 20, más preferiblemente hasta 10 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo separador comprende generalmente de 1 a 20, preferiblemente de 1

a 8, más preferiblemente de 1 y 6, más preferiblemente de 1 a 4 y de manera especialmente preferible de 1 a 2 heteroátomos. Como heteroátomo, se prefiere O. El resto hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, de 5 a 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico.

Ejemplos de un compuesto con grupos  $F_1$  y  $F_2$  funcionales son, por ejemplo, diaminoalcano opcionalmente sustituido que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, de manera especialmente preferible 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, y 1,4-diaminobutano. Ejemplos preferidos de un compuesto con grupos  $F_3$  funcionales y un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal son, por ejemplo, ácido formilbenzoico, pentafluorofenil éster del ácido 4-formilbenzoico, éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-formilbenzoico y ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi)butírico.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento de producción a un conjugado, comprendiendo dicho procedimiento hacer reaccionar el polímero, preferiblemente almidón hidroxietílico, en su extremo reductor opcionalmente oxidado con un compuesto, seleccionado entre el grupo que consiste en alcoholes ácidos, diésteres carbónicos y azolidas, para dar un derivado polimérico que comprende al menos un grupo carboxilo reactivo, haciendo reaccionar dicho derivado polimérico con al menos un compuesto al menos bifuncional para dar un derivado polimérico que comprende un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal o un grupo funcional capaz de modificarse químicamente para dar un derivado polimérico que comprende un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal con un grupo amino de una proteína mediante aminación reductora.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere también a un conjugado que comprende un polímero, preferiblemente almidón hidroxietílico, y una proteína unidos covalentemente entre sí, obtenible mediante un procedimiento de producción de un conjugado, comprendiendo dicho procedimiento hacer reaccionar el polímero, en su extremo reductor opcionalmente oxidado con un compuesto, seleccionado entre el grupo que consiste en alcoholes ácidos, diésteres carbónicos y azolidas, para dar un derivado polimérico que comprende al menos un grupo carboxilo reactivo, hacer reaccionar dicho derivado polimérico con al menos un compuesto bifuncional para dar un derivado polimérico que comprende un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal o un grupo funcional capaz de modificarse químicamente para dar un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal, y hacer reaccionar el derivado polimérico que comprende un grupo aldehído o un grupo ceto o un grupo hemiacetal con un grupo amino de una proteína mediante aminación reductora.

Como un ejemplo específico de un compuesto que tiene un grupo  $F_1$  funcional y un grupo  $F_2$  funcional que se oxida para dar un grupo aldehído está, por ejemplo, un compuesto que tiene un grupo amino tal como  $F_1$  y un grupo beta hidroxil amino tal como  $F_2$ . Un ejemplo especialmente preferido es 1,3-diamino-2-hidroxiopropano. Esta oxidación se puede llevar a cabo con todos los agentes de oxidación adecuados que sean capaces de convertir el grupo beta hidroxil amino en un grupo aldehído. Los reactivos de oxidación preferidos son los periodatos tales como los periodatos de metales alcalinos. Se prefiere especialmente el periodato de sodio que se emplea preferiblemente en solución acuosa. Esta solución tiene una concentración de yodato preferida de entre 1 a 50 mM, más preferiblemente de entre 1 a 25 mM, y de manera especialmente preferible de entre 1 a 10 mM. La oxidación se lleva a cabo a una temperatura de entre 0 a 40°C, preferiblemente de entre 0 a 25°C, y de manera especialmente preferible de entre 4 a 20°C.

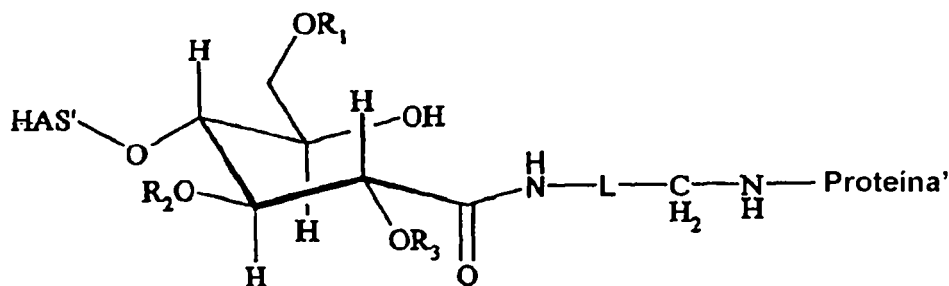
Se puede purificar el derivado polimérico resultante de la mezcla de reacción mediante al menos un procedimiento adecuado. Si es necesario, se puede precipitar el derivado polimérico antes del aislamiento mediante al menos un procedimiento adecuado.

Si se precipita en primer lugar el derivado polimérico, es posible, por ejemplo, poner en contacto la mezcla de reacción con al menos un disolvente o mezcla de disolventes diferentes del disolvente o de la mezcla de disolventes presentes en la mezcla de reacción a temperaturas adecuadas. De acuerdo con una forma de reacción particularmente preferida de la presente invención en la que se usa un medio acuoso, preferiblemente agua, como disolvente, la mezcla de reacción se pone en contacto con 2-propanol o con una mezcla de acetona y etanol preferiblemente una mezcla 1:1 (v/v), que indica volúmenes iguales de dichos compuestos, a una temperatura, preferiblemente en el intervalo de entre -20 a +50°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de entre -20 a 25°C.

El aislamiento del derivado polimérico se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado que puede comprender una o más etapas. De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el derivado polimérico se separa en primer lugar de la mezcla de reacción o de la mezcla de la mezcla de reacción con, por ejemplo, una mezcla acuosa de 2-propanol, mediante un procedimiento adecuado tal como centrifugación o filtración. En una segunda etapa, se puede someter el derivado polimérico separado a un tratamiento adicional tal como diálisis de tipo posttratamiento, filtración centrífuga o filtración a presión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa, HPLC, MPLC, filtración en gel y/o liofilización. De acuerdo con una forma de realización incluso más preferida, el derivado polimérico separado se dializa en primer lugar, preferiblemente frente a agua, y a continuación se liofiliza hasta que el contenido de disolvente del producto de reacción es suficientemente bajo de acuerdo con las especificaciones deseadas del producto. Se puede llevar a cabo la liofilización a una temperatura de entre 20 a 35°C, preferiblemente de entre 20 a 30°C.

## ES 2 357 001 T3

La presente invención se refiere también a un conjugado, que comprende una proteína y un polímero o derivado del mismo, en el que el polímero es almidón hidroxialquílico (HAS) y la proteína es un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula

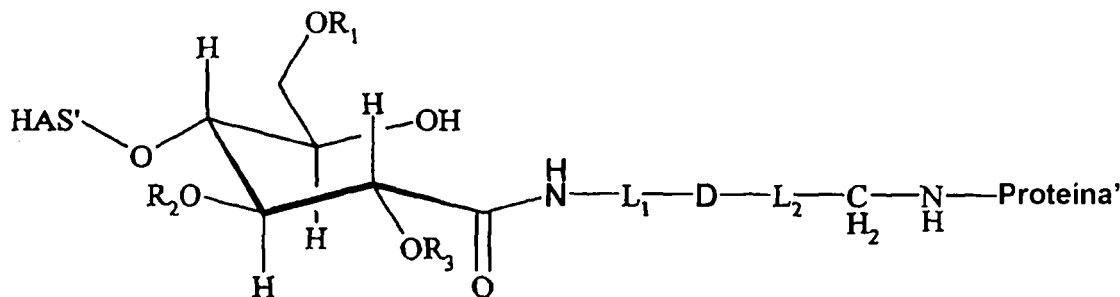


20 en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, un grupo hidroxiarilo, un grupo hidroxialalquilo, o un grupo hidroxialcarilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, más preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxietilo, y

25 en la que L es un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico opcionalmente sustituido, que comprende opcionalmente al menos un heteroátomo, que tiene de 1 a 60, preferiblemente de 1 a 40, más preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 6, más preferiblemente de 1 a 2 átomos de carbono, y de manera especialmente preferible 1 átomo de carbono, siendo L en particular  $\text{CH}_2$ .

La abreviatura "Proteína" tal como se usa en la fórmula anterior se refiere a la molécula de G-CSF usada para la reacción sin el átomo de nitrógeno del grupo amino que es parte del enlace aminometilo.

30 La presente invención se refiere también a un conjugado, que comprende una proteína y un polímero o un derivado del mismo, en el que el polímero es un almidón hidroxialquílico (HAS) y la proteína es un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula



50 en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, un grupo hidroxiarilo, un grupo hidroxialalquilo o un grupo hidroxialcarilo que tiene de entre 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, más preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxietilo, y

55 en la que  $L_1$  y  $L_2$  son independientemente un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico opcionalmente sustituido, que comprende opcionalmente un heteroátomo, que comprende un resto alquilo, arilo, aralquil heteroalquilo, y/o heteroalquilo, teniendo dicho resto de 1 a 60, preferiblemente de 1 a 40, más preferiblemente de 1 a 20 más preferiblemente de 1 a 10 átomos de carbono, y

en la que D es un enlace, preferiblemente un enlace covalente que se formó mediante un grupo  $F_2$  funcional adecuado unido a  $L_1$  y un grupo  $F_3$  funcional adecuado unido a  $L_2$ .

60 La abreviatura "Proteína" tal como se usa en las fórmulas anteriores se refiere a la molécula de G-CSF usada para la reacción sin el átomo de nitrógeno del grupo amino que es parte del enlace aminometilo.

65 La presente invención se refiere también a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que  $L_1$  es  $-(\text{CH}_2)_n$  con  $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ , preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, más preferiblemente 2, 3, 4, y de manera especialmente preferible 4.



## ES 2 357 001 T3

La presente invención se refiere también a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que  $L_2$  comprende un resto arilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un resto arilo que contiene 6 átomos de carbono, siendo  $L_2$  de manera especialmente preferible  $C_6H_4$ , o en el que  $L_2$  es  $-(CH_2)_n$  con  $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ , preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, más preferiblemente 2, 3, 4.

La presente invención se refiere también a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que se selecciona del grupo que consiste en

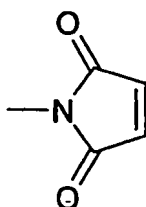
- dobles enlaces C-C o triples enlaces C-C o enlaces C-C aromáticos;
- el grupo tio o el grupo hidroxilo;
- hidrazida del ácido alquil sulfónico, hidrazida del ácido aril sulfónico;
- 1,2-dioles;
- 1,2-aminoalcoholes;
- 1,2 amino-tioalcoholes;
- azidas;
- el grupo amino  $-NH_2$  o derivados de los grupos amino que comprenden la unidad de estructura  $-NH-$  tales como grupos aminoalquílicos, grupos aminoarilo, grupos aminoaralquilo, o grupos alcarilamino;
- el grupo hidroxilamino  $-O-NH_2-$ , o derivados del grupo hidroxilamino que comprende la unidad de estructura  $-O-NH-$ , tales como grupos hidroxilalquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino, o grupos hidroxilalcarilamino;
- grupos alcoxi-amino, grupos ariloxiamino, grupos aralquiloxiamino, o grupos alcariloxiamino, comprendiendo cada uno la unidad de estructura  $NH-O-$ ;
- restos que tienen un grupo carbonilo,  $Q-C(=G)-M$  en el que G es O u S, y M es, por ejemplo,
  - $-OH$  o  $-SH$ ;
  - un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo aralquiloxilo, o un grupo alcariloxilo;
  - un grupo alquiltio, un grupo ariltio, un grupo aralquiltio, o un grupo alcariltio;
  - un grupo alquilcarboniloxilo, un grupo arilcarboniloxilo, un grupo aralquilcarboniloxilo, un grupo alcarilcarboniloxilo;
  - ésteres activados tales como ésteres de hidroxilaminas que tienen estructura de imida tales como N-hidroxisuccinimida o que tienen una unidad de estructura  $O-N$  en la que N es parte de un compuesto heteroarilo o, con  $G = O$  y Q ausente, tales como compuestos de ariloxilo con un resto arilo sustituido tales como pentafluorofenilo, paranitrofenilo o triclorofenilo;

en el que Q está ausente o es  $NH$  o un heteroátomo tal como S u O;

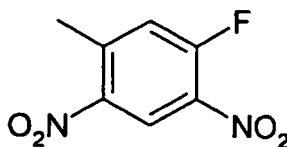
- $-NH-NH_2$ , o  $-NH-NH-$ ;
- $-NO_2$ ;
- el grupo nitrilo
- grupos carboxilo tales como el grupo aldehído o el grupo ceto;
- el grupo carboxilo;
- el grupo  $-N=C=O$  o el grupo  $-N=C=S$ ;
- grupos de haluro de vinilo tales como el grupo yoduro de vinilo o el bromuro de vinilo o triflato;
- $-C=C-H$ ;
- $-(C=NH_2Cl)-OAlquilo$

## ES 2 357 001 T3

- Grupos  $-(C=O)-CH_2-Hal$  en el que Hal es Cl, Br, o I;
- $-CH=CH-SO_2-$ ;
- un grupo disulfuro que comprende la estructura  $-S-S-$ ;
- el grupo



- el grupo



y en la que  $F_3$  es un grupo funcional capaz de formar un enlace químico con  $F_2$  y se selecciona preferiblemente entre el grupo anteriormente mencionado, comprendiendo  $F_2$  preferiblemente el resto  $-NH-$ , que comprende más preferiblemente un grupo amino, comprendiendo  $F_3$  preferiblemente el resto  $-(C=G)-$ , más preferiblemente  $-(C=O)-$ , más preferiblemente el resto  $-(C=G)-G-$ , aún más preferiblemente  $-(C=O)-G-$ , y de manera especialmente preferible  $-(C=O)-O$ , siendo D de manera particularmente preferible un enlace amida.

La presente invención se refiere también a cualquier conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el almidón hidroxialquílico es almidón hidroxietílico.

La presente invención se refiere también a cualquier conjugado tal como se ha descrito anteriormente, en el que el almidón hidroxietílico tiene un peso molecular de entre 2 a 200 kD, preferiblemente de entre 4 a 130 kD, más preferiblemente de entre 4 a 70 kD.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, o a un conjugado, obtenible mediante un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, para uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado tal como se ha descrito anteriormente, obtenible mediante un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

La expresión "en una cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a la cantidad que proporciona efecto terapéutico para una dolencia y régimen de administración dados. La administración es preferiblemente mediante rutas. La ruta específica escogida de la dolencia que se está tratando. La administración se lleva a cabo preferiblemente como parte de una formulación que contiene un vehículo adecuado, tal como polisorbato, un diluyente adecuado, tal como agua y un potenciador adecuado tal como sorbitol. La dosificación requerida dependerá de la gravedad de la dolencia que se está tratando, la respuesta individual de los pacientes, el procedimiento de administración usado, y similares.

De esta manera, en una forma de realización preferida, la composición farmacéutica comprende además al menos un diluyente, potenciador y/o vehículo farmacéuticamente aceptables, de manera especialmente preferible, útil en la terapia de G-CSF.

La composición farmacéutica se usa preferiblemente para el tratamiento de un trastorno caracterizado por una función hematopoyética o inmune reducida o enfermedades relacionadas con las anteriores.

Por tanto, la presente invención se refiere también al uso de una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente, que comprende un conjugado tal como se ha descrito anteriormente o un conjugado, obtenible mediante

## ES 2 357 001 T3

un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno caracterizado por una función hematopoyética o inmune reducidas.

5 De acuerdo con una forma de realización preferida, el trastorno caracterizado por una función hematopoyética o inmune reducidas, es un resultado de quimioterapia, terapia de radiación, enfermedad infecciosa, neutropenia crónica grave, o leucemia.

10 Por tanto, la presente invención se refiere también al uso de una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente, que comprende un conjugado tal como se ha descrito anteriormente o un conjugado, obtenible mediante un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno caracterizado por una función hematopoyética o inmune reducidas, en el que el trastorno es un resultado de quimioterapia, terapia de radiación, enfermedad infecciosa, neutropenia crónica grave, o leucemia.

15 El objeto del tratamiento con la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra preferiblemente mediante rutas i.v. o s.c. Para esto, se puede administrar la composición farmacéutica como una solución estéril.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras, tablas y ejemplos.

### Breve descripción de las figuras

20 Figura 1a

La Figura 1a muestra un análisis SDS page del conjugado HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 2.1 (a), Neupogen<sup>®</sup>. Para la electroforesis en gel, se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

30 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue<sup>®</sup>Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.

35 Banda B: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF (Neupogen<sup>®</sup>) con HES tal como se describe en el Ejemplo 2.1 (a).

Banda C: Material de partida de G-CSF.

40 Figura 1b

La Figura 1b muestra un análisis SDS page del conjugado HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 2.1 (a), Granocyte<sup>®</sup>. Para la electroforesis en gel, se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

50 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue<sup>®</sup>Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.

Banda B: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF (Granocyte<sup>®</sup>) con HES tal como se describe en el Ejemplo 2.1 (a).

55 Banda C: Material de partida de G-CSF.

Figura 2

60 La Figura 1b muestra un análisis SDS page del conjugado HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 2.1 (b), G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D. Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

65 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue<sup>®</sup>Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.

## ES 2 357 001 T3

- Banda B: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF con HES10/0,4 en tampón de NaOAc 0,1 M pH 5.0.
- Banda C: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF con HES10/0,7 en tampón de NaOAc 0,1 M pH 5.0.
- 5 Banda D: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF con HES50/0,4 en tampón de NaOAc 0,1 M pH 5.0.
- Banda E: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF con HES50/0,7 en tampón de NaOAc 0,1 M pH 5.0.
- 10 Banda F: Material de partida de G-CSF.

### Figura 3

15 La Figura 3 muestra un análisis SDS page de los conjugados HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 2.2, G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D. Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

- 20 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue®Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.
- 25 Banda B: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF con HES10/0,7 oxidado en tampón de NaOAc 0,1 M pH 5.0.
- Banda C: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF con HES50/0,4 oxidado en tampón de NaOAc 0,1 M pH 5.0.
- 30 Banda D: Producto bruto tras la conjugación de G-CSF con HES50/0,7 oxidado en tampón de NaOAc 0,1 M pH 5.0.
- Banda E: Material de partida de G-CSF.

### Figura 4

35 La Figura 4 muestra un análisis SDS page de los conjugados HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 2.3, G-CSF es Neupogen® o Granocyte®. Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

- 45 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue®Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.
- Banda B: Producto bruto (i-N) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- 50 Banda C: Producto bruto (ii-N) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- Banda D: Producto bruto (iii-N) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- 55 Banda E: Producto bruto (iv-N) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- Banda F: Producto bruto (i-G) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- Banda G: Producto bruto (ii-G) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- 60 Banda H: Producto bruto (iii-G) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- Banda I: Producto bruto (iv-G) de acuerdo con el Ejemplo 2.3.
- 65 Banda J: Neupogen®.

## ES 2 357 001 T3

Figura 5

La Figura 5 muestra un análisis SDS page de los conjugados HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 2.4, G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D. Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

- 10 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue®Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.
- Banda B: Producto bruto (vi) de acuerdo con el Ejemplo 2.4.
- 15 Banda C: Producto bruto (v) de acuerdo con el Ejemplo 2.4.
- Banda D: Material de partida de G-CSF.
- 20 Banda E: Marcador de proteínas SeeBlue®Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.
- Banda F: Producto bruto (ix) de acuerdo con el Ejemplo 2.4.
- 25 Banda G: Producto bruto (viii) de acuerdo con el Ejemplo 2.4.
- Banda H: Producto bruto (vii) de acuerdo con el Ejemplo 2.4.
- 30 Banda I: Material de partida de G-CSF.

Figura 6

La Figura 6 muestra un análisis SDS page de los conjugados HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 2.5, G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D. Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

- 40 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue®Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.
- 45 Banda B: Producto bruto de acuerdo con el Ejemplo 2.5.
- Banda C: Material de partida de G-CSF.

Figura 7

La Figura 7 muestra un análisis SDS page de los conjugados HES-G-CSF, producido de acuerdo con el Ejemplo 3, G-CSF es Neupogen® o Granocyte®. Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

- 50 Banda A: Marcador de proteínas SeeBlue®Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior a la parte inferior: 188 kD, 98 kD, 62 kD, 49 kD, 38 kD, 28 kD, 17 kD, 14 kD, 6 kD, 3 kD.
- 60 Banda B: Producto bruto (x) de acuerdo con el Ejemplo 3.
- Banda C: Producto bruto (xi) de acuerdo con el Ejemplo 3.
- 65 Banda D: Producto bruto (xii) de acuerdo con el Ejemplo 3.
- Banda E: Producto bruto (xiii) de acuerdo con el Ejemplo 3.

## ES 2 357 001 T3

Banda F: Producto bruto (xiv) de acuerdo con el Ejemplo 3.

Banda G: Producto bruto (xv) de acuerdo con el Ejemplo 3.

### 5 Figura 8

La Figura 8 muestra los resultados *in vitro* del Ejemplo 6.

10 En el diagrama, el eje x muestra la concentración en pg/ml, el eje y se refiere al número de células/100.000. En el diagrama, las siguientes abreviaturas se refieren a

G-CSF/A32 conjugado de G-CSF tal como se preparó de acuerdo con el Ejemplo 2.5.

15 G-CSF/A33 material de partida de G-CSF, usado para el conjugado del Ejemplo 2.5.

G-CSF/A57 Neulasta® no-modificado.

20 G-CSF/A58 Neupogen® no-modificado.

G-CSF/A60 conjugado de G-CSF tal como se preparó de acuerdo con el Ejemplo 4.2.

### 25 Figura 9

La Figura 9 muestra el cromatograma de HPGPC con respecto al producto bruto de la reacción de conjugación de acuerdo con el Ejemplo 4.1. Se usaron los siguientes parámetros en el análisis HPGPC:

30 Columna: Superose 12 HR 10/30 300 x 10 mm de D.I. (Farmacia).

Eluyente: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 27,38 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,62 mM; NaCl 0,2 M; NaN<sub>3</sub> al 0,005% en 1 l de agua desmineralizada.

35 Flujo: 0,24 ml/h.

Detector 1: detector MALLS.

Detector 2: UV (280 nm).

40 Detector 3: IR (Detector de Índice de Refracción).

A representa el resultado del detector 1, B representa el resultado del detector 2.

### 45 Figura 10

La Figura 10 muestra el cromatograma de HPGPC con respecto al producto de la reacción de conjugación de acuerdo con el Ejemplo 4.1, en el que el contenido de la mezcla con respecto a los subproductos de reacción tales como los oxo-HES sin reaccionar y la N-hidroxisuccinimida así como el disolvente se degradaron usando una membrana de ultrafiltración de 10 kD en una centrifuga con enfriamiento.

Se usaron los siguientes parámetros en el análisis de HPGC

55 Columna: Superose 12 HR 10/30 300 x 10 mm de D.I. (Farmacia).

Eluyente: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 27,38 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,62 mM; NaCl 0,2 M; NaN<sub>3</sub> al 0,005% en 1 l de agua desmineralizada.

60 Flujo: 0,24 ml/h.

Detector 1: detector MALLS.

Detector 2: UV (280 nm).

65 Detector 3: IR (Detector de Índice de Refracción).

A representa el resultado del detector 1, B representa el resultado del detector 2.

## ES 2 357 001 T3

### Figura 11

Se usaron los siguientes parámetros en el análisis HPGC

- 5      Columna:      Superose 12 HR 10/30 300 x 10 mm de D.I. (Pharmacia).  
Eluyente:      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 27,38 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,62 mM; NaCl 0,2 M; NaN<sub>3</sub> al 0,005% en 1 l de agua desmineralizada.
- 10     Flujo:            0,24 ml/h.
- Detector 1:    detector MALLS.
- Detector 2:    UV (280 nm).
- 15     Detector 3:    IR (Detector de Índice de Refracción).

A representa el resultado del detector 1, B representa el resultado del detector 2.

20

### Figura 12

- Columna:      Superose 12 HR 10/30 300 x 10 mm de D.I. (Pharmacia).
- 25     Eluyente:      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 27,38 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,62 mM; NaCl 0,2 M; NaN<sub>3</sub> al 0,005% en 1 l de agua desmineralizada.
- Flujo:            0,24 ml/h.
- 30     Detector 1:    detector MALLS.
- Detector 2:    UV (280 nm).
- 35     Detector 3:    IR (Detector de índice de refracción).

A representa el resultado del detector 1, B representa el resultado del detector 2.

### Figura 13

40      La Figura 13 muestra el análisis SDS-PAGE del flujo pistón y del eluato de G-CSF modificado con HES (A32) tras la cromatografía en DEAE-Sefarosa CL-6B. 1,5% de las fracciones indicadas se desalaron mediante ultrafiltración, se secaron en SpeedVac y se aplicaron sobre un gel de poliacrilamida al 12,5%.

45

### Figura 14

La Figura 14 muestra un espectro MALDI/TOF del material de partida de G-CSF (muestra A33).

50

### Figura 15

La Figura 15 muestra un espectro MALDI/TOF de G-CSF modificado con HES (muestra A32).

55

### Figura 16

La Figura 16 muestra un espectro MALDI/TOF de G-CSF modificado con HES (muestra A60).

60

### Figura 17

La Figura 17 muestra la electroforesis en gel de las mezclas de reacción del ejemplo 7.2 (b).

65

Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las

## ES 2 357 001 T3

instrucciones de los fabricantes. Se tiñó el gel con Roti-Blue (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 Banda A: Marcador de proteínas Roti-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior hasta la parte inferior: 200 KD, 119 KD, 66 KD, 43 KD, 29 KD, 20 KD, 14.3 KD.
- 10 Banda B: Producto bruto tras la conjugación de hG-CSF con el derivado de HES preparado en el ejemplo 7.1 (d).
- 15 Banda C: Producto bruto tras la conjugación de hG-CSF con el derivado de HES preparado en el ejemplo 7.1 (b).
- Banda D: Producto bruto tras la conjugación de hG-CSF con el derivado de HES preparado en el ejemplo 7.1 (j).
- Banda E: Reacción de control. HES 50/07.

### 20 Figura 18

La Figura 18 muestra la electroforesis en gel de las mezclas de reacción del ejemplo 7.2 (d). Para la electroforesis en gel se emplearon un XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y un suministro eléctrico Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de avance MOPS SDS en condiciones de reducción (ambos de invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se tiñó el gel con Roti-Blue (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 30 Banda A: Marcador de proteínas Roti-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D). Marcador de pesos moleculares desde la parte superior hasta la parte inferior: 200 KD, 119 KD, 66 KD, 43 KD, 29 KD, 20 KD, 14.3 KD.
- Banda B: hG-CSF tras intercambio de tampón tal como se describe en el ejemplo 7.2 (c).
- 35 Banda C: Producto bruto tras la conjugación de hG-CSF con el derivado de HES preparado tal como se describe en el ejemplo 7.1 (f).
- 40 Banda D: Producto bruto tras la conjugación de hG-CSF con el derivado de HES preparado tal como se describe en el ejemplo 7.1 (h).

### Figura 19

45 La Figura 19 muestra el cromatograma de HPGPC con respecto al producto de la reacción de conjugación de acuerdo con el Ejemplo 7.3 (detector MALLS; diagrama superior; detector UV: diagrama inferior). Se usaron los siguientes parámetros en el análisis HPGPC:

- Columna: Superose 12 HR 10/30 300 x 10 mm de D.I. (Pharmacia).
- 50 Eluyente:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  27,38 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  12,62 mM; NaCl 0,2 M;  $\text{NaN}_3$  al 0,005% en 1 l de agua desmineralizada.
- Flujo: 0,24 ml/h.
- 55 Detector 1: detector MALLS.
- Detector 2: UV (280 nm).
- 60 Detector 3: IR (Detector de índice de refracción).

### Figura 20

65 La Figura 20 muestra los resultados del ensayo de mitogenicidad del ejemplo 7.4. El eje Y indica el número de células NFS-60/ml y el eje X la concentración en pg/ml.



Figura 21

La Figura 21 muestra los resultados del ensayo *in vivo* del ejemplo 7.5.

5

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 10 *Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído*

##### Ejemplo 1.1 (a)

#### 15 *Síntesis mediante oxidación con periodato de almidón hidroxietílico selectivamente oxidado en su extremo reductor e incubación a 0°C*

Se disolvieron 100 mg de Oxo-HES 10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4, preparado por Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D; de acuerdo con el documento DE 196 28 705. A1, en 5 ml de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2 y se enfriaron a 0°C. Se disolvieron 21,4 mg de periodato de sodio (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 5 ml del mismo tampón y se enfriaron a 0°C. Se mezclaron ambas soluciones y tras incubación durante 10 min a 0°C, se añadieron 0,73 ml de glicerol y se incubó la mezcla de reacción a 21°C durante 10 min. Se dializó la mezcla de reacción durante 24 h frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

##### 25 Ejemplo 1.1 (b)

#### *Síntesis mediante oxidación con periodato de almidón hidroxietílico selectivamente oxidado en su extremo reductor e incubación a 21°C*

30 Se disolvieron 100 mg de Oxo-HES 10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4, preparado por Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D; de acuerdo con el documento DE 196 28 705. A1, en 5 ml de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2. Se disolvieron 214 mg de periodato de sodio (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 5 ml del mismo tampón. Se mezclaron ambas soluciones y tras incubación durante 10 min a 21°C, se añadieron 0,73 ml de glicerol y se incubó la mezcla de reacción a 21°C durante 10 min. Se dializó la mezcla de reacción durante 24 h frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

##### Ejemplo 1.2 (a)

#### 40 *Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído mediante oxidación con periodato de almidón hidroxietílico con extremo reductor no oxidado e incubación a 0°C*

Se disolvieron 100 mg de Oxo-HES 10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4, preparado por Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D) en 5 ml de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2 y se enfriaron a 0°C. Se disolvieron 214 mg de periodato de sodio (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 5 ml del mismo tampón y se enfriaron a 0°C. Se mezclaron ambas soluciones y tras incubación durante 10 min a 0°C, se añadieron 0,73 ml de glicerol y se incubó la mezcla de reacción a 21°C durante 10 min. Se dializó la mezcla de reacción durante 24 h frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

##### 50 Ejemplo 1.2 (b)

#### *Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído mediante oxidación con periodato de almidón hidroxietílico sin extremo reductor oxidado e incubación a 21°C*

55 Se disolvieron 100 mg de Oxo-HES 10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4, preparado por Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D) en 5 ml de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2. Se disolvieron 21,4 mg de periodato de sodio (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 5 ml del mismo tampón. Se mezclaron ambas soluciones y tras incubación durante 10 min a 21°C, se añadieron 0,73 ml de glicerol y se incubó la mezcla de reacción a 21°C durante 10 min. Se dializó la mezcla de reacción durante 24 h frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

##### Ejemplo 1.3

#### 65 *Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído a partir de almidón hidroxietílico amino funcionalizado y ácido formilbenzoico*

Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D; preparó Oxo-HES 10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4; de acuerdo con el documento DE 196 28 705. A1.

## ES 2 357 001 T3

Se disolvieron 5,1 g (0,51 mmol) de oxo-HES10/0,4 en 15 ml de dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron gota a gota en atmósfera de nitrógeno a una solución de 5,1 ml (51 mmol) de 1,4-diaminobutano en 10 ml de dimetil sulfóxido anhidro y se agitaron a 40°C durante 19 h. Se añadió la mezcla de reacción a una mezcla de 80 ml de etanol y 80 ml de acetona. El precipitado resultante se separó mediante centrifugación, se lavó con una mezcla de 20 ml de etanol y 20 ml de acetona y se volvió a disolver en 80 ml de agua. Se dializó la solución durante 4 días frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó posteriormente. El rendimiento fue del 67% (3,4 g) de amino-HES 10/0,4.

Se disolvieron 150 mg de ácido 4-formilbenzoico y 230 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 10 ml de N,N-dimetilformamida y se añadieron 204 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida. Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadió 1 g del amino-HES 10/0,4. Tras agitación durante 19 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 84 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en 50 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

### Ejemplo 1.4

*Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído a partir de almidón hidroxietílico y ácido formilbenzoico*

Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D preparó Oxo-HES 10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7; de acuerdo con el documento DE 196 28 705. A1).

Se disolvieron 83 mg de ácido 4-formilbenzoico y 180 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 5 ml de N,N-dimetilformamida y se añadieron 78 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida. Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadieron 0,5 g de oxo-HES 10/0,7. Tras agitación durante 19 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 37,5 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en una mezcla de 2,5 ml de agua y 2,5 ml de DMF y se precipitó de nuevo tal como se ha descrito anteriormente. Se recogió el producto de reacción mediante centrifugación tal como se ha descrito, se volvió a disolver en 10 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

### Ejemplo 1.5

*Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído a partir de almidón hidroxietílico y ácido formilbenzoico*

Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim D. preparó HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7).

Se disolvieron 50 mg de ácido 4-formilbenzoico y 108 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 3 ml de N,N-dimetilformamida (Calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 47 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida. Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadieron 0,3 g de HES10/0,7. Tras agitación durante 19 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 23 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en una mezcla de 1,5 ml de agua y 1,5 ml de DMF y se precipitó de nuevo tal como se ha descrito anteriormente. Se recogió el producto de reacción mediante centrifugación, tal como se ha descrito, se volvió a disolver en 10 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

### Ejemplo 1.6

*Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído a partir de almidón hidroxietílico amino funcionalizado y pentafluorofenil éster del ácido formilbenzoico*

Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim D. preparó HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7); de acuerdo con el documento DE 196 28 705. A1.

Se disolvieron 6,0 g (0,6 mmol) de oxo-HES 10/0,7 en 20 ml de dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron gota a gota en atmósfera de nitrógeno a una solución de 6 ml (60 mmol) de 1,4-diaminobutano en 11 ml de dimetil sulfóxido anhidro y se agitaron a 40°C durante 19 h. Se añadió la mezcla de reacción a una mezcla de 80 ml de etanol y 80 ml de acetona. Se separó el precipitado resultante mediante centrifugación, se lavó con una mezcla de 20 ml de etanol y 20 ml de acetona y se volvió a disolver en 80 ml de agua. Se dializó la solución durante 4 días frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó posteriormente. El rendimiento fue del 52% (3,15 g) de amino-HES 10/0,7.

## ES 2 357 001 T3

Se sintetizó pentafluorofenil éster de ácido 4-formilbenzoico tal como se describe en J. S. Lindsey y col., Tetrahedron 50 (1994) pp. 8941-68, especialmente p. 8956. Se disolvieron 50 mg de amino-HES10/0,7 en 0,5 ml de N,N-dimetilformamida (Calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 15,3 mg de pentafluorofenil éster del ácido 4-formilbenzoico. Tras agitación durante 22 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 3,5 ml de 2-propanol enfriado en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se lavó con 4 ml de 2-propanol enfriado en hielo, se volvió a disolver en 50 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

### Ejemplo 1.7

*Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído a partir de almidón hidroxietílico y pentafluorofenil éster del ácido formilbenzoico*

Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim D. preparó HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7); de acuerdo con el documento DE 196 28 705. A1.

Se sintetizó pentafluorofenil del ácido 4-formilbenzoico tal como se describe en J. S. Lindsey y col., Tetrahedron 50 (1994) pp. 8941-68, especialmente p. 8956. Se disolvieron 200 mg de oxo-HES10/0,7 en 2 ml de N,N-dimetilformamida (calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 61,2 mg de pentafluorofenil éster del ácido 4-formilbenzoico. Tras agitación durante 22 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 15 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en una mezcla de 1,4 ml de agua y 0,7 ml de DMF y se precipitó de nuevo tal como se ha descrito anteriormente. Se recogió el producto de reacción mediante centrifugación tal como se ha descrito, se volvió a disolver en 10 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

### Ejemplo 1.8

*Síntesis de almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído a partir de almidón hidroxietílico amino funcionalizado y ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi)butírico*

Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim D. preparó HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7); de acuerdo con el documento DE 196 28 705. A1.

Se disolvieron 5,1 g (0,51 mmol) de oxo-HES10/0,4 en 15 ml de dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron gota a gota en atmósfera de nitrógeno a una solución de 5,1 ml (51 mmol) de 1,4-diaminobutano en 10 ml de dimetil sulfóxido anhidro y se agitó a 40°C durante 19 h. Se añadió la mezcla de reacción a una mezcla de 80 ml de etanol y 80 ml de acetona. Se separó el precipitado resultante mediante centrifugación, se lavó con una mezcla de 20 ml de etanol y 20 ml de acetona y se volvió a disolver en 80 ml de agua. Se dializó la solución durante 4 días frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó posteriormente. El rendimiento fue del 67% (3,4 g) de amino-HES10/0,4.

Se disolvieron 80,5 mg de ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi)butírico (Calbiochem-Novabiochem, Läufelfingen, CM) y 61 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 3 ml de N,N-dimetilformamida (calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 45,4 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida. Tras incubación a 21°C durante 30 minutos, se añadieron 0,3 g de amino-HES 10/0,4. Tras agitación durante 22 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 23 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en una mezcla de 2 ml de agua y 1 ml de DMF y se precipitó de nuevo tal como se ha descrito anteriormente. Se recogió el producto de reacción mediante centrifugación, tal como se ha descrito, se volvió a disolver en 10 ml de agua, se dializó durante 1 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó.

## Ejemplo 2

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante aminación reductora*

### Ejemplo 2.1 (a)

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante aminación reductora con almidón hidroxietílico con extremo reductor no oxidado a pH = 7,4 (Ejemplo Comparativo)*

En el ejemplo 2.1, se probó usar el procedimiento de síntesis del documento WO 03/074087 (ejemplo 12, página 22-23) para la producción de un conjugado HES-G-CSF.

A 3,33 µl de una solución acuosa de G-CSF (Neupogen® de Amgen, Múnich, D, o Granocyte® de Aventis Pharma AG, Zurich, CH, respectivamente, 3 mg/ml) en tampón de fosfato de sodio 0,1 M con pH 7,4, se añadieron 3,33 µl de

## ES 2 357 001 T3

una solución de HES10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D, 79 mg/ml) en el mismo tampón. A esta mezcla, se añadieron 3,33  $\mu$ l de una solución de cianoborohidruro de sodio 60 mM en el mismo tampón, y se incubó la mezcla resultante durante 4 h a 22°C. Posteriormente, se añadieron otros 3,33  $\mu$ l de la solución de cianoborohidruro de sodio 60 mM preparada recientemente. Durante el tiempo de incubación, se añadieron un total de 5 porciones de 3,33  $\mu$ l de una solución de cianoborohidruro de sodio 60 mM preparada recientemente. Se analizó la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel. No se observó reacción.

### Ejemplo 2.1 (b)

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante aminación reductora con almidón hidroxietílico con extremo reductor no oxidado a un pH de entre 5,0 a 9,2 (Ejemplo Comparativo)*

A 3,33  $\mu$ l de una solución acuosa de G-CSF (G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D, 3 mg/mL) en un tampón dado, se añadieron 3,33  $\mu$ l de una solución de HES (300 mg/ml) en el mismo tampón. Se enfrió la mezcla a 4°C, y se añadieron 3,33  $\mu$ l de una solución de cianoborohidruro de sodio 60 mM en el mismo tampón a 4°C, y se incubó la mezcla resultante durante 20 h a 4°C.

Se emplearon las siguientes preparaciones de HES y del tampón:

- a) Tampón: tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0
- HES 10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
  - HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
  - HES50/0,4 (MW = 50 kD, DS = 0,4, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
  - HES50/0,7 (MW = 50 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
- b) Tampón: tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2
- HES 10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
- c) Tampón: tampón de borato de sodio 0,1 M, pH 8,3
- HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
- d) Tampón: tampón de borato de potasio 0,2 M, pH 9,2
- HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)

Se analizó cada mezcla de reacción mediante electroforesis en gel. No se observó conjugación o fue despreciable (no se muestran los barridos en gel de las reacciones b) a d)).

### Ejemplo 2.2

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante aminación reductora con almidón hidroxietílico con extremo reductor oxidado a un pH de entre 5,0 a 9,2 (Ejemplo Comparativo)*

A 3,33  $\mu$ l de una solución acuosa de G-CSF (G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D, 3 mg/ml) en un tampón dado, se añadieron 3,33  $\mu$ l de una solución de oxo-HES (300 mg/ml) en el mismo tampón. Se enfrió la mezcla a 4°C, y se añadieron 3,33  $\mu$ l de una solución de cianoborohidruro de sodio 60 mM en el mismo tampón, y se incubó la mezcla durante 17 h a 4°C.

Se emplearon las siguientes preparaciones de HES y del tampón:

- a) Tampón: tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0
- oxo-HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
  - oxo-HES50/0,4 (MW = 50 kD, DS = 0,4, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
  - oxo-HES50/0,7 (MW = 50 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)
- b) Tampón: tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2
- HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)

## ES 2 357 001 T3

- c) Tampón: tampón de borato de sodio 0,1 M, pH 8,3  
- HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)

- 5 d) Tampón: tampón de borato de potasio, pH 9,2  
- HES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)

Se analizó cada mezcla de reacción mediante electroforesis en gel. No se observó conjugación o fue despreciable (no se muestran los barridos en gel de las reacciones b) a d)).

Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D, llevó a cabo la oxidación de HES10/0,4 (MW = 10 kD, DS = 0,4); de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1.

### 15 Ejemplo 2.3

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante aminación reductora con almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído sintetizado mediante oxidación con periodato*

20 A 3,33  $\mu$ l de una solución acuosa de G-CSF (Granocyte<sup>®</sup> de Aventis Pharma AG, Zurich, CH, y Neupogen<sup>®</sup> de Amgen, Múnich, D, respectivamente, 3 mg/mL) en tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,0, se añadieron 3,33  $\mu$ l de una disolución de un aldehído-HES (79 mg/ml) en el mismo tampón. A esta mezcla se añadieron 3,33  $\mu$ l de una disolución de cianoborohidruro de sodio 60 mM en el mismo tampón y se incubó la mezcla durante 25 h a 21°C. Se analizó la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel.

25 Se emplearon los siguientes conjugados de HES funcionalizados con aldehído:

- (i-N) preparado con Neupogen<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.1 (a) anteriormente en el presente documento;  
30 (ii-N) preparado con Neupogen<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.1 (b) anteriormente en el presente documento;  
(iii-N) preparado con Neupogen<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.2 (a) anteriormente en el presente documento;  
35 (iv-N) preparado con Neupogen<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.2 (b) anteriormente en el presente documento;  
(i-G) preparado con Granocyte<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.1 (a) anteriormente en el presente documento;  
(ii-G) preparado con Granocyte<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.1 (b) anteriormente en el presente documento;  
40 (iii-G) preparado con Granocyte<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.2 (a) anteriormente en el presente documento;  
(iv-G) preparado con Granocyte<sup>®</sup> de acuerdo con El Ejemplo 1.2 (b) anteriormente en el presente documento.

### 45 Ejemplo 2.4

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante aminación reductora con almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído sintetizado mediante conjugación de almidón hidroxietílico con ácido formil-carboxílico*

50 A 3,33  $\mu$ l de una solución acuosa de G-CSF (G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D, 3 mg/ml) en tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,0, se añadieron 3,33  $\mu$ l de una solución de un aldehído-HES (118,5 mg/ml) en el mismo tampón y se enfriaron a 4°C. Se añadieron a la mezcla 3,33  $\mu$ l de una solución de cianoborohidruro de sodio 60 mM en el mismo tampón a 4°C y se incubó la mezcla durante 17 h a 4°C. Se analizó la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel.

55 Se emplearon los siguientes conjugados de HES funcionalizados con aldehído:

- (v) preparado de acuerdo con El Ejemplo 1.4 anteriormente en el presente documento;  
60 (vi) preparado de acuerdo con El Ejemplo 1.5 anteriormente en el presente documento;  
(vii) preparado de acuerdo con El Ejemplo 1.6 anteriormente en el presente documento;  
(viii) preparado de acuerdo con El Ejemplo 1.7 anteriormente en el presente documento;  
65 (ix) preparado de acuerdo con El Ejemplo 1.8 anteriormente en el presente documento.

## ES 2 357 001 T3

### Ejemplo 2.5

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante aminación reductora con almidón hidroxietílico funcionalizado con aldehído sintetizado mediante conjugación de almidón hidroxietílico con ácido formil-carboxílico*

5 A 2,5 ml de una solución acuosa de G-CSF (G-CSF de Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D, 227 mg/ml) en tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,0, se añadieron 136 mg de aldehído-HES 10/0,4, preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.3 anteriormente en el presente documento, y se enfrió la solución a 0°C. Se añadieron a la mezcla 2,5 ml de una solución de cianoborohidruro de sodio 40 mM enfriada en hielo en el mismo tampón, y se incubó la mezcla durante 17 h a 4°C. Se analizó la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel.

### Ejemplo 3

15 (No de acuerdo con la invención)

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante alquilación de SH*

20 Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D preparó Oxo-FIES10/0,7 (MW = 10 kD, DS = 0,7); de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1.

25 Se disolvieron 6,0 g (0,6 mmol) de oxo-HES 10/0,7 en 20 ml de dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tautkirchen, D) y se añadieron gota a gota en atmósfera de nitrógeno a una solución de 6 ml (60 mmol) de 1,4-diaminobutano en 11 ml de dimetil sulfóxido anhidro y se agitó a 40°C durante 19 h. Se añadió la mezcla de reacción a una mezcla de 80 ml de etanol y 80 ml de acetona. Se separó el precipitado resultante mediante centrifugación, se lavó con una mezcla de 20 ml de etanol y 20 ml de acetona y se volvió a disolver en 80 ml de agua. Se dializó la solución durante 4 días frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó posteriormente. El rendimiento fue del 52% (3,15 g) de amino-HES 10/0,7.

30 A 132 µg de amino 10/0,7, disueltos en 100 µl de tampón de fosfato de sodio (0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2), se añadieron 10 µl de una solución de 17,5 mg/ml de éster de N-alfa(maleimidoacetoxi) succinimida (AMAS) en DMSO seco (ambos de Fluka, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D), y se incubó la solución transparente durante 80 min a 25°C y posteriormente durante 20 min a 40°C. Se retiró el exceso de AMAS mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, 5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D) a 13.000 rpm, se lavó 2 veces durante 30 min con 450 µl del tampón fosfato y una vez con 450 µl de un tampón B. A la solución residual, se añadieron 10 µg de G-CSF (Neupogen® de Amgen, Múnich, D, y Granocyte® de Aventis Pharma AG, Zürich, CH, respectivamente, 3 µg/µl en tampón fosfato), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Se analizó la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel tras concentración a vacío.

40 Se escogieron los siguientes procedimientos:

- 45 (x) G-CSF (Granocyte®) que emplea tampón de fosfato de sodio (0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2) como tampón B.
- (xi) G-CSF (Neupogen®) que emplea tampón de fosfato de sodio (0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2) como tampón B.
- 50 (xii) G-CSF (Granocyte®) que emplea una mezcla 1:1 (v/v) de tampón de fosfato de sodio (0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2) y urea 8 M, SDS al 1%, pH 7,4 como tampón B.
- (xiii) G-CSF (Neupogen®) que emplea una mezcla 1:1 (v/v) de tampón de fosfato de sodio (0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2) y urea 8 M, SDS al 1%, pH 7,4 como tampón B.
- 55 (xiv) G-CSF (Granocyte®) que emplea urea 8 M, SDS al 1%, pH 7,4 como tampón B.
- (xv) G-CSF (Neupogen®) que emplea urea 8 M, SDS al 1%, pH 7,4 como tampón B.

60

65

## ES 2 357 001 T3

### Ejemplo 4

No de acuerdo con la invención

- 5 *Síntesis de conjugados de G-CSF mediante reacción de almidón hidroxietílico que tiene un grupo éster reactivo con G-CSF*

#### Ejemplo 4.1

- 10 Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D preparó Oxo-HES10/0,4 (MW = 10.559 D, DS = 0,4), de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1. El grado de oxidación de oxo-HES fue del 95%.

15 Se disolvieron 66 mg de oxo-HES10/0,4 en 0,5 ml de DMF anhidro. A esta solución, se añadieron 3,4 mg de carbonato de N,N'-disuccinimidilo, y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. La solución resultante tuvo una concentración de HES reactivo de un 13 por ciento en peso.

20 Una solución de G-CSF (Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D), que tenía una concentración de aproximadamente 0,5 mg de G-CSF/ml, se concentró a una concentración de 10 mg/ml mediante ultracentrifugación a un corte de 10 kD usando una centrífuga con enfriamiento.

25 A 0,5 ml de esta solución concentrada de G-CSF, se añadieron 180  $\mu$ l de una solución de bicarbonato de sodio. Posteriormente, se añadieron gota a gota 3 porciones (de 100  $\mu$ l cada una) de la solución de HES reactivo a la solución de proteínas, hasta que, tras aproximadamente 30 min, la reacción llegó a la finalización. De esta manera, la relación molar total de HES reactivo: G-CSF fue de 20:1. A continuación se ajustó el pH de la mezcla a 4,0 usando HCl 0,1 N.

30 Un análisis de HPGPC (Cromatografía de Permeación en Gel de Alto rendimiento) proporcionó un resultado de aproximadamente el 70%. En la Fig. 9 se muestra este resultado.

35 La mezcla se podía almacenar a 4°C a un pH de 4,0 durante 4 d y, de acuerdo con los análisis de HPGPC, permaneció estable, es decir, sin cambiar.

Fue posible la degradación del contenido de la mezcla con respecto a los subproductos de reacción tales como oxo-HES sin reaccionar y N-hidroxisuccinimida libre así como del disolvente, usando una membrana de ultrafiltración de 10 kD en una centrífuga con enfriamiento sin dificultades. En la fig. 10 se muestran los resultados de este experimento de degradación.

#### Ejemplo 4.2

- 40 Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D preparó Oxo-HES10/0,4 (MW = 10.559 D, DS = 0,4), de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1. El grado de oxidación de oxo-HES fue del 95%.

45 Se disolvieron 400 mg de oxo-HES10/0,4 en 1 ml de DMF anhidro. A esta solución, se añadieron 21 mg de carbonato de N,N'-disuccinimidilo, y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. La solución resultante tuvo una concentración de HES reactivo de un 40 por ciento en peso.

50 Una solución de G-CSF (Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D), que tenía una concentración de aproximadamente 0,5 mg de G-CSF/ml, se concentró a una concentración de 10 mg/ml mediante ultracentrifugación a un corte de 10 kD usando una centrífuga con enfriamiento.

55 A 0,5 ml de esta solución concentrada de G-CSF, se añadieron 180  $\mu$ l de una solución de bicarbonato de sodio. Posteriormente, se añadieron gota a gota 3 porciones (de 100  $\mu$ l cada una) de la solución de HES reactivo a la solución de proteínas, hasta que, tras aproximadamente 30 min, la reacción llegó a la finalización. De esta manera, la relación molar total de HES reactivo: G-CSF fue de 50:1. A continuación se ajustó el pH de la mezcla a 4,0 usando HCl 0,1 N.

60 Un análisis de HPGPC (Cromatografía de Permeación en Gel de Alto Rendimiento) proporcionó un rendimiento de más del 95%. No se podía detectar G-CSF sin reaccionar. En la Fig. 11 se muestra este resultado.

65 Se purificó la mezcla usando tecnología de ultrafiltración sin dificultades. En la Fig. 12 se muestran los resultados de esta degradación.

### Ejemplo 5

#### 5.1 Purificación

- 65 Se obtuvo G-CSF purificado que tenía esencialmente las mismas características que el producto comercial Neupogen<sup>®</sup> (Amgen) y se mantuvo 1 alícuota sin modificar como control.

## ES 2 357 001 T3

### 5.2 Síntesis de conjugados de HES y G-CSF

Se sintetizaron los conjugados esencialmente tal como se ha descrito en el Ejemplo 4.2, pero con Oxo-HES50/0,7 (código de la muestra A60), o tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.5 (código de la muestra A32) y se usaron para el intercambio de tampón y la purificación adicionales.

### 5.3 Intercambio de tampón de muestras de G-CSF y G-CSF modificado con HES antes de la purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico

Se sometieron muestras de G-CSF modificado con HES o G-CSF sin modificar (como control) (0,5-5 mg de proteína) a intercambio de tampón usando unidades de Concentrador Vivaspin 6 (10.000 MWCO PES, Vivascience, N° de Cat. VS0602). Se concentraron las muestras a 0,5-0,7 ml y se diluyeron a 5 ml con tampón de fosfato de sodio 10 mM pH 7,2. Se sometió cada muestra 3 veces a este ciclo de concentración/intercambio de tampón.

### 5.4 Cromatografía de intercambio aniónico de G-CSF y formas modificadas con HES de las mismas en una columna de DEAE-Sefarosa

Muestras de G-CSF tras la modificación con HES y, para comparación, muestras de G-CSF sin modificar, se purificaron y analizaron usando una cromatografía de intercambio aniónico a temperatura ambiente usando un sistema ÄKTA explorer 10 tal como se ha descrito. Se dializaron alícuotas de G-CSF tanto antes como después de la HESilación mediante ultrafiltración frente a dicho tampón A (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2) o se diluyeron con aproximadamente 13 volúmenes de tampón A. La columna que contenía 2 ml de DEAE-Sefarosa (DEAE-Sepharose CL-6B, Pharmacia N° de Cat. 17-0710-01) se regeneró 5,0 volúmenes de columna (VC) de guanidina/HCl 6,5 M, 5,0 VC de tampón A, 5,0 VC de tampón C (NaCl 1,5 M en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2) y a continuación 10 VC de tampón A. a continuación se inyectaron las muestras (0,8-4,5 ml en tampón de fosfato de sodio 10 mM pH 7,2) usando un caudal de 0,6 ml/min. Tras el lavado del bucle de muestra con 10 ml (bucle de muestra de 2 ml) o 20 ml (bucle de muestra de 5 ml) de tampón A, dependiendo de la muestra aplicada, se lavó la columna adicionalmente con 0-22 VC de tampón A (caudal = 0,8 ml/min). Se llevó a cabo la elución aplicando un gradiente lineal de 0-100% de tampón B en 5 VC y un arrastre isocrático con 2,5 VC de 100% de tampón B usando un caudal de 0,6 ml/min. Se volvió a equilibrar la columna con 5 VC de tampón A y se regeneró tal como se ha detallado anteriormente usando un caudal de 1 ml/min.

Si se requirió, se concentraron las muestras usando un concentrador Vivaspin y se llevó a cabo el intercambio de tampón tal como se ha descrito anteriormente. Se almacenaron las muestras a 0-8°C en tampón de acetato de sodio 10 mM pH 4,0 antes o después de la filtración estéril usando unidades de filtración de 0,2 µm, Corning, N° de Cat. 431215). Se prepararon las siguientes muestras para los bioensayos *in vitro* y para el análisis analítico adicional. Se determinó la concentración de proteínas tal como se describe en la sección 6.1 a continuación:

- I. 0401-15/A33, 0,44 mg/ml, volumen = 500 µl de G-CSF (*E. coli*)
- II. 0402-03/A60, 0,35 mg/ml, volumen = 600 µl de H-G-CSF (G-CSF modificado con HES, 10/0,4)
- III. 0401-13/A32, 0,28 mg/ml, volumen = 900 µl G-CSF (*E. coli*) modificado con HES, 10/0,4
- IV. 0401-28/A58, 0,60 mg/ml, volumen = 350 µl de Neupogen
- V. 0401-28/A57, 0,50 mg/ml, volumen = 400 µl de Neulasta

### 5.5. Análisis adicional de muestras de G-CSF

Se analizaron alícuotas de las muestras para su contenido de proteína y para las modificaciones.

#### 5.5(a) Cuantificación de proteínas de G-CSF mediante RIP-HPLC

Se cuantificó el contenido de proteínas de G-CSF usando la preparación de proteínas sin modificar (concentración: 0,453 mg/ml) como patrón.

Se usó un sistema HPLC Dionex que consiste en una bomba P 680 A HPG, una unidad de desgasificación Degasys DG 1210, un automuestreador y un inyector ASI-100, un bucle de muestra de 250 µl, se usó un apartado de columna termostatzado TCC 100 junto con un UV/Vis-Detektor UVD170U equipado con un Software Chromeleon Chromatography Management System. Se usaron una precolumna CC 8/4 Nucleosil 120-5 C4, Macherey-Nagel, N° de Cat. 721889, y una columna de separación 40 C-4 Nucleosil MPN, columna RP de 5 µm, 125 x 4 mm (Macherey-Nagel, N° de orden 7200 45.40). El disolvente A fue H<sub>2</sub>O más 0,06% (v/v) de ácido trifluoroacético y el disolvente B fue acetonitrilo al 90% en H<sub>2</sub>O, que contenía 0,06% (v/v) de ácido trifluoroacético; el caudal fue de: 1 ml/min. La detección UV fue a una longitud de onda de 214, 221, 260 y a 280 nm.



## ES 2 357 001 T3

Se inyectaron muestras de aproximadamente 10 -20  $\mu\text{g}$  en una columna RP-HPLC. Se usó el siguiente gradiente:

- 0-5 min: 0-10% de B
- 5 - 17 min: 10-45% de B
- 35 min: 45-80% de B
- 36 min: 80-100% de B
- 10 - 38 min: 100% de B
- 39 min: 10% de B
- 15 - 45 min: 10% de B

Se usó el área del pico resultante en la posición de elución de la preparación de G-CSF patrón y se comparó con el patrón de referencia comparando el pico que aparecía a alrededor de 29 min a una longitud de onda de 280 nm.

### 20 5.5(b) Reducción + carboxamidometilación de la proteína de G-CSF

Alícuotas procedentes de las muestras de proteínas de G-CSF se redujeron y carboxamidometilaron tal como se describe en otra parte (Guillermina Forno, Mariela Bollati Fogolin, Marcos Oggero, Ricardo Kratje, Marina Etcheverrigaray, Harald S. Conradt, Manfred Nimtze (2004) N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte- macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line; European J. Biochem, 273 (5), 907-919). La carboxamidometilación condujo a restos de cisteína modificados. Se llevó a cabo la digestión con endoproteinasa Glu-C de la proteína carboxamidometilada en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM que contenía urea 1 M a pH 7,8 y usando una relación enzima/sustrato de 0,2:10 durante 18-24 horas.

### 30 5.5(c) Separación de péptidos Endo-Glu-C mediante RP-HPLC

Los péptidos generados por la digestión con Endo-Glu-C se separaron en un sistema HPLC Dionex que consiste en una bomba P 680 A HPG, una unidad de desgasificación Degasys DG 1210, un automuestreador y un inyector ASI-100, un bucle de muestra de 250  $\mu\text{l}$ , se usó un apartado de columna termostaticado TCC 100 junto con un UV/Vis-Detektor UVD170U equipado con un Software Chromeleon Chromatography Management System. Se usaron una precolumna CC 8/4 Nucleosil 120-5 C4, Macherey-Nagel, N° de Cat. 721889, y una columna de separación 40 C-4 Nucleosil MPN, columna RP de 5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm (Macherey-Nagel, N° de orden 7200 45.40). El disolvente A fue  $\text{H}_2\text{O}$  más 0,06% (v/v) de ácido trifluoroacético y el disolvente B fue acetonitrilo al 90% en  $\text{H}_2\text{O}$ , que contenía 0,06% (v/v) de ácido trifluoroacético; el caudal fue de: 1 ml/min. Se aplicó el siguiente gradiente:

- 40 - 0-5 min: 10% de B
- 17 min: 45% de B
- 45 - 65 min: 100% de B
- 67 min: 100% de B
- 69 min: 10% de B
- 50 - 75 min: 10% de B

La detección UV fue a una longitud de onda de 214, 221, 260 y a 280 nm. Se separaron los péptidos generados por la digestión con Endo-Glu-C (no se muestran los datos).

### 55 5.5(d) Análisis de péptidos proteolíticos por espectrometría de masas mediante desorción-ionización por láser, asistido por una matriz y analizador por tiempo de vuelo (MALDI/TOF/TOF-EM)

Se usó la espectrometría de masas para detectar el extremo N intacto de G-SCF en las diferentes muestras preparadas. Las muestras (3-5  $\mu\text{g}$ ) resultantes de las digestiones con Endoproteinasa Glu-C y las muestras de proteínas carboxamidometiladas se usaron directamente para el análisis de EM (sin el RP-HPLC de la etapa 6.3) y se purificaron usando puntas de pipeta ZipTip que contenían material en fase inversa C18 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el lavado con 0,1% (v/v) de ácido fórmico, se llevó a cabo la elución de los péptidos con 10  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 0,1% (v/v) en acetonitrilo al 60% (v/v).

65 Se analizaron los fragmentos de péptidos proteolíticos (Endo-Glu-C) con un equipo Bruker ULTRAFLEX por tiempo de vuelo (TOF/TOF) en el modo lineal de ión positivo usando una matriz de 22,4 mg de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi cinnámico en 400  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo y 600  $\mu\text{l}$  de ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en  $\text{H}_2\text{O}$ ; se midie-

## ES 2 357 001 T3

ron los (gluco)-péptidos usando una matriz de 19 mg de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnámico en la misma mezcla de disolventes usando el reflectrón para la resolución potenciada. Se mezclaron soluciones de muestras de 1  $\mu$ l y una concentración aproximada de 1-10 pmol· $\mu$ l<sup>-1</sup> con cantidades iguales de la respectiva matriz. Se manchó esta mezcla sobre una diana de acero inoxidable y se secó a temperatura ambiente antes del análisis. Se registraron los espectros en el intervalo de masas de 900-5000 dalton. La siguiente Tabla correlaciona las masas esperadas con los péptidos G-CSF respectivos.

TABLA

*Masas teóricas (monoisotópicas) de los péptidos Endo-Glu-C resultantes de XM02*

Masa (Dalton)	Observada en este estudio	Posición aa	Modificación artif. (s)	Secuencia del péptido
2132,11	+	1-20	Cys_CAM: pos 18 m/z 2189,13	MTPLGPASSLPQSFLKCLE
1512,81	+	21-34	-----	QVRKIQGDGAALQE
1534,74	+	35-47	Cys_CAM: pos 37, 43 m/z 1648,78	KLCATYKLCHPEE
4942,63	-	48-94	Cys_CAM: Pos 65, 75 m/z 5056,68	<b>LVLLGHSLGIPWAPLSSCPS QALQLAGCLSQLHSGFLYQ GLLQALE</b>
502,25	-	95-99	-----	GISPE
2835,37	-	100-124	-----	<b>LGPTLDTLQLDVADFATTIW QQMEE</b>
4026,08	+	125-163	-----	<b>LGMAPALQPTQGAMPAFASA FQRRAGGVLVASHLQSFLE</b>
1438,83	+	164-175	-----	VSYRVLRLHAQP

Se carboxamidometilaron los restos de cisteína; se detectaron los péptidos marcados como fat en el espectro MALDI/TOF del G-CSF sin modificar.

Se detectó el péptido Endo-Glu-C del extremo N (MTPLGPASSLPQSFLKCLE; m/z 2189,1) que comprendía la posición 1-20 de la proteína en los espectros MALDI/TOF-EM de las muestras tras el tratamiento proteolítico de G-CSF con endoproteinasa Glu-C tal como se ha descrito anteriormente.

### 5.6. Resultados

#### 5.6(a) Purificación de G-CSF y de variantes modificadas con HES

Se sometieron A32, A60 y G-CSF sin modificar a purificación usando una columna DEAE-Sefarosa CL-6B tal como se ha descrito con A4.

En el caso de la muestra 0401-15/A33 sin modificar, no se detectó absorción significativa a 280 nm en el flujo pistón y se eluyó la proteína a una concentración de 40-50% de tampón B (NaCl 0,16-0,20 M) en un volumen de 6 ml, con un área de pico específica de 660 mAU x ml x mg<sup>-1</sup> a 280 nm.

Se eluyó la muestra 0401-14/A32 (derivada d3e 0401-15/A33; HESilación con AldehídoHES 10/0,4) en un gran intervalo del gradiente a una concentración de tampón B de 20-80% (NaCl 0,08-0,32 M) en un volumen de 12 ml. Aproximadamente un 90% del área total del pico detectada a 280 nm se encontró en el flujo pistón, que contenía

## ES 2 357 001 T3

aproximadamente un 50% de la proteína total con un peso molecular en apariencia ligeramente mayor cuando se comparó con el de la proteína eluída, tal como se detectó mediante el análisis SDS-PAGE tal como se muestra en la Figura 13 anterior.

5 Se eluyó la muestra 0402-03/A60 (HESilada con HES 10/0,4, tras el procedimiento global del Ejemplo 4.2) en un volumen de 10,5 ml a una concentración similar de 20-80% de tampón B. En este caso, se encontró aproximadamente un 35% del área total del pico detectado a 280 nm en el flujo pistón, sin embargo, mediante el análisis SDS-PAGE, no se detectó proteína sin unir en esta fracción. Cuando se comparó con el área del pico específico de la muestra 0401-15/A33, el contenido de proteína en el eluato de la muestra 0402-03/A60 fue un 45% mayor que la cantidad de  
10 proteína definida que se aplicó a la columna.

Se calculó la recuperación de proteínas basándose en el área del pico (A280 nm) de las fracciones de elución en comparación con la proteína G-CSF sin modificar.

15

TABLA 1

*Comparación de las áreas de pico a una detección a 280 nm*

20

Nº de ensayo DEAE-Sefarosa	Descripción	Cantidad calculada de proteína para la inyección	Área del eluato [280 nm] (mAU x ml)	Rendimiento del eluato en comparación con el eluato del ensayo DS01 A33 **
DS01 <b>A33</b>	G-CSF	0,5 mg	330	(0,50 mg)
DS03 <b>A32</b>	Hesilada HES 10/0,4	4,0 mg	1560	2,36 mg
DS04 <b>A60</b>	Hesilada HES 10/0,4	0,9 mg	870	1,32 mg
** La cuantificación mediante RP-HPLC confirmó estos resultados				

35

### 40 5.6(b) Análisis de proteínas mediante cartografiado de péptidos y EM MALDI/TOF tras tratamiento con endoproteinasa Glu-C

El péptido del extremo N resultante de la digestión con endoproteinasa Glu-C del G-CSF carboxamidometilado sin modificar (Figura 14) y el producto comercial Neupogen (no se muestran los datos), se detectó claramente mediante MALDI/TOF-EM (*MTPLGPASSLPQSFLK*\*LE, m/z 2189,1; cisteína carboxamidometilada). Esta señal estuvo ausente en las muestras sometidas a modificación con HES mediante aminación reductora (Figura 15) y en Neulasta (no se muestran los datos), indicando modificaciones de este péptido. En el caso de G-CSF modificado con HES, en el que se llevó a caso la modificación mediante química de éster activado, se detectó el péptido del extremo N a una intensidad de señal relativa comparable a la del material de partida A32 sin modificar (Figura 16) indicando que se  
50 había conseguido la modificación con HES de estos derivados en diferentes cadenas secundarias de aminoácidos.

La secuenciación del extremo N del G-CSF modificado con HES (muestra A33 del producto comercial Neulasta) desveló un extremo N bloqueado sugiriendo de hecho que el resto metionina del extremo N de este derivado de proteína está modificado por el derivado de HES. Debido a que no se detectó la señal correspondiente al péptido que comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 35-47 (KLCATYKLCHPPEE; se carboxamidometilaron ambos restos de cisteína m/z 1648,78) en la muestra A60, se concluyó que uno o ambos restos de lisina (en la posición 35 y en la posición 41) pueden estar modificados por HES.

### Referencias

60 Guillermina **Forno**, Mariela **Bollati Fogolin**, Marcos **Oggero**, Ricardo **Kratje**, Marina **Etcheverrigaray**, Harald S. **Conradt**, Manfred **Nimtz** (2004) N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line *Eur. J. Biochem.*, 271 (5), 907-919.

65 **Nimtz**, M., **Grabenhorst**, E., **Conradt**, H. S., **Sanz**, L. y **Calvete**, J. J. (1999) Structural characterization of the oligosaccharide chains of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms. *Eur. J. Biochem.* 265, 703-718.

## ES 2 357 001 T3

**Nimtz, M., Martin, W., Wray, V., Klöppel, K.-D., Agustin, J. y Conradt, H. S. (1993)** Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur J. Biochem.* 213, 39-56.

5 **Nimtz, M., Noll G., Pâques, E. y Conradt, H. S. (1990)** Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator variant expressed in recombinant Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett.* 271, 14-18.

**Schröter, S., Derr, P., Conradt, H. S., Nimtz, M., Hale, G. y Kirchhoff, C. (1999)** Male-specific modification of human CD52. *J. Biol. Chem.* 274, 29862-29873.

10 **E. Grabenhorst y H. S. Conradt (1999)** The Cytoplasmic, Transmembrane and the Stem Regions of Glycosyltransferases specify their *in vivo* functional sublocalization and stability in the Golgi *J. Biol. Chem.*, 274, 36107-36116.

15 **E. Grabenhorst, A. Hoffmann, M. Nimtz, G. Zettlmeißl y H. S. Conradt (1995)** Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R 2,6-sialyltransferase: 2,6-linked NeuAc is preferably attached to the Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\beta$ 1-3-branch of biantennary oligosaccharides from secreted recombinant -trace protein. *Eur. J. Biochem.*, 232, 718-725.

### 20 Ejemplo 6

*Resultados in vitro del conjugado de G-CSF obtenido en los Ejemplos 2.5 y 4.2 y purificado de acuerdo con el Ejemplo 5. Mitogenicidad de las variantes de G-CSF para células NFS-60 de ratón*

25 Se conoce G-CSF por sus efectos específicos sobre la proliferación, diferenciación, y activación de las células hematopoyéticas del linaje de granulocitos neutrófilos. Se ensayó la capacidad mitogénica de las variantes de G-CSF usando células NFS-60 de ratón (N. Shirafuji y col., Exp. Hematol. 1989, 17, 116-119). Las células crecieron en medio RPMI con suero de ternera fetal al 10% (Gibco INVITROGEN GmbH, Karlsruhe, D) que contenía medio acondicionado WEHI-3B al 5-10% (DSMZ, Braunschweig, D; cultivado tal como se describe por el DSMZ) como  
30 fuente de IL-3 exógena, se cosecharon mediante centrifugación, se lavaron y se distribuyeron en alícuotas a 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Se dejaron adaptar las células durante 1 hora a 37°C en medio RPMI sin medios acondicionados WEHI-3B antes de que se añadieran las muestras de factores de crecimiento de G-CSF en los mismos medios. Se expusieron las células NFS-60 a las variantes de G-CSF purificadas durante 3 días a 37°C y a continuación se contaron las células electrónicamente (Contador Celular Casy TT, Schärfe System, Reutlingen, D).  
35 En la Figura 12 se resumieron los resultados. Como se observa en la Figura 12, las variantes de G-CSF diferentes (0,5-50 pg/ml) fueron capaces de estimular un aumento en el número de células después de 3 días en comparación que el medio que no contenía factores de crecimiento añadidos.

40 Las proteínas G-CSF/A33 y G-CSF/A58 no modificadas del control estimularon las células en una extensión muy similar (DE50 = 5-10 pg/ml) mientras que los conjugados G-CSF/A60 G-CSF/A32 y G-CSF/A57 de G-CSF mostraron únicamente una menor disminución en la actividad si se comparaban con la versión sin modificar (DE50 = 10 25 pg/ml).

(véase la Figura 8).

45

### Ejemplo 7

*Síntesis de conjugados de G-CSF*

50

Ejemplo 7.1

*Síntesis de los derivados de Aldehído-HES*

55

Ejemplo 7.1 (a)

*Síntesis de AminoHES10/0,4*

60 Se calentaron 5,12 g de oxo HES10/0,4 (MW = 10000 D, DS = 0,4, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1) durante la noche a 80°C a vacío y se disolvieron en atmósfera de nitrógeno en 25 ml de dimetil sulfóxido seco (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron 5,13 ml de 1,4-diaminobutano. Tras agitar a 40°C durante 17 h, se añadió la mezcla de reacción a 150 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se lavó con 40 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo y se recogió  
65 mediante centrifugación. Se disolvió el producto bruto en 80 ml de agua, se dializó durante 4 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 67%.

## ES 2 357 001 T3

### Ejemplo 7.1 (b)

#### *Síntesis de AldehídoHES 10/0,4*

5 Se disolvieron 105 mg de ácido 4-formilbenzoico y 135 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 7 ml de N,N-dimetilformamida (calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 135  $\mu$ l de N,N'-diisopropilcarbodiimida (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadieron 0,7 g de aminoHES 10/0,4 (sintetizado tal como se ha descrito en 1.1). Tras agitar durante 18 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 42 ml de una mezcla  
10 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en 5 ml de DMF y se precipitó con 42 ml de etanol/acetona tal como se ha descrito anteriormente. Tras la centrifugación, se disolvió el precipitado recogido con agua, se dializó durante 1 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 95%.

15

### Ejemplo 7.1 (c)

#### *Síntesis de AminoHES10/0,7*

20 Se disolvieron 6,02 de oxo-HES 10/0,7 (MW = 10000 D, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D, de acuerdo con el documento DE 196 28 705) en atmósfera de nitrógeno en 32 ml de dimetil sulfóxido seco (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron 6,03 ml de 1,4-diaminobutano. Tras agitar a 40°C durante 17 h, se añadió la mezcla de reacción a 150 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se lavó con 40 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo y se recogió mediante centrifugación. Se disolvió el producto bruto en 80 ml  
25 de agua durante 4 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 52%.

30

### Ejemplo 7.1 (d)

#### *Síntesis de AldehídoHES10/0,7*

35 Se disolvieron 150 mg de ácido 4-formilbenzoico y 230 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 10 ml de N,N-dimetilformamida (calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 204  $\mu$ l de N,N'-diisopropilcarbodiimida (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadió 1 g de aminoHES10/0,7 (sintetizado tal como se ha descrito en 1.3). Tras agitar durante 19 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 84 ml de 2-propanol enfriado en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en 50 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 83%.

40

### Ejemplo 7.1 (e)

#### *Síntesis de AminoHES30/0,4*

45

Se calentaron 5 g de oxo-HES 30/0,4 (MW = 30000 D, DS = 0,4, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D, Usando relaciones molares de los ingredientes de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1) durante la noche a 80°C a vacío y a continuación se disolvieron en atmósfera de nitrógeno en 28 ml de dimetil sulfóxido seco (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron 1,67 ml de 1,4-diaminobutano. Tras agitar a  
50 40°C durante 17 h, se añadió la mezcla de reacción a 175 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C. Se disolvió el producto bruto en 40 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. No se determinó el rendimiento del producto aislado.

55

### Ejemplo 7.1 (f)

#### *Síntesis de AldehídoHES30/0,4*

60 Se disolvieron 130 mg de ácido 4-formilbenzoico y 153 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 36 ml de N,N-dimetilformamida (Calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 110  $\mu$ l de N,N'-diisopropilcarbodiimida (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadieron 2,61 g de aminoHES30/0,4 (sintetizado tal como se ha descrito en 1.5). Tras agitar durante 22,5 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación  
65 a 4°C y se lavó con una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Tras centrifugación, se disolvió el precipitado en 30 ml de agua, se dializó durante 1 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 81%.

## ES 2 357 001 T3

### Ejemplo 7.1 (g)

#### *Síntesis de AminoHES30/0,7*

5 Se calentaron 5 g de oxo-HES 30/0,7 (MW = 30000 D, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D, usando relaciones molares del ingrediente de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1) durante la noche a 80°C a vacío y a continuación se disolvieron en atmósfera de nitrógeno en 28 ml de dimetil sulfóxido seco (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron 1,67 ml de 1,4-diaminobutano. Tras agitar a 40°C durante 17 h, se añadió la mezcla de reacción a 175 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en  
10 hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C. Se disolvió el producto bruto en 40 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. No se determinó el rendimiento del producto aislado.

### Ejemplo 7.1 (h)

#### *Síntesis de AldehídoHES30/0,7*

Se disolvieron 122 mg de ácido 4-formilbenzoico y 144 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 34 ml de N,N-dimetilformamida (Calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 103  $\mu$ l de N,N'-diisopropilcarbodiimida (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadieron 2,46 g de aminoHES30/0,7 (sintetizado tal como se ha descrito en 1.7). Tras agitar durante 22,5 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C y se lavó con una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Tras centrifugación, se disolvió el precipitado en 30 ml de agua, se dializó durante 1 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 87%.

### Ejemplo 7.1 (i)

#### *Síntesis de AminoHES50/0,7*

Se calentaron 6,09 g de oxo-HES 50/0,7 (MW = 50000 D, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D, usando relaciones molares de los ingredientes de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1) durante la noche a 80°C a vacío y a continuación se disolvieron en atmósfera de nitrógeno en 32 ml de dimetil sulfóxido seco (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se añadieron 1,22 ml de 1,4-diaminobutano. Tras agitar a 40°C durante 17 h, se añadió la mezcla de reacción a 150 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C. Se lavó con 40 ml de agua de una mezcla 1:1 de acetona y etanol enfriada en hielo, y se recogió mediante centrifugación. Se disolvió el producto bruto en 80 ml de agua, se dializó durante 4 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 82%.

### Ejemplo 7.1 (j)

#### *Síntesis de AldehídoHES50/0,7*

45 Se disolvieron 125 mg de ácido 4-formilbenzoico y 174 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (ambos de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 38 ml de N,N-dimetilformamida (Calidad de síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadieron 155  $\mu$ l de N,N'-diisopropilcarbodiimida (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Tras incubación a 21°C durante 30 min, se añadieron 3,8 g de aminoHES50/0,7 (sintetizado tal como se ha descrito en 1.9). Tras agitar durante 19 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se volvió a disolver en 20 ml de N,N-dimetilformamida y se precipitó con 80 ml de una mezcla 1:1 de acetona y etanol (v/v) enfriada en hielo, tal como se ha descrito anteriormente. Tras centrifugación, se disolvió el precipitado en 50 ml de agua, se dializó durante 2 d frente a agua (tubería de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del 77%.

### Ejemplo 7.2

#### *Síntesis de conjugados de HES-G-CSF mediante aminación reductora*

### Ejemplo 7.2 (a)

#### *Intercambio de tampón A*

Se concentraron 33 ml de una solución de 0,454 mg/ml de hG-CSF (XM02, BioGeneriX AG, Mannheim, D) en acetato de sodio 10 mM, 50 mg/ml de sorbitol y Tween 80 al 0,004% a pH 4,0 mediante diafiltración a 0°C hasta 4 ml con un concentrador Vivaspin 15R (VS15RH11, 5KD MWCO, Vivascience AG, Hannover, D) y se volvieron a diluir hasta 15 ml con un tampón de acetato de sodio 0,1 M a pH 5,0. Se repitió esta diafiltración dos veces. La concentración final en la última etapa de diafiltración fue de 3 mg/ml.

## ES 2 357 001 T3

### Ejemplo 7.2 (b)

#### *Reacción de hG-CSF con derivados de AldehídoHES de los ejemplos 7.1(b), 7.1(d) y 7.1(j)*

5 A 1,67 ml de una solución de hG-GCSF tras intercambio del tampón en tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0 (tal como se ha descrito en 7.2 (a) anterior), se añadieron 1,67 ml de una solución del derivado de HES y 1,67 ml de una solución 60 mM de cianoborohidruro de sodio, ambos en el mismo tampón, y se incubó la solución durante 15,5 h a 4°C. Todas las soluciones se enfriaron a 0°C antes de la mezcla.

10 Se emplearon las siguientes concentraciones finales de HES.

39,4 mg/ml para los derivados de HES preparados de acuerdo con el ejemplo 7.1 (b) y 7.1 (d).

197 mg/ml para el derivado de HES preparado de acuerdo con el ejemplo 7.1 (j).

15 197 mg/ml de HES50/0,7 (MW = 50000 D, DS = 0,7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D) como control de la reacción.

Se analizaron las mezclas de reacción mediante electroforesis en gel (véase la figura 17).

20

### Ejemplo 7.2 (c)

#### *Intercambio de tampón B*

25 Se concentraron 20 ml de una solución de 0,454 mg/ml de hG-CSF (XM02, BioGeneriX AG, Mannheim, D) en acetato de sodio 10 mM, 50 mg/ml de sorbitol y Tween 80 al 0,004% a pH 4,0 mediante diafiltración a 15°C hasta 4 ml con un concentrador Vivaspin 15R (VS15RH11, 5KD MWCO, Vivascience AG, Hannover, D) y se volvieron a diluir hasta 15 ml con un tampón de acetato de sodio 0,1 M a pH 5,0. Se repitió esta diafiltración dos veces. La concentración final en la última etapa de diafiltración fue de 1,5 mg/ml.

30

### Ejemplo 7.2 (d)

#### *Reacción de hG-CSF con derivados de AldehídoHES de los ejemplos 7.1(f) y 7.1(h)*

35 A 3,3 ml de una solución de hG-CSF tras intercambio del tampón en tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0 (tal como se ha descrito en el ejemplo 7.2 (c) anterior), se añadieron 3,3 ml de una solución de 789 mg de derivado de HES y 3,3 ml de una solución 60 mM de cianoborohidruro de sodio, ambos en el mismo tampón, y se incubó la solución durante 30 h a 4°C. Todas las soluciones se enfriaron a 0°C antes de la mezcla.

40 Después de 17 h, se retiraron las muestras para el control de la reacción. Se analizaron las mezclas de reacción mediante electroforesis en gel (véase la figura 18).

### Ejemplo 7.3

45 (No de acuerdo con la invención)

#### *Síntesis de conjugados de HES-GCSF mediante acoplamiento de carbonato de N,N'-succinimidilo*

### Ejemplo 7.3 (a)

50

*Síntesis de conjugados de G-CSF mediante reacción de almidón hidroxietílico que tiene un grupo éster reactivo con G-CSF*

55 Se disolvieron 400 mg de oxo-HES10/0,7 (preparado por Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D; de acuerdo con el documento DE 196 28 705 A1, el grado de oxidación de oxo-HES fue del 95%) en 1 ml de DMF anhidro. A esta solución, se añadieron 21 mg de carbonato de N,N'-disuccinimidilo, y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. La solución resultante tuvo una concentración de HES reactivo de 40 por ciento en peso.

60 Una solución de G-CSF (Strathmann Biotec AG, Hamburgo, D), que tenía una concentración de aproximadamente 0,5 mg de G-CSF/ml, se concentró a una concentración de 10 mg/ml mediante ultracentrifugación a un corte de 100 kD usando una centrifuga con enfriamiento.

65 A 0,5 ml de esta solución concentrada de G-CSF, se añadieron 180 µl de una solución de bicarbonato de sodio posteriormente, se añadieron gota a gota 3 porciones (de 100 µl cada una) de la solución de HES reactivo a la solución de proteína, hasta que después de aproximadamente 30 min., la reacción llegó a la finalización. De esta manera, la relación molar total de HES reactivo:G-CSF fue de aproximadamente 50:1. A continuación, se ajustó el pH de la mezcla a 4,0 usando HCl 0,1 N.

## ES 2 357 001 T3

Un análisis HPGPV (Cromatografía de Permeación en Gel de Alto Rendimiento) proporcionó un rendimiento de más del 95%. No se podía detectar G-CSF sin reaccionar En la Fig. 19 se muestra este resultado.

### Ejemplo 7.4

#### *Ensayo in vitro*

#### *Mitogenicidad de variantes de G-CSF en células NF60 de ratón*

Se conoce G-CSF por sus efectos específicos sobre la proliferación, diferenciación, y activación de las células hematopoyéticas del linaje de granulocitos neutrófilos. Se ensayó la capacidad mitogénica de las variantes de G-CSF usando células NFS-60 de ratón (N. Shirafuji y col., Exp. Hematol. 1989, 17, 116-119). Las células crecieron en medio RPMI con suero de ternera fetal al 10% (Gibco INVITROGEN GmbH, Karlsruhe, D) que contenía medio acondicionado WEHI-3B al 5-10% (DSMZ, Braunschweig, D; cultivado tal como se describe por el DSMZ) como fuente de IL-3 exógena, se cosecharon mediante centrifugación, se lavaron y se distribuyeron en alícuotas a 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Se dejaron adaptar las células durante 1 hora a 37°C en medio RPMI sin medios acondicionados WEHI-3B antes de que se añadieran las muestras de factores de crecimiento de G-CSF diluidas en los mismos medios. Se expusieron las células NFS-60 a las variantes de G-CSF purificadas (purificación de acuerdo con los ejemplos 5.3, 5.4, cuantificación de la proteína de acuerdo con el ejemplo 5.5 (a)):

Neupogen®, Neulasta® ambos de Amgen,

“Conjugado de HES-GCFS 10/0,4” preparado en el ejemplo 7.2 (b),

“Conjugado de HES-GCFS 10/0,7” preparado en el ejemplo 7.2 (b),

“Conjugado de HES-GCFS 30/0,4” preparado en el ejemplo 7.2 (d),

“Conjugado de HES-GCFS 30/0,7” preparado en el ejemplo 7.2 (d),

“Conjugado de HES-GCFS 50/0,7” preparado en el ejemplo 7.2 (b),

“Conjugado de HES-GCFS 10/0,7 (Supramol)” preparado de acuerdo con el ejemplo 7.3 (a),

“Incubación simulada”(= control de la reacción, 197 mg/ml de HES50/0,7, MW 50000D, DS 7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach Rodheim, Alemania),

durante 3 días a 37°C y se contaron las células electrónicamente (Contador Celular Casy TT, Schärfe System, Reutlingen, D). Los resultados se resumieron en la Tabla 2 y en la Figura 20. En todos los casos, las cantidades de proteína proporcionadas en la Tabla 2 y en la Figura 20 representan el contenido de G-CSF únicamente de los conjugados y se basan en las concentraciones determinadas por GlucoThera. Como se puede observar en la Figura 20, todas las diferentes variantes de G-CSF (2,5-250 pg/ml) fueron capaces de estimular un aumento en el número de células después de 3 días en comparación con un medio que no contenía factores de crecimiento añadidos. Todas las variantes alcanzaron el máximo nivel de estimulación a una concentración de 250 pg/ml.

(Tabla pasa a página siguiente)



Tabla 2: Proliferación de células NFS-60 de ratón, inducida por variantes de G-CSF

Concentración [pg/ml]	0	2,5	2,8	5	5,7	10	11,3	25	28,4	50	56,7	250	283,5
<b>Neupogen</b>	0,44	0,86		1,20		1,69		2,33		2,49		2,41	
HES-GCSF 10/0,7	0,44	0,72		0,93		1,44		2,14		2,41		2,41	
HES-GCSF 10/0,4	0,44	0,72		0,97		1,40		2,17		2,67		2,75	
HES-GCSF 50/0,7	0,44	0,62		0,70		0,97		1,68		2,15		2,32	
Incubación simulada	0,44	0,85		1,31		1,91		2,38		2,47		2,41	
HES-GCSF 30/0,4	0,44	0,82		1,21		1,62		2,28		2,50		2,60	
HES-GCSF 30/0,7	0,44	0,80		1,09		1,66		2,20		2,35		2,44	
Neulasta	0,44	0,63		0,80		1,12		1,83		2,25		2,33	
HES-GCSF 10/0,7 (Supramol)	0,44		0,73		1,13		1,58		2,24		2,48		2,46

## ES 2 357 001 T3

### Ejemplo 7.5

#### *Efectos biológicos in vivo de conjugados de hG-CSF en ratas*

5 Tras su llegada, las ratas [ratas macho CRL:CD® (7 semanas de edad), Charles River Deutschland GmbH, Sanghofer Weg 7, D-97633 Sulzfeld)] se clasificaron aleatoriamente en grupos de 5. Después de 7 días de aclimatación, se excluyeron las ratas en mal estado y se sustituyeron por animales de reserva. El peso de las ratas tras la llegada fue de 181-203 g.

10 Se administraron a cada grupo de cinco ratas seleccionadas aleatoriamente 100 µg de proteínas por kg de peso corporal (velocidad de inyección 15 s/dosis, vehículo: 5 ml de PBS/kg de peso corporal de las siguientes muestras de G-CSF no conjugado o conjugado (purificadas de acuerdo con los ejemplos 5.3, 5.4, cuantificación de proteínas de acuerdo con el ejemplo 5.5 (a)):

15 Neupogen®, Neulasta® ambos de Amgen,

“Conjugado de HES-GCFS10/0,4” (10/0,4) preparado en el ejemplo 7.2 (b),

20 “Conjugado de HES-GCFS10/0,7” (10/0,7) preparado en el ejemplo 7.2 (b),

“Conjugado de HES-GCFS20/0,4” (30/0,4) preparado en el ejemplo 7.2 (d),

“Conjugado de HES-GCFS30/0,7” (30/0,7) preparado en el ejemplo 7.2 (d),

25 “Conjugado de HES-GCFS50/0,7” (50/0,7) preparado en el ejemplo 7.2 (b),

“HES-GCFS 10/0,7 Supramol” (S 10/0,7) preparado de acuerdo con el ejemplo 7.3 (a),

30 “Incubación simulada”(= control de la reacción, 197 mg/ml de HES50/0,7, MW 50000D, DS 7, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach Rodheim, Alemania) y

un vehículo control.

35 Se extrajeron muestras de sangre de todos los animales de aproximadamente 200 µl de EDTA de sangre completa procedentes del plexo venoso retrobulbar bajo ligera sedación con éter. En el día de ensayo -5 se extrajo sangre una vez por la mañana de todos los animales tras ayuno durante la noche. En los días de ensayo 1 a 8 se extrajo sangre dos veces diariamente a un intervalo de 12 horas. La primera muestra de sangre en el día 1 se extrajo antes de la administración del conjugado de G-CSF/GCSF.

40 Se llevaron a cabo los recuentos de glóbulos blancos (WBC) usando un Bayer ADVIA™ 120 (Fernwald, Alemania). En la figura 21 se muestran los resultados.

45

50

55

60

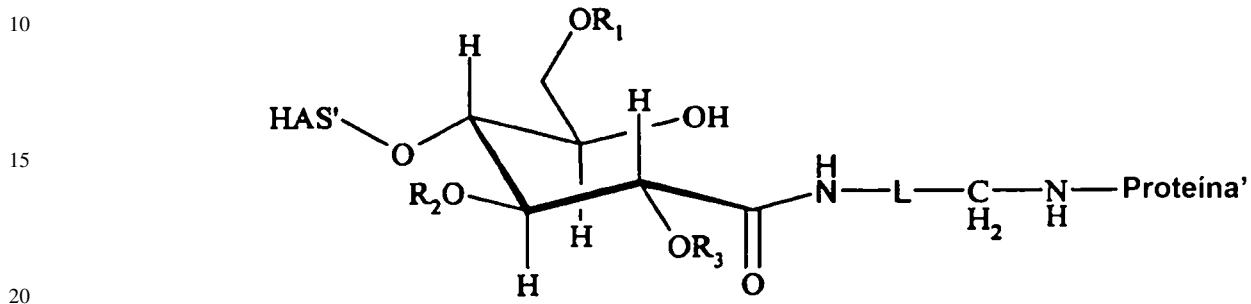
65

## REIVINDICACIONES

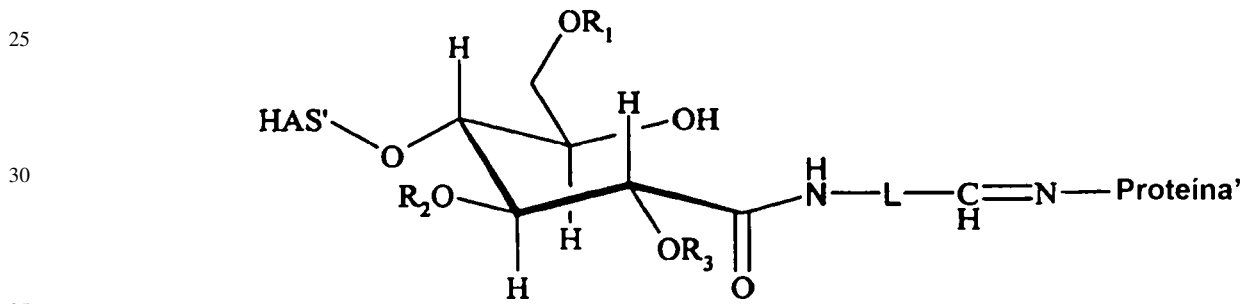
1. Un procedimiento para preparar un conjugado que comprende una proteína y un derivado polimérico, en el que el polímero es un almidón hidroxietílico (HAS) y la proteína es un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar al menos un grupo A funcional del derivado polimérico con al menos un grupo Z funcional de la proteína y formar de dicha forma un enlace covalente, en el que Z es un grupo amino, y en el que A se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal, en el que el procedimiento comprende además introducir A en el polímero para dar un derivado polimérico haciendo reaccionar el polímero con un al menos compuesto bifuncional, un grupo funcional que se hace reaccionar con el polímero y al menos otro grupo funcional que es un grupo aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal, o es un grupo funcional que está químicamente modificado de manera adicional para dar un grupo aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal, y en el que la reacción del derivado polimérico con la proteína es una aminación reductora.
2. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 1 en el que el almidón hidroxialquílico es almidón hidroxietílico.
3. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 2 en el que el almidón hidroxietílico tiene un peso molecular de entre 2 a 200 kD, preferiblemente de entre 4 a 130 kD, más preferiblemente de entre 4 a 70 kD.
4. El procedimiento que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar adicionalmente el polímero con un grupo M funcional de un al menos compuesto bifuncional para dar un derivado polimérico, el al menos compuesto bifuncional que comprende además al menos otro grupo Q funcional que es el grupo aldehído, el grupo ceto o el grupo A hemiacetal.
5. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 4, en el que M comprende un grupo amino.
6. El procedimiento que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar adicionalmente el polímero con un grupo M funcional de un al menos compuesto bifuncional para dar un derivado polimérico, el al menos compuesto bifuncional comprende además al menos otro grupo Q funcional que no es un grupo aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar adicionalmente el grupo Q funcional con al menos un compuesto adecuado para dar el derivado polimérico que comprende el grupo aldehído, el grupo ceto o el grupo A hemiacetal.
7. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 5, en que M y Q comprenden un grupo amino.
8. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 6 o 7, en el que al menos un compuesto adecuado comprende un grupo carboxilo y un grupo aldehído, un grupo ceto o un grupo hemiacetal.
9. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 8, en el que al menos un compuesto adecuado es ácido formilbenzoico o ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi)butírico.
10. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 6 o 7, en el que M comprende un grupo amino y Q comprende un grupo beta hidroxil amino.
11. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 10, en el que se hace reaccionar el polímero en su extremo reductor oxidado con un grupo M funcional de un al menos compuesto bifuncional.
12. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 10, que comprende oxidar adicionalmente el grupo beta hidroxil amino para dar el grupo aldehído.
13. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 12, en el que se lleva a cabo la reacción de oxidación usando un periodato.
14. El procedimiento que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que se lleva a cabo la aminación reductora en presencia de  $\text{NaCNBH}_3$ .
15. El procedimiento que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que se lleva a cabo la aminación reductora a un pH de 7 o inferior.
16. El procedimiento que se reivindica en la reivindicación 15, en el que el pH es 6 o inferior.
17. El procedimiento que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que se lleva a cabo la aminación reductora a una temperatura de entre 0 a 25°C.
18. El procedimiento que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que se lleva a cabo la aminación reductora en un medio acuoso.

19. Un conjugado que es obtenible mediante un procedimiento que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

20. Un conjugado que comprende una proteína y un polímero o derivado del mismo, en el que el polímero es un almidón hidroxietílico (HAS) y la proteína es un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula



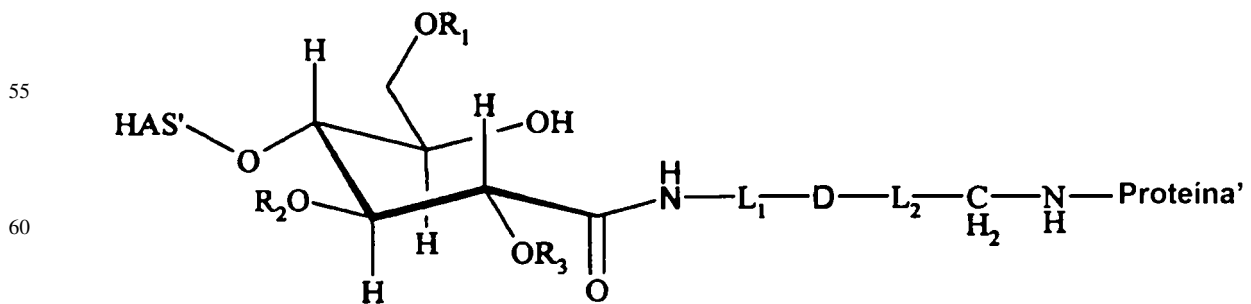
y/o



40 en las que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, un grupo hidroxiarilo, un grupo hidroxialarquilo o un grupo hidroxialcarilo que tiene de entre 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, más preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxietilo, y

45 en las que L es un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico opcionalmente sustituido, que comprende opcionalmente al menos un heteroátomo, que tiene entre 1 a 60, preferiblemente entre 1 a 40, más preferiblemente entre 1 a 20, más preferiblemente entre 1 a 10, más preferiblemente entre 1 a 6, más preferiblemente entre 1 a 2 átomos de carbono, y de manera especialmente preferible 1 átomo de carbono, siendo L en particular  $CH_2$ .

50 21. Un conjugado que comprende una proteína y un polímero o un derivado del mismo, en el que el polímero es un almidón hidroxietílico (HAS) y la proteína es un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula



en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, un grupo hidroxiarilo, un grupo hidroxialarquilo o un grupo hidroxialcarilo que tiene de entre 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, más preferiblemente hidrógeno o un grupo hidroxietilo, y

## ES 2 357 001 T3

en la que  $L_1$  y  $L_2$  son independientemente un resto hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico opcionalmente sustituido, que comprende opcionalmente al menos un heteroátomo, que comprende un resto alquilo, arilo, aralquil heteroalquilo, y/o heteroaralquilo, teniendo dicho resto entre 1 a 60, preferiblemente entre 1 a 40, más preferiblemente entre 1 a 20, más preferiblemente entre 1 a 10 átomos de carbono, y

5

en la que D es un enlace, preferiblemente un enlace covalente que se formó mediante un grupo  $F_2$  funcional adecuado unido a  $L_1$  y un grupo  $F_3$  funcional adecuado unido a  $L_2$ .

10 22. El conjugado que se reivindica en la reivindicación 21, en el que  $L_1$  es  $-(CH_2)_n-$  con  $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ , preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, más preferiblemente 2, 3, 4, y de manera especialmente preferible 4.

15 23. El conjugado que se reivindica en la reivindicación 21 o 22 en el que  $L_2$  comprende un resto arilo sustituido opcionalmente de manera adecuada, preferiblemente un resto arilo que contiene 6 átomos de carbono, siendo  $L_2$  de manera especialmente preferible  $C_6H_4$ .

24. El conjugado que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que  $F_2$  se selecciona entre el grupo que consiste en

20

- dobles enlaces C-C o triples enlaces C-C o enlaces C-C aromáticos;

- el grupo tio o los grupos hidroxilo;

25

- hidrazida del ácido alquil sulfónico, hidrazida del ácido aril sulfónico;

- 1,2-dioles;

- 1,2-aminoalcoholes;

30

- 1,2 amino-tioalcoholes;

- azidas;

35

- el grupo amino  $-NH_2$  o derivados de los grupos amino que comprenden la unidad de estructura  $-NH-$  tales como grupos aminoalquílicos, grupos aminoarilo, grupos aminoaralquilo, o grupos alcarilamino;

- el grupo hidroxilamino  $-O-NH_2-$ , o derivados del grupo hidroxilamino que comprende la unidad de estructura  $-O-NH-$ , tales como grupos hidroxilalquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino, o grupos hidroxilalcarilamino;

40

- grupos alcoxiamino, grupos ariloxiamino, grupos aralquioxiamino, o grupos alcariloxiamino, comprendiendo cada uno la unidad de estructura  $NH-O-$ ;

- restos que tienen un grupo carbonilo,  $Q-C(=G)-M$  en el que G es O u S, y M es, por ejemplo,

45

--  $-OH$  o  $-SH$ ;

-- un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo aralquioxilo, o un grupo alcariloxilo;

50

-- un grupo alquiltio, un grupo ariltio, un grupo aralquiltio, o un grupo alcariltio;

-- un grupo alquilcarboniloxilo, un grupo arilcarboniloxilo, un grupo aralquilcarboniloxilo, un grupo alcarilcarboniloxilo;

55

-- ésteres activados tales como ésteres de hidroxilaminas que tienen estructura de imida tales como N-hidroxisuccinimida o que tienen una unidad de estructura  $O-N$  en la que N es parte de un compuesto heteroarilo o, con  $G = O$  y Q ausente, tales como compuestos de ariloxilo con un resto arilo sustituido tales como pentafluorofenilo, paranitrofenilo o triclorofenilo;

60

en el que Q está ausente o es NH o un heteroátomo tal como S u O;

-  $-NH-NH_2$ , o  $-NH-NH-$ ;

-  $-NO_2$ ;

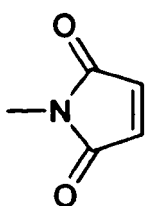
65

- el grupo nitrilo

- grupos carbonilo tales como el grupo aldehído o el grupo ceto;

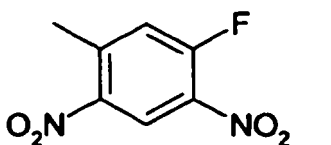
## ES 2 357 001 T3

- el grupo carboxilo;
- el grupo  $-N=C=O$  o el grupo  $-N=C=S$ ;
- 5 - grupos de haluro de vinilo tales como el grupo yoduro de vinilo o el bromuro de vinilo o triflato;
- $-C=C-H$ ;
- $-(C=NH_2Cl)-OAlquilo$
- 10 - Grupos  $-(C=O)-CH_2-Hal$  en el que Hal es Cl, Br, o I;
- $-CH=CH-SO_2-$ ;
- 15 - un grupo disulfuro que comprende la estructura  $-S-S-$ ;
- el grupo



;

- el grupo



40 y en la que F<sub>3</sub> es un grupo funcional capaz de formar un enlace químico con F<sub>2</sub> y se selecciona preferiblemente entre el grupo anteriormente mencionado, comprendiendo F<sub>2</sub> preferiblemente el resto  $-NH-$ , que comprende más preferiblemente un grupo amino, comprendiendo F<sub>3</sub> preferiblemente el resto  $-(C=G)-$ , más preferiblemente  $-(C=O)-$ , más preferiblemente el resto  $-(C=G)-G-$ , aún más preferiblemente  $-(C=O)-G-$ , y de manera especialmente preferible  $-(C=O)-O$ , siendo D de manera particularmente preferible un enlace amida.

45

25. El conjugado que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en el que el almidón hidroxialquílico es almidón hidroxietílico.

50 26. El conjugado que se reivindica en la reivindicación 25 en el que el almidón hidroxietílico tiene un peso molecular de entre 2 a 200 kD, preferiblemente de entre 4 a 130 kD, más preferiblemente de entre 4 a 70 kD.

27. Un conjugado que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, para uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal.

55

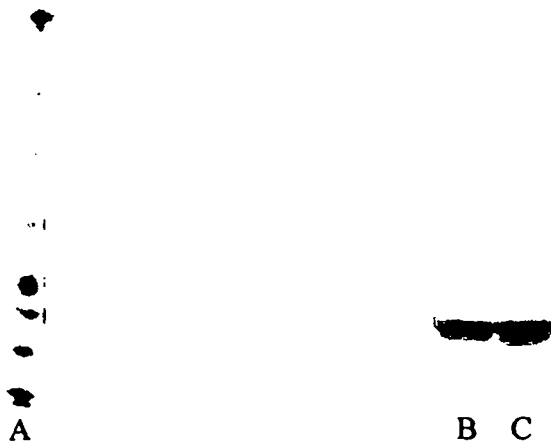
28. Una composición farmacéutica que comprende en una cantidad terapéuticamente eficaz un conjugado que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26.

60 29. Una composición farmacéutica que se reivindica en la reivindicación 28, que comprende además al menos un diluyente, potenciador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

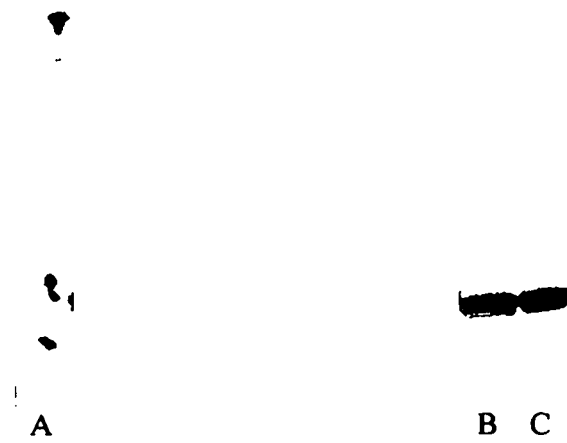
30. Un conjugado que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26 para uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno **caracterizado** por una función hematopoyética o inmune reducida.

65 31. El conjugado que se reivindica en la reivindicación 30, en el que el trastorno es un resultado de quimioterapia, terapia de radiación, enfermedad infecciosa, neutropenia crónica grave, o leucemia.

**Fig. 1a**

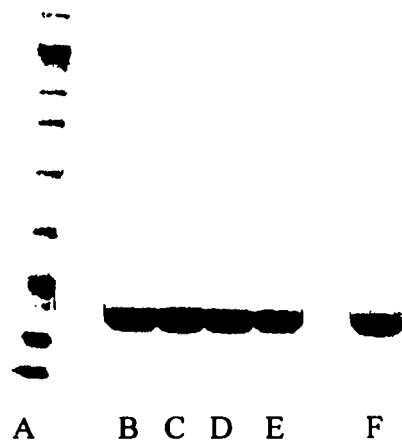


**Fig. 1b**





**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

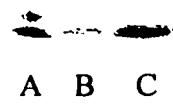


**Fig. 5**



**Fig. 6**

(←)



**Fig. 7**

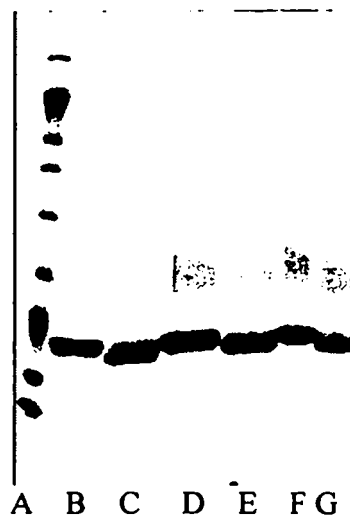


Fig. 8

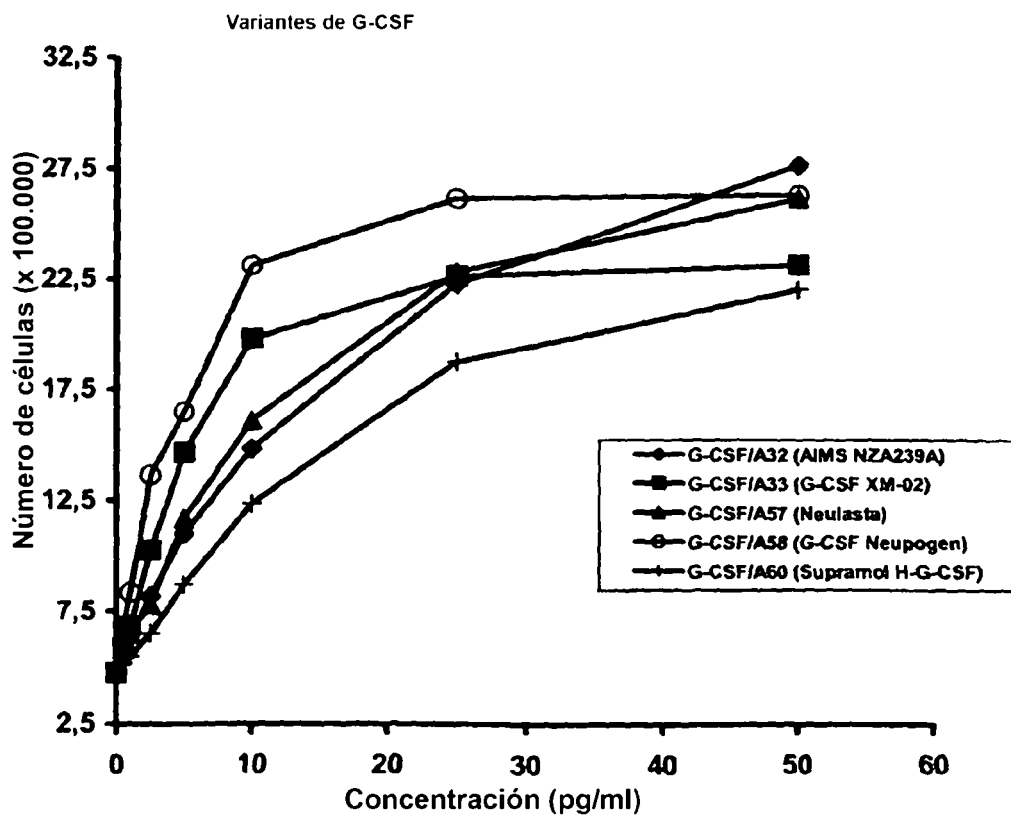
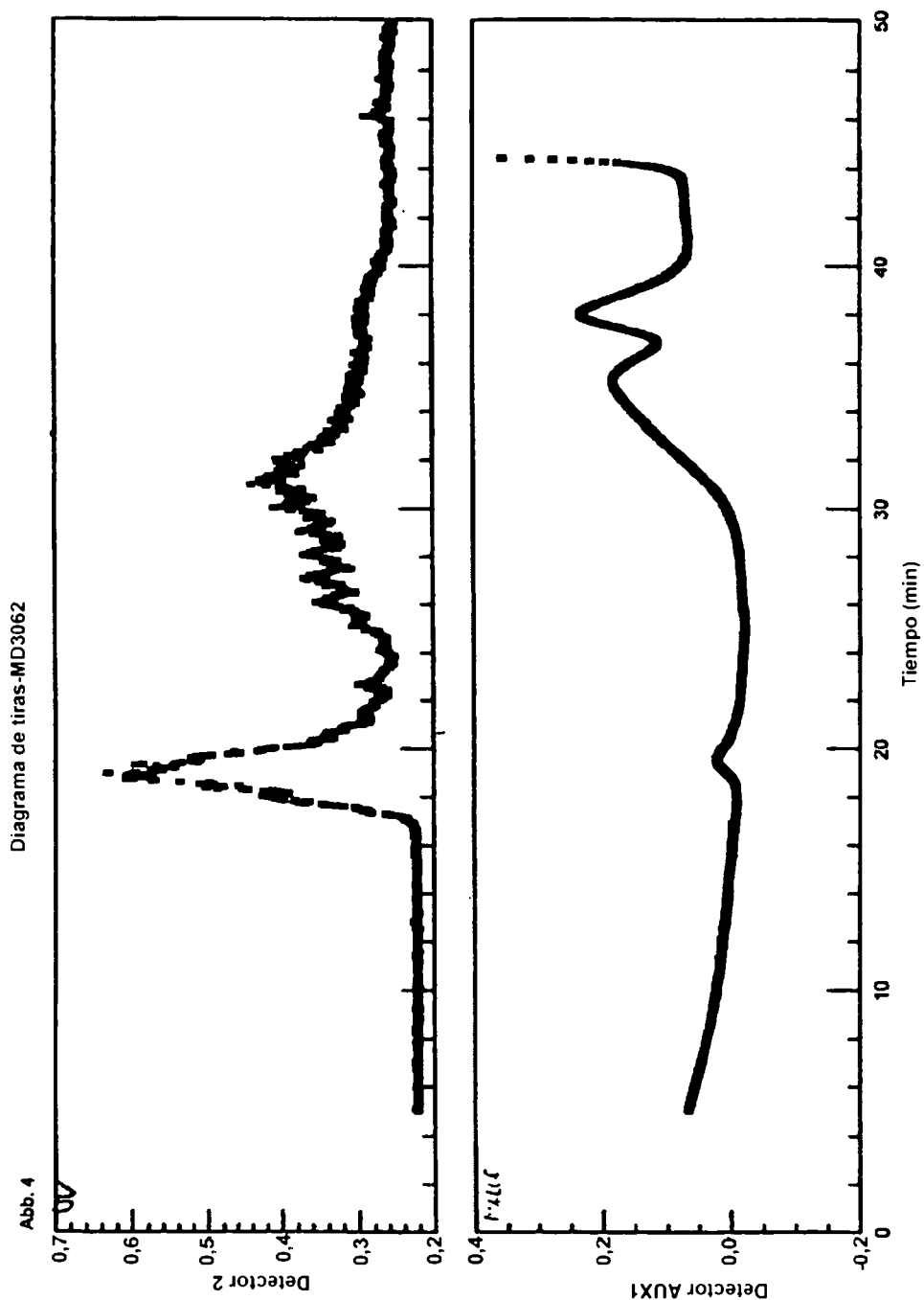


Fig. 9

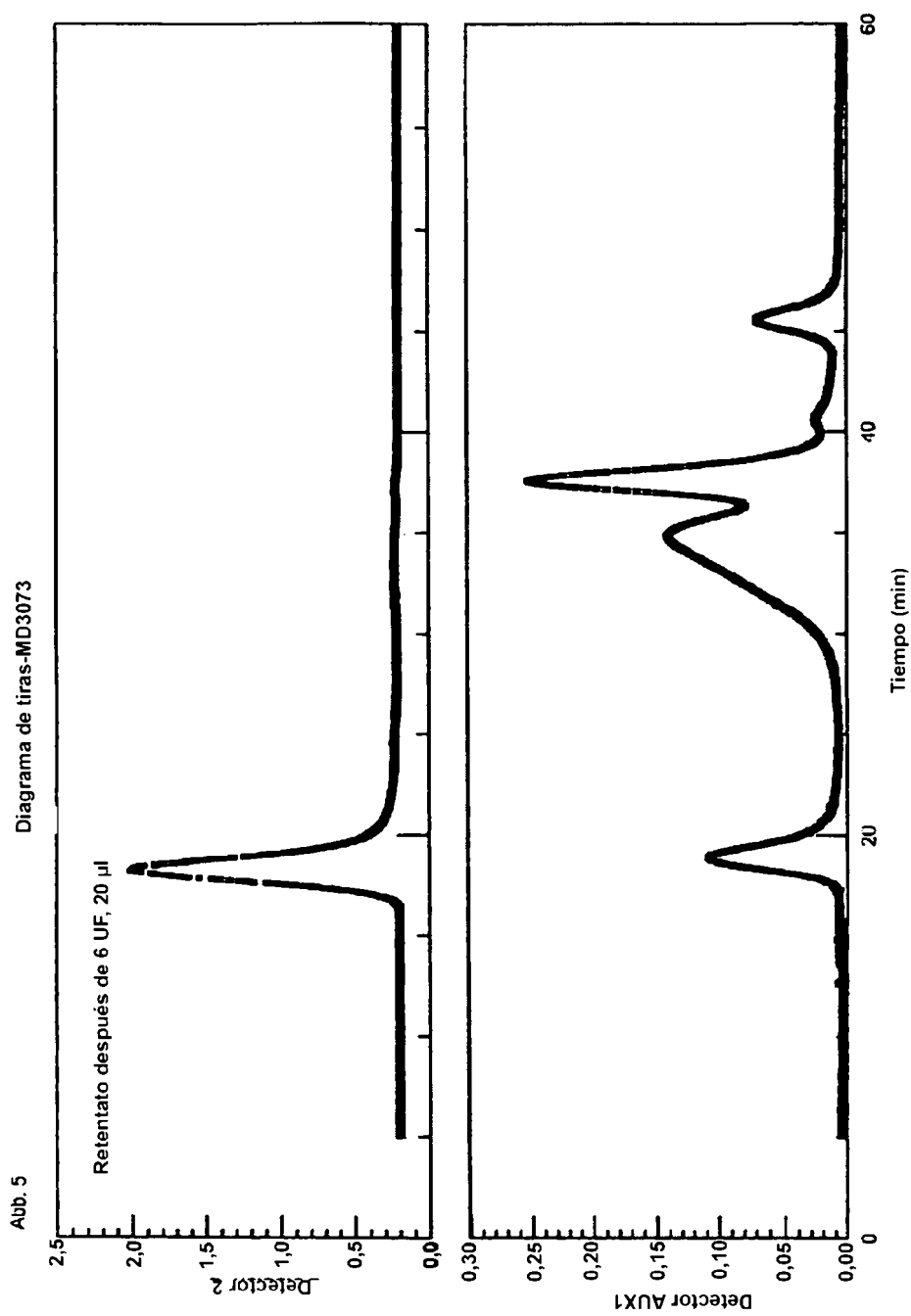


Thu Dec 04, 2003 08:25 AM

C:\WPC\ASTRA\450\MD3062.MDF  
servo for Windows 4.50 Beta 18



Fig. 10



G-CSF + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Retentato después de 6. Ultrafiltración, 20 µl (gcuantvol circa 500 µl)  
C:\MTCU\ASTRA\450\MD3073.MDF

Sat. Dec 13, 2003 02:35 PM

Fig. 11

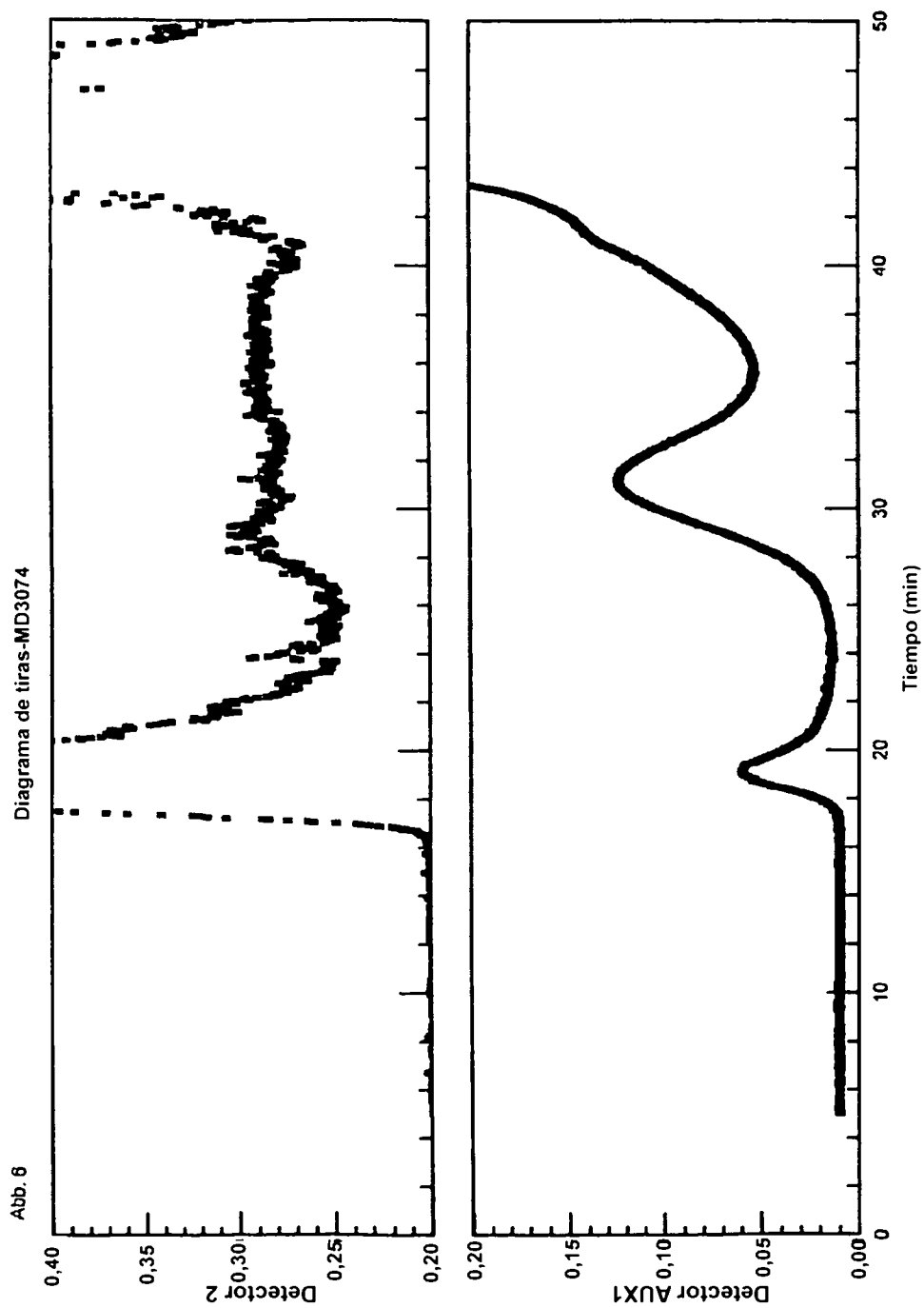
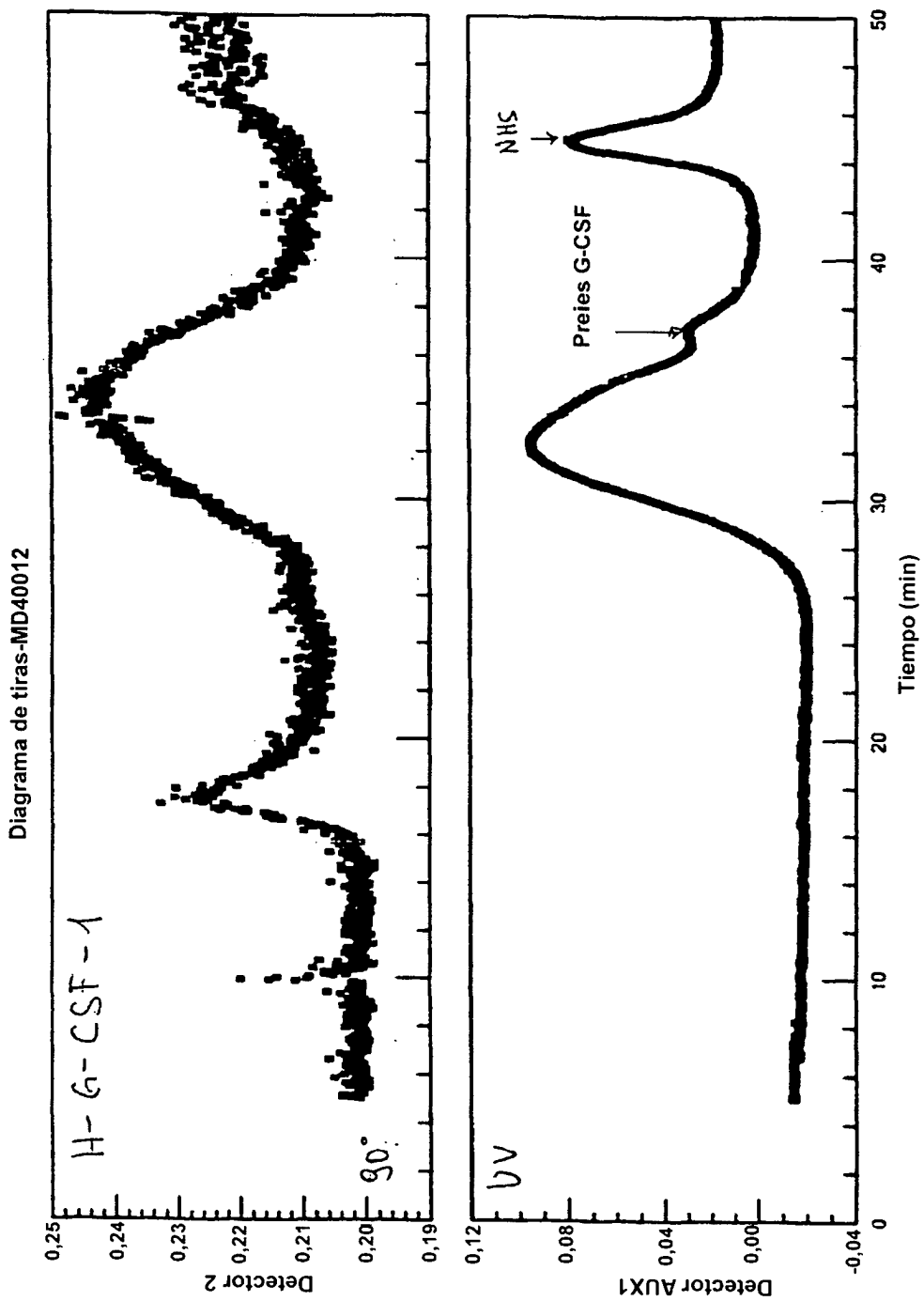
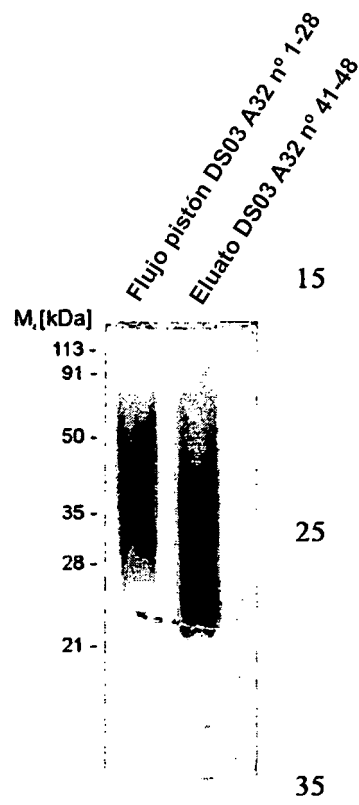


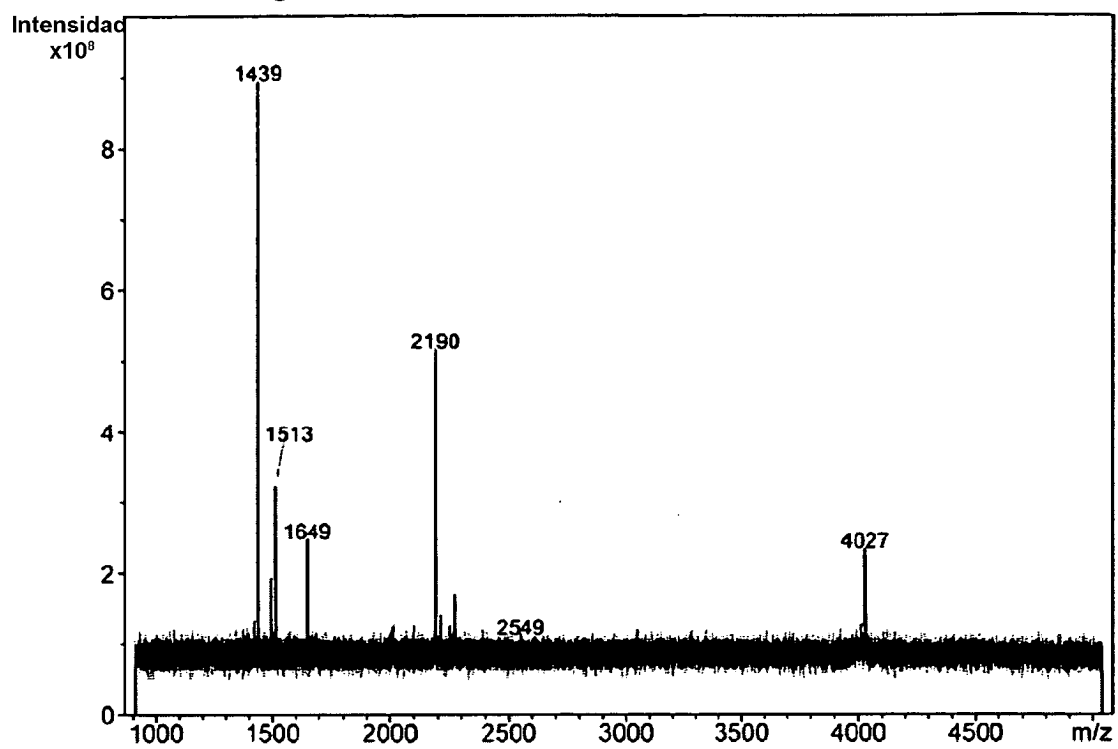
Fig. 12



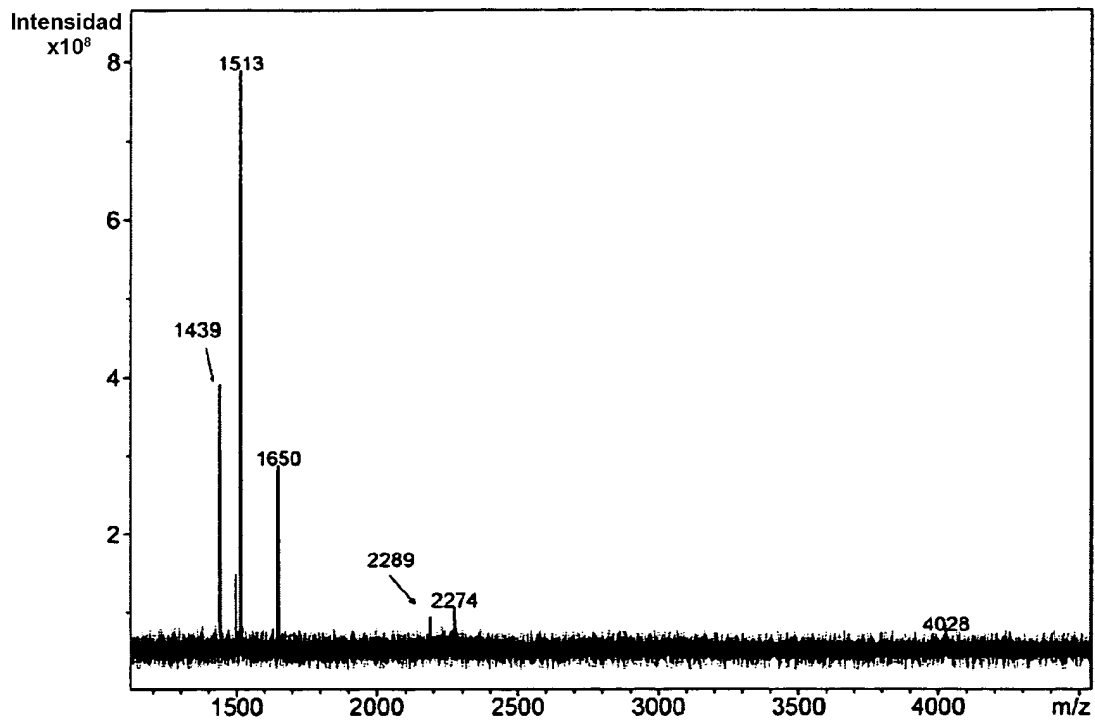
**Fig. 13**



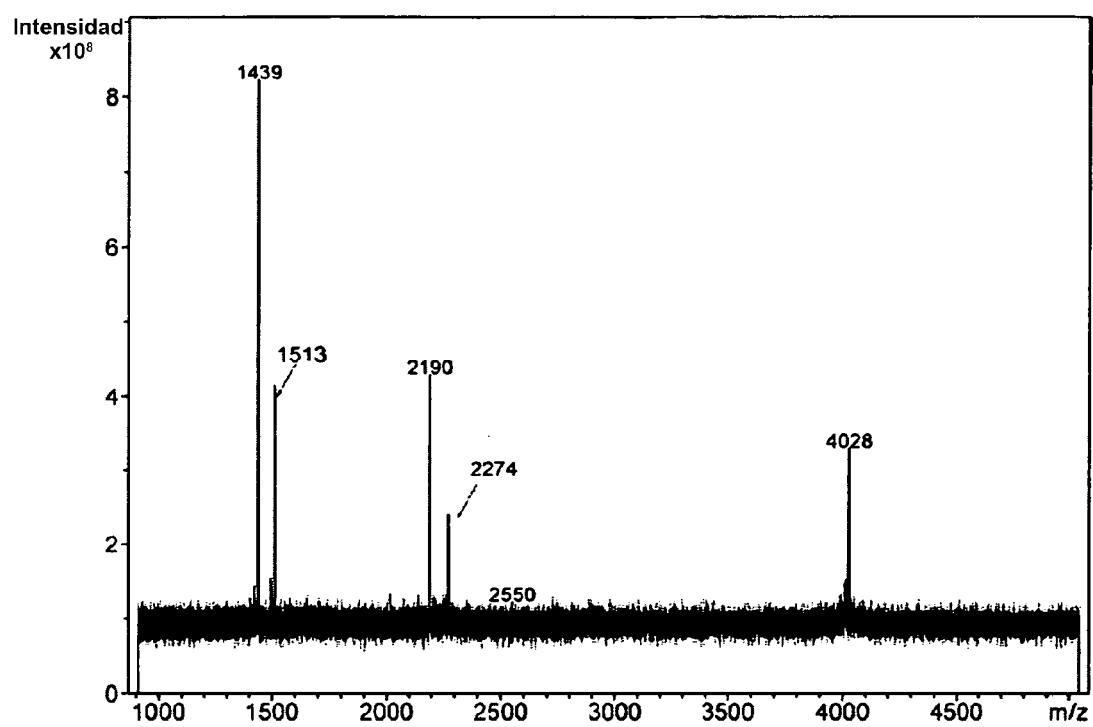
**Fig. 14**



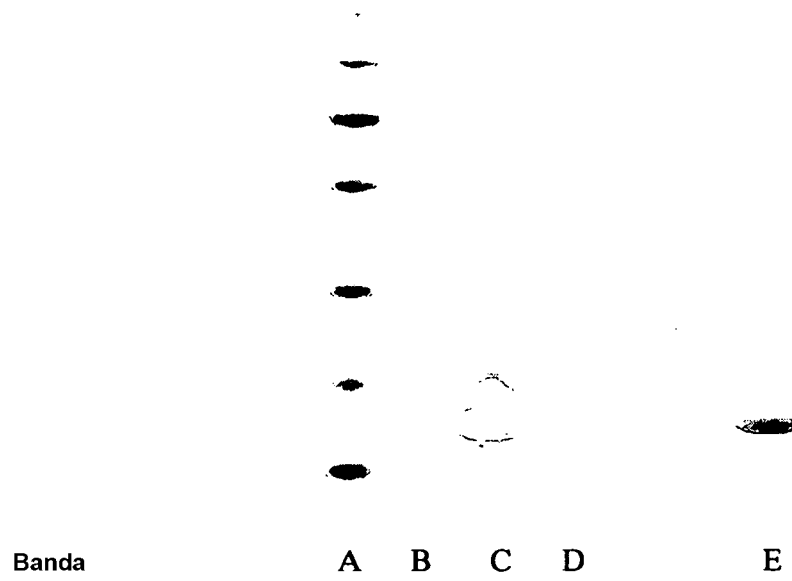
**Fig. 15**



**Fig. 16**



**Fig. 17**





**Fig. 18**

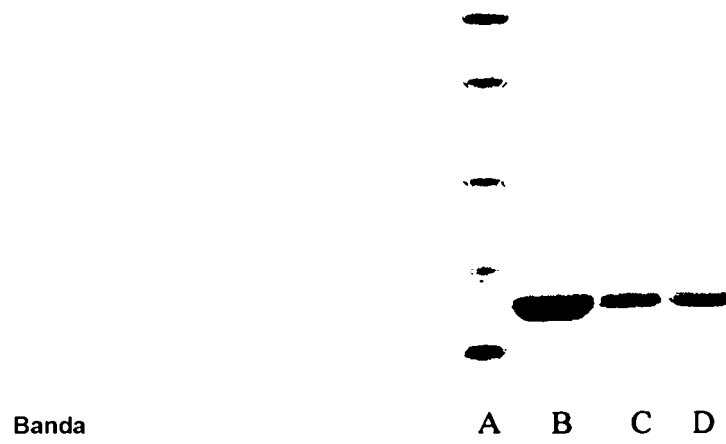


Fig. 19

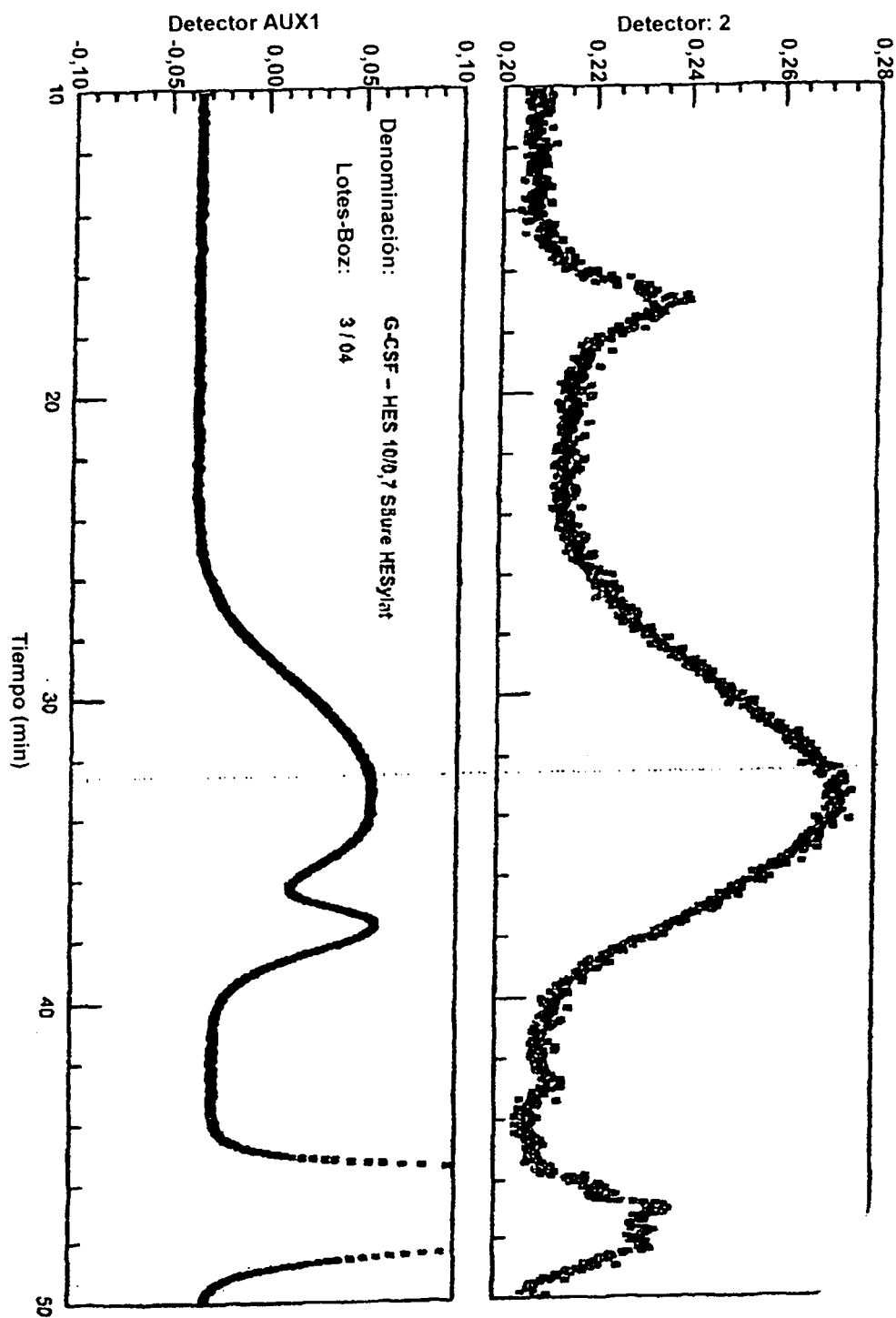


Fig. 20

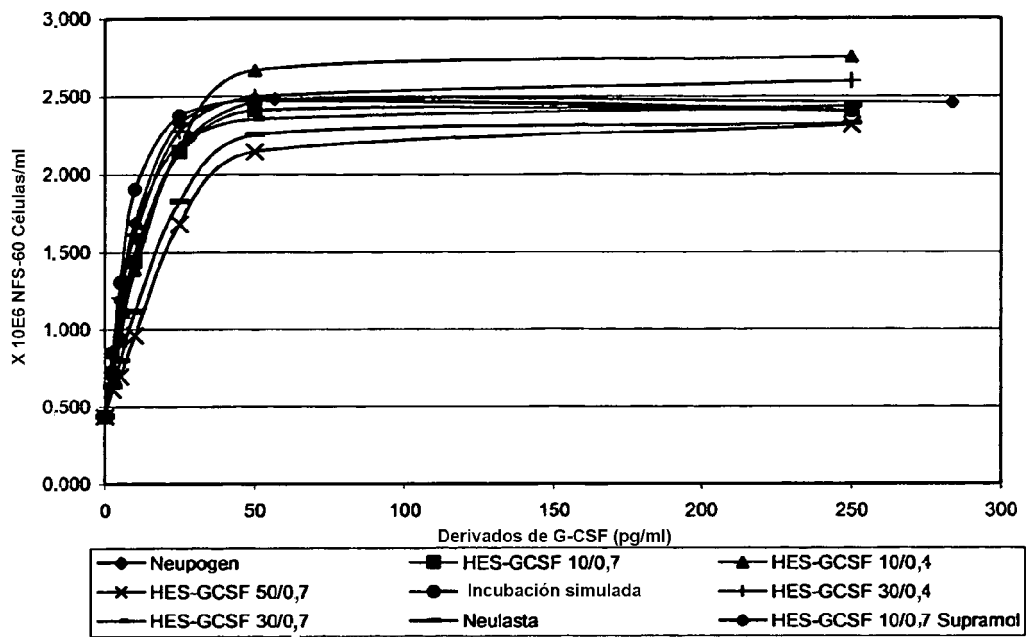


Fig. 21

