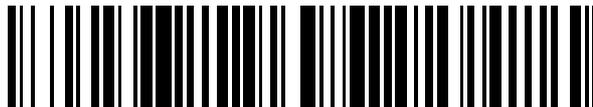


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 865**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C08B 31/10** (2006.01)  
**C08B 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02742858 .0**  
96 Fecha de presentación: **15.03.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1372735**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **CONJUGADOS DE HIDROXIALQUILALMIDÓN-PRINCIPIO ACTIVO.**

30 Prioridad:  
**16.03.2001 DE 10112825**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.01.2012**

73 Titular/es:  
**FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH  
ELSE-KRÖNER-STRASSE 1  
61352 BAD HOMBURG V.D.H., DE**

72 Inventor/es:  
**SOMMERMEYER, Klaus;  
EICHNER, Wolfram;  
FRIE, Sven;  
JUNGHEINRICH, Cornelius;  
SCHARPF, Roland;  
LUTTERBECK, Katharina;  
HEMBERGER, Jürgen y  
ORLANDO, Michele**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 371 865 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 hidroxialquilamidón-principio activo

La presente invención se refiere a compuestos que comprenden un conjugado de un hidroxialquilalmidón (HAS) y un principio activo, estando el hidroxialquilalmidón unido directamente covalentemente al principio activo mediante un grupo azometino  $-\text{CH}=\text{N}-$  o un grupo metilenoamino  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  selectivamente mediante el grupo terminal reductor del HAS y siendo el principio activo una proteína, oligopéptido o polipéptido. La invención se refiere además a procedimientos para la preparación de un conjugado covalente de HAS-principio activo en el que HAS y un principio activo se hacen reaccionar entre sí en un medio de reacción selectivamente mediante el grupo terminal reductor de HAS, realizándose la reacción mediante el grupo terminal de HAS reductor selectivamente oxidado o haciendo reaccionar entre sí HAS y el principio activo directamente con formación de una base de Schiff, caracterizado porque el medio de reacción es agua o una mezcla de agua con disolvente orgánico que comprende al menos el 10 % en peso de agua, y siendo el principio activo una proteína, un oligopéptido o un polipéptido. La invención también se refiere al uso médico de los conjugados.

## ANTECEDENTES TÉCNICOS

El uso clínico de muchos principios activos farmacéuticos está afectado por una serie de problemas (véase Delgado y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 9 (3, 4), (1992) pág. 249-304). Las proteínas nativas parenteralmente administradas están sometidas, por ejemplo, a la secreción por el sistema reticuloendotelial, el hígado, el riñón y el bazo. A este respecto, la secreción se realiza en función de la carga de las cadenas de los hidratos de carbono, la presencia de receptores celulares para la proteína y de la forma y tamaño de la molécula. El límite de secreción de la filtración glomerular del riñón se encuentra, por ejemplo, en aproximadamente 67 kD.

Como resultado de la degradación proteolítica debe observarse además una pérdida rápida de la actividad biológica.

Las proteínas bacterianamente expresadas, así como otras proteínas recombinantes, pueden presentar una elevada inmunogenicidad y provocar reacciones de hipersensibilidad potencialmente mortales. Reacciones correspondientes evitan naturalmente el uso médico de estos productos.

Por este motivo, en el estado de la técnica ya se investigó sistemáticamente desde finales de los años 70 la mejora de las propiedades de proteínas exógenas mediante modificación química, especialmente polimerización o acoplamiento a polímeros macromoleculares. A este respecto, muchos trabajos se concentraron en la preparación de conjugados de, por una parte, proteínas u otros principios activos y, por otra parte, polietilenglicol (PEG) (véase el documento US 4.179.337). Las ventajas que se esperaron de estas reacciones de acoplamiento comprenden semivida *in vivo* mejorada de las proteínas, toxicidad reducida, estabilidad mejorada y solubilidad mejorada de los principios activos (Abuchowski y Davis, *Enzymes as drugs*, Holcenberg y Rubberts, Herausgeber, pág. 367-383, John Wiley & Sons N.Y. (1981).

Sin embargo, el procedimiento para el acoplamiento de los principios activos demostró ser problemático ya que el grupo activo de la proteína se inactivó mediante acoplamiento a PEG o las reacciones proporcionaron el producto de reacción en rendimiento no útil. Para conseguir una unión específica que no perjudique la actividad del principio activo, grupos activos se introdujeron en PEG o el principio activo o los compuestos se unieron entre sí con un adaptador. Normalmente, el PEG se provee para esto de un grupo activo que a continuación se une covalentemente al grupo capaz del acoplamiento de una proteína.

Así, por ejemplo, se describió la pérdida de la actividad de unión de los anticuerpos y sus fragmentos después de su acoplamiento a PEG (Kitamura y col., *Cancer Res.*, vol. 51 (1991), pág. 4310-4315; y Pedley y col., *Br. J. Cancer*, vol. 79 (1994), pág. 1126-1130). Para la solución de este problema, Chapman y col. (*Nature Biotech.*, vol. 17 (1999), pág. 780-783) proponen unir el PEG a determinados sitios de unión del anticuerpo.

La pérdida de actividad del componente de acoplamiento se describe además en el documento WO 95/13090. Para la solución se propone activar el PEG con un grupo reactivo y unir el PEG a  $\alpha$ -interferón mediante este grupo reactivo en presencia de un tensoactivo. Como grupo reactivo preferido se menciona carbonato de N-succinimida que formará un enlace uretano bajo las condiciones mencionadas con el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina.

El documento WO 96/41813 también da a conocer procedimientos para la preparación de un conjugado de polímero-polipéptido en el que el polímero (especialmente PEG) se derivatiza en un sitio específico y a continuación se une a un polipéptido. A este respecto se incorpora preferiblemente un grupo amino-oxi-acetilo en PEG y este compuesto se une a continuación a un polipéptido, especialmente a IL-8, hG-CSF y IL-1.

Por tanto, en la bibliografía se encuentra múltiples ejemplos de conjugados correspondientes; véanse conjugados de PEG-insulina en el documento US 4.179.337, conjugados bovinos de PEG-hemoglobina en el documento US

4.412.989, conjugados de PEG-ribonucleasa y conjugados de PEG-superóxidodismutasa en Veronese y col., Applied Biochem. Biotech., vol. 11, 141-152 (1995), conjugados de PEG-IL-2 o conjugados de PEG-IFN- $\beta$  en el documento US 4.766.106, conjugados de PEG-polimixina en el documento WO 90/15628 y conjugados de PEG-IL-2 en el documento WO 90/07939. Algunos conjugados encuentran mientras tanto en aplicación clínica. Por ejemplo, las propiedades de la enzima asparaginasa pudieron mejorarse mediante la formación de conjugados con PEG, y puede obtenerse comercialmente un conjugado de PEG-asparaginasa con la marca Oncaspar para la terapia contra el cáncer. La Agencia estadounidense del medicamento (US Food and Drug Administration) autorizó recientemente un G-CSF acoplado a PEG (Pegfilgastim). Un gran número de otros productos pegilados se encuentra en las distintas fases de desarrollo clínico, entre ellos, por ejemplo, PEG-CDP870, PEG-dronabinol, etc. (véase PEG-Pipeline en [www.enzon.com](http://www.enzon.com) o [www.inhale.com](http://www.inhale.com)).

No sólo proteínas, sino también otros compuestos se acoplaron a PEG y otros polímeros según este esquema. Los documentos WO 97/33552 y WO 97/38727 dan a conocer, por ejemplo, el acoplamiento de paclitaxel a PEG y el uso del conjugado para el tratamiento de tumores. El uso de un conjugado de PEG-camptotecina para el tratamiento de tumores está siendo investigado por la empresa Enzon en la fase clínica I.

También se han acoplado ya antibióticos a PEG. Dowling y Russell informaron, por ejemplo, de la farmacocinética de un conjugado de oxitetraciclina-PEG (J. Vet. Pharmacol. Ther., vol. 23 (2000), 107-110). Para la obtención de nuevas funciones, en el estado de la técnica también se derivatizaron antibióticos mediante otros procedimientos. Por ejemplo, se preparó una penicilina retardada que es un derivado de la penicilina procaína, es decir, la sal de la penicilina con la base de procaína. Este derivado posee una duración prolongada del efecto y se usa, por ejemplo, para la terapia de la sífilis.

También se han descrito reacciones de acoplamiento con más de dos compuestos. El documento WO 93/23062 da a conocer, por ejemplo, la preparación de un producto de acoplamiento de un anticuerpo dirigido contra un linfoma de linfocitos B, PEG activado y una toxina.

Sin embargo, los conjugados de PEG-principio activo no presentan estructuras naturales para las que hayan descrito rutas de descomposición *in vivo*. Entre otras cosas, por este motivo, además de los conjugados de PEG también se han generado otros conjugados y polímeros de proteínas para la solución de los problemas anteriormente mencionados. Por tanto, hay múltiples procedimientos para la reticulación de distintas proteínas y la unión de proteínas a macromoléculas (véase el resumen en Wong, S.S., "Chemistry of protein conjugation and cross linking", CRCS, Inc. (1993)).

El hidroxietilalmidón (HES) se descompone en el cuerpo por la  $\alpha$ -amilasa como derivado de una amilopeptida que se produce naturalmente. La preparación de conjugados de HES-proteína también se ha descrito ya en el estado de la técnica (véanse los conjugados de HES-hemoglobina en los documentos DE 26 16 086 o DE 26 46 854).

La hemoglobina es una proteína que podría tener una gran importancia clínica como agente de transporte de sustitutos de la sangre y el oxígeno (el llamado "transportador de oxígeno basado en hemoglobina", de "Hämoglobin-Based-Oxygen Carrier", HBOC). Sin embargo, aunque la necesidad de un producto de este tipo ya se apreció pronto (véase Rabiner, J. Exp. Med. 126, (1967) 1127), ninguno de los productos de HBOC conocidos hasta la fecha ha conseguido el estatus de un fármaco aprobado.

La hemoglobina natural está constituida por dos cadenas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -péptidos que como grupo prostético tienen unidas respectivamente un hemo. Sin embargo, las moléculas de hemoglobina aisladas son muy inestables y se descomponen rápidamente en los  $\alpha$ , $\beta$ -dímeros más estables (MG 32 kDa). La semivida biológica de la hemoglobina aislada en la circulación sanguínea se encuentra en aproximadamente 1 hora, ya que los dímeros son rápidamente secretados por los riñones. A este respecto, los dímeros generan efectos secundarios nefrotóxicos (véase Bunn & Jandl, J. Exp. Med. 129, (1967) 925-934). Por tanto, los trabajos de desarrollo sobre moléculas de hemoglobina derivatizadas se concentraron principalmente en reticular intramolecularmente hemoglobina, ligar intramolecularmente para la formación de formas poliméricas de HBOC y/o acoplar a polímeros.

Los conjugados de hemoglobina conocidos se describen, por ejemplo, en Xue y Wong (Meth. in Enzymol., 231 (1994), pág. 308-322) y en los documentos DE 26 16 086 y DE 26 46 854. El último da a conocer procedimientos mediante los cuales se une hemoglobina a HES haciéndose reaccionar inicialmente el HES con peryodato de sodio. A este respecto se forman dialdehídos a los que se une la hemoglobina. Los documentos DE 30 29 307 A1 y WO 99/49897 dan a conocer similarmente conjugados de HES-hemoglobina en los que los grupos hidroxilo de HES se convierten inicialmente en grupos aldehído mediante la reacción con peryodato. Aquí también se une la hemoglobina al HES mediante los grupos aldehído así obtenidos. Alternativamente a esto, el documento DE 30 29 307 A1 da a conocer el acoplamiento de hemoglobina a HES, activándose los grupos hidroxilo de HES inicialmente mediante la reacción con un reticulante, por ejemplo, con un reticulante que contiene un bromuro de alquilo, y el producto intermedio así obtenido se hace reaccionar con la hemoglobina. El documento DE 26 16 086 describe similarmente

el acoplamiento de hemoglobina a HES según un procedimiento en el que inicialmente se une un reticulante (por ejemplo, cianuro de bromo) al HES y a continuación se une la hemoglobina al producto intermedio.

Igualmente, Richter y col. (International Archives of Allergy and Applied Immunology. 52, 307-315 (1976)) dan a conocer conjugados entre HES y una proteína, en este caso BSA (albúmina de suero bovino), para cuya preparación se activan inicialmente grupos OH de HES con cianuro de bromo y el derivado de HES obtenido se hace reaccionar a continuación con la proteína.

El HES es un derivado sustituido del polímero de hidrato de carbono amilopectina presente en el almidón de maíz al 95 %. El HES presenta ventajosas propiedades reológicas y actualmente se usa clínicamente como agente de reemplazo de volumen y para la terapia de hemodilución (Sommermeyer y col., Krankenhauspharmazie, vol. 8 (8), (1987), pág. 271-278; y Weidler y col., Arzneim.-Forschung/ Drug Res., 41. (1991) 494-498).

La amilopectina está constituida por unidades de glucosa, estando presentes en las cadenas principales enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos, sin embargo en las ramificaciones representan enlaces  $\alpha$ -1,6-glicosídicos. Las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas se determinan esencialmente por el tipo de enlaces glicosídicos. Debido al enlace  $\alpha$ -1,4-glicosídico ramificado se forman estructuras helicoidales con aproximadamente 6 monómeros de glucosa por espira.

Las propiedades fisicoquímicas lo mismo que las bioquímicas del polímero pueden modificarse mediante sustitución. La introducción de un grupo hidroxietilo puede conseguirse mediante hidroxietilación alcalina. La diferente reactividad del grupo hidroxilo respectivo en el monómero de glucosa sin sustituir en comparación con la hidroxietilación puede aprovecharse mediante las condiciones de reacción, de esta manera es posible una influencia limitada sobre el patrón de sustitución.

Por tanto, el HES se caracteriza esencialmente por la distribución de pesos moleculares y el grado de sustitución. El grado de sustitución puede denominarse a este respecto DS ("grado de sustitución", de "degree of substitution"), que se refiere a la proporción de monómeros de glucosa sustituidos de todas las unidades de glucosa, o describirse como MS (sustitución molar, de "molar substitution"), designándose el número de grupos hidroxietilo por unidad de glucosa.

Las soluciones de HES se presentan como composiciones polidispersas en las que las moléculas individuales se diferencian entre sí en lo referente al grado de polimerización, el número y la disposición de los sitios de ramificación, así como su patrón de sustitución. Por tanto, el HES es una mezcla de compuestos con diferente peso molecular. Correspondientemente, una determinada solución de HES se determina por un peso molecular promedio mediante variables estadísticas. A este respecto,  $M_n$  se calcula como la media aritmética simple en función del número de moléculas (promedio en número), mientras que  $M_w$ , la media ponderada, representa la variable de medida dependiente de la masa.

Sin embargo, hasta la fecha se evitó un enlace químico selectivo de proteínas a HES por el hecho de que no se realizaba selectivamente la activación de HES. Por tanto, los conjugados de proteína-HES conocidos en el estado de la técnica resultan de un acoplamiento no selectivo de HES activado con cianuro de bromo a hemoglobina (véase el documento DE 26 16 086). Procedimientos correspondientes pueden conducir a productos polidispersos con propiedades irregulares y efectos secundarios potencialmente tóxicos.

Hashimoto (Hashimoto y col., Kunststoffe, Kautschuck, Fasern, vol. 9, (1992) pág. 1271-1279) dio a conocer por primera vez un procedimiento en el que un grupo terminal de aldehído reductor de un sacárido podía oxidarse selectivamente, obteniéndose un éster reactivo (lactona).

Basándose en este procedimiento, el documento WO 98/01158 da a conocer que pueden obtenerse conjugados de hemoglobina-hidroxietilalmidón en los que la hemoglobina se liga selectivamente al HES mediante enlaces amida entre grupos amino libres de la hemoglobina y el grupo terminal reductor presente en la forma oxidada de HES. Sin embargo, tanto el procedimiento dado a conocer en Hashimoto y col. como también los procedimientos según el documento WO 9801158 se basan en una reacción entre sacárido (HES) y proteína (hemoglobina) en disolvente orgánico. Concretamente, en esta publicación se usó sulfóxido de dimetilo (DMSO).

Sin embargo, el experto sabe que muchas proteínas sufren en disolventes orgánicos un cambio estructural que no se invierte en soluciones acuosas. Generalmente, con el cambio estructural también va asociado una pérdida de actividad. En cualquier caso, el disolvente orgánico es costoso de eliminar, ya que para el uso médico planeado ya no pueden ser aceptables proporciones residuales de disolventes orgánicos. Incluso el peligro potencial de impurezas y cambios estructurales de las proteínas debe excluirse en cuanto al uso planeado.

Por tanto, la presente invención se basa en el objetivo de facilitar conjugados de hidroxialquilalmidón-principio activo

mejorados y procedimientos para su preparación que conduzcan a conjugados biológicamente activos que puedan usarse en la práctica clínica diaria. Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para la preparación de conjugados de hidroxialquilalmidón-principio activo en el que los productos secundarios no se generan en cantidades significativas, ya que estos productos secundarios también perjudican la posterior purificación del producto en un grado considerable.

Este objetivo se ha alcanzado ahora sorprendentemente mediante un procedimiento para la preparación de un conjugado covalente de HAS-principio activo en el que se hacen reaccionar entre sí el HAS y un principio activo selectivamente mediante el grupo terminal reductor en un medio de reacción, realizándose la reacción mediante el grupo terminal reductor selectivamente oxidado del HAS o haciéndose reaccionar directamente entre sí el HAS y el principio activo con formación de una base de Schiff, caracterizado porque el medio de reacción es agua o una mezcla de agua con disolvente orgánico que comprende al menos el 10 % en peso de agua, siendo el principio activo una proteína, oligopéptido o polipéptido.

La invención se refiere además a un conjugado de HAS-principio activo en el que el principio activo está unido covalentemente directamente al HAS que puede obtenerse mediante este procedimiento haciendo reaccionar un grupo amino del principio activo con HAS de forma que se forme una base de Schiff.

La invención se refiere además a un conjugado de HAS-principio activo en el que el principio activo está unido directamente covalentemente al HAS mediante un grupo azometino  $-CH=N-$  selectivamente mediante el grupo terminal reductor del HAS, siendo el principio activo una proteína, un oligopéptido o un polipéptido.

La invención se refiere además a un conjugado de HAS-principio activo en el que el principio activo está unido directamente covalentemente al HAS mediante un grupo metilenoamino  $-CH_2-NH-$  selectivamente mediante el grupo terminal reductor del HAS, siendo el principio activo una proteína, un oligopéptido o un polipéptido.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que presenta un conjugado de HAS-principio activo según la invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:

- 25 La Fig. 1 muestra el cromatograma de GPC de la reacción de acoplamiento entre ox-HES 130 kD y HSA según el procedimiento A.III;
- la Fig. 2 el cromatograma de GPC de la reacción de acoplamiento entre ox-HES 130 kD y HSA según el procedimiento A.IV;
- 30 la Fig. 3 el cromatograma de GPC de la reacción de acoplamiento entre ox-HES 130 kD y HSA según el procedimiento A.V y un tiempo de reacción de 2 horas;
- la Fig. 4 el cromatograma de GPC de la reacción de acoplamiento entre ox-HES 130 kD y HSA, procedimiento A.V, tiempo de reacción durante la noche;
- la Fig. 5 el cromatograma de GPC de la reacción de acoplamiento entre ox-HES 10 kD y HSA según el procedimiento A.V después de 2 horas (Fig. 5a) y durante la noche (Fig. 5b);
- 35 la Fig. 6 el cromatograma de GPC de la reacción de acoplamiento entre ox-HES 130 kD y HSA según el procedimiento A.VII después de 24 horas tiempo de reacción;
- la Fig. 7 el cromatograma de GPC de la reacción de acoplamiento entre ox-HES 130 kD y HSA según el procedimiento B.V;
- la Fig. 8 la SDS-PAGE y transferencia Western de distintas reacciones de acoplamiento entre HES y HSA;
- 40 la Fig. 9 la SDS-PAGE y transferencia Western de distintas reacciones de acoplamiento entre HES y HSA;
- la Fig. 10 el esquema de reacción para la creación de un conjugado de HES-ADN;
- la Fig. 11 la fotografía de un gel, el conjugado de HES-ADN antes y después de una digestión con una enzima de restricción.

En el marco de la presente invención, un compuesto químico se designa principio activo cuando el compuesto sea adecuado para ser constituyente activo de un agente discrecional para fines terapéuticos o diagnósticos. En el caso del principio activo se trata preferiblemente de un constituyente activo de un fármaco, es decir, el compuesto dentro de una formulación de fármaco que después de la administración a un sujeto consigue una acción fisiológica.

- Una visión general sobre los fármacos autorizados y sus principios activos se encuentra en el vademécum alemán (Rote Liste). Los principios activos mencionados en el vademécum alemán pueden usarse para la preparación de conjugados de HAS-principio activo según el procedimiento según la invención. Sin embargo, según la presente invención, aunque el término principio activo también comprenda todos los compuestos cuya idoneidad es conocida para el uso diagnóstico o terapéutico, hasta la fecha no pudieron usarse para este fin debido a los problemas anteriormente representados. En el caso del principio activo se trata preferiblemente de una vitamina, vacuna, toxina, antibiótico (o antiinfeccioso), antiarrítmico, supresor del apetito, anestésico, analgésico, antirreumático, antialérgico, antiasmático, antidepresivo, antidiabético, antihistamínico, antihipertónico, o un agente antineoplásico. Estructuralmente se trata de una proteína, oligopéptido o polipéptido.
- Los compuestos preparados según la presente invención contienen la actividad del principio activo y las propiedades ventajosas del HAS. Como ventajas adicionales, los conjugados según la invención presentan otras ventajas, entre ellas una semivida *in vivo* mejorada de los principios activos, una toxicidad reducida, una estabilidad mejorada y/o una solubilidad mejorada de los principios activos.
- La cadena del HAS se acorta en el plasma por la alfa-amilasa después de la administración. Por tanto, la actividad del producto de acoplamiento puede determinarse como actividad del producto de acoplamiento nativo, es decir, directamente después del acoplamiento, o como actividad del producto de acoplamiento metabolizado, es decir, después de la metabolización *in vivo* del producto de acoplamiento. La metabolización *in vivo* puede simularse mediante una descomposición *in vitro*.
- La actividad del principio activo puede determinarse según procedimientos conocidos en el estado de la técnica para esta sustancia. En un agente antineoplásico, la actividad se determina, por ejemplo, como concentración inhibitoria (CI), o en un agente antiinfeccioso como concentración inhibitoria mínima (CIM). La determinación se realiza preferiblemente *in vitro* en células diana adecuadas (véase Chow y col., Haematologica, vol. 86 (2001), pág. 485-493). Los efectos *in vitro* pueden confirmarse además por un modelo animal relevante (véase, por ejemplo, el modelo de ratón del carcinoma de células renales que se describió en Changnon y col., véase BJU Int., vol. 88 (2001), pág. 418-424).
- En comparación con la sustancia sin acoplar, el producto de acoplamiento nativo puede presentar una actividad aumentada o reducida. Sin embargo, la actividad se reduce preferiblemente no más de 5 veces, con especial preferencia no más de 3 ó 2 veces. El producto metabólico presenta preferiblemente una actividad comparable a la de la sustancia sin acoplar, es decir, el conjugado metabolizado presenta al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 75 % de la actividad del principio activo antes del acoplamiento, prefiriéndose especialmente una retención de al menos el 95 % de la actividad.
- En el marco de la presente invención, el término "hidroxialquilalmidón" se usa además para designar derivados de almidón que se sustituyeron con un grupo hidroxialquilo con 1 a 3 átomos de C. Por tanto, el grupo designado "hidroxialquilalmidón" comprende hidroximetilalmidón, hidroxietilalmidón y hidroxipropilalmidón. El uso de hidroxietilalmidón (HES) como componente de acoplamiento se prefiere especialmente para todas las formas de realización de la invención.
- Según la invención se prefiere que el hidroxietilalmidón presente un peso molecular promedio (media ponderada) de 1-300 kDa, prefiriéndose especialmente un peso molecular promedio de 5 a 200 kDa. El hidroxietilalmidón puede presentar además un grado de sustitución molar de 0,1-0,8 y una relación de sustitución de C<sub>2</sub>:C<sub>6</sub> en el intervalo de 2-20, referido respectivamente a los grupos hidroxietilo.
- Para el acoplamiento del principio activo al HAS puede ser necesario introducir en una primera etapa un grupo activo en el principio activo y/o en el HAS. Grupos activos correspondientes pueden ser, por ejemplo, grupos tiol o amino (véanse los ejemplos).
- Además, el principio activo y el HAS pueden acoplarse entre sí usando un adaptador. Como adaptador puede usarse un reticulante discrecional. Numerosos reticulantes como, por ejemplo, SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato; véase el Ejemplo 7) pueden obtenerse comercialmente y son habituales para el experto (véase la lista alfabética de "Cross-linking Reagents" en el catálogo de productos de la empresa Perbio y [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com)).
- Según una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a compuestos que comprenden un conjugado de HAS y un principio activo antineoplásico y a su uso para el tratamiento de tumores.
- Según la invención se ha constatado ahora sorprendentemente que los conjugados de HAS-principio activo que comprenden un principio activo antineoplásico presentan una acción tóxica mejorada contra células tumorales y/o una toxicidad reducida para otras células. Por tanto, los conjugados hacen posible un mayor espectro terapéutico.

La semivida en plasma de los conjugados se prolonga significativamente. Esto hace posible una rotura de los mecanismos de reparación en células tumorales mediante exposición prolongada. Al mismo tiempo, la presente invención hace posible una captación más lenta, especialmente en tejido sano, por lo que se consigue una menor concentración pico y una tolerancia mejorada por los pacientes.

5 Para la preparación de los conjugados según la invención se usa cualquier principio activo antineoplásico.

El principio activo antineoplásico se acopla al HAS según la invención selectivamente mediante el grupo terminal reductor del HAS, realizándose la reacción mediante el grupo terminal reductor selectivamente oxidado del HAS o haciéndose reaccionar directamente entre sí el HAS y el principio activo con formación de una base de Schiff.

10 Según otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto que comprende un conjugado de HAS y un principio activo antineoplásico. El procedimiento comprende etapas en las que el HAS se acopla covalentemente a un principio activo antineoplásico selectivamente mediante el grupo terminal reductor del HAS y el conjugado se aísla, realizándose la reacción mediante el grupo terminal reductor selectivamente oxidado del HAS o haciéndose reaccionar directamente entre sí el HAS y el principio activo con formación de una base de Schiff.

15 Además, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto que presenta un conjugado de HAS y un principio activo antineoplásico. La composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente compatible y/o una citocina. La citocina es preferiblemente IL-2,  $\alpha$ -interferón,  $\gamma$ -interferón.

20 La composición farmacéutica puede presentarse en una forma de administración discrecional conocida en el estado de la técnica. Por ejemplo, la composición puede formularse eventualmente para administración oral o parenteral. La formulación de la composición se realiza según procedimientos habituales en el estado de la técnica. Además del principio activo, la composición normalmente contiene un vehículo farmacéuticamente compatible y uno o varios coadyuvantes, así como dado el caso conservantes, solubilizantes, etc.

25 Finalmente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto que comprende un conjugado de HAS y un principio activo antineoplásico, estando acoplado el principio activo directamente a HAS mediante un grupo azometino  $-\text{CH}=\text{N}-$  o un grupo metilenoamino  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  selectivamente mediante el grupo terminal reductor de HAS para la preparación de un fármaco para el tratamiento de tumores y/o sus metástasis, especialmente para el tratamiento de tumores urológicos y/o metástasis de tumores urológicos, para el tratamiento de metástasis de carcinoma de células renales o para el tratamiento de enfermedades del sistema linfático como, por ejemplo, CLL, linfoma de Hodgkin, NHL, mieloma múltiple, enfermedad de Waldenström. Según esta forma de realización de la invención, el fármaco también puede comprender además una citocina, por ejemplo IL-2,  $\alpha$ -interferón,  $\gamma$ -interferón.

35 Se prefiere especialmente el uso de los compuestos según la invención para la preparación de un fármaco para el tratamiento de tumores y/o metástasis urológicas de tumores urológicos, por ejemplo, para el tratamiento de metástasis de carcinoma de células renales. Actualmente no puede conseguirse una terapia curativa del carcinoma de células renales ni con una quimioterapia de combinación ni con mitomicina C sola. Esto puede depender de la farmacocinética desfavorable del compuesto, ya que la proporción de la eliminación renal sólo se encuentra en aproximadamente el 18 %. Como el HAS se elimina casi completamente por los riñones, el conjugado presenta un mayor porcentaje de eliminación renal en comparación con la sustancia no conjugada. Esta forma de realización de la presente invención aprovecha el almacenamiento intermedio intracelular del HAS. Especialmente, los tipos de HAS altamente sustituidos (HAS 200/0,62) presentan un almacenamiento intracelular reforzado, en el caso extremo incluso una sobrecarga. Este fenómeno también se ha observado en el área del túbulo proximal (Peron y col., Clinical Nephrology, vol. 55 (2001), pág. 408-411).

40 Por tanto, según esta forma de realización, la presente invención pone a disposición un enriquecimiento de un principio activo antineoplásico en determinadas células o tejidos diana. Por tanto, la farmacocinética mejorada de los conjugados hace posible alcanzar a menores concentraciones sistémicas una concentración esencialmente mayor en las células del órgano diana. Este uso médico se usa preferiblemente en el carcinoma renal hipernefroide y el cromófilo que representan juntos aproximadamente el 90 % de todos los tipos histológicos.

45 Según una forma de realización alternativa, la invención se refiere al uso de los compuestos según la invención para la preparación de un fármaco para el tratamiento de enfermedades del sistema linfático, por ejemplo, CLL, linfoma de Hodgkin, NHL, mieloma múltiple, enfermedad de Waldenström. Debido al acoplamiento según la invención de HAS a un principio activo antineoplásico, la captación intracelular de los principios activos se ralentiza en función de la longitud de cadena y del grado de sustitución. Además, investigaciones cinéticas radiactivas han mostrado que el HAS se almacena en determinados órganos, entre ellos los órganos linfáticos, más tiempo que en el cuerpo completo (véase Bepperling y col., Crit. Care, vol. 3, Suppl. 1 (1999), pág. 153). Por tanto, se realiza un

enriquecimiento de los conjugados en las células diana, lo que implica una farmacocinética mejorada con menor toxicidad sistemática.

5 La invención se refiere además al uso de los compuestos según la invención para la preparación de un fármaco para el tratamiento de neoplasias malignas primarias cutáneas/locales o sus metástasis. A este respecto se aprovechan dos efectos, la captación aumentada específica por el tejido mencionado y el transporte retrasado del conjugado de HAS fuera del tejido. Ambos conducen a un enriquecimiento del conjugado en las células diana.

10 La invención se refiere además al uso de los compuestos según la invención para la preparación de un fármaco para el tratamiento de enfermedades del sistema hematológico o enfermedades oncológicas, por ejemplo, de carcinomas bronquiales de células no pequeñas y de células pequeñas, carcinomas de mama, carcinomas de células escamosas del esófago, carcinomas de células renales, carcinomas testiculares, melanomas malignos, ALL o CML. Especialmente en el uso de los conjugados para el tratamiento del carcinoma de células renales resultan ventajas debido al fuerte enriquecimiento del compuesto en el tejido afectado por la mayor hidrofiliía del conjugado y la mayor eliminación renal resultante de la misma. Para esta forma de realización de la invención se prefiere especialmente el uso de vindesina como principio activo.

15 La invención se refiere además al uso de los compuestos según la invención para la preparación de un fármaco, usándose el compuesto como terapia de combinación con uno o varios principios activos antineoplásicos distintos o citocinas. La terapia de combinación puede realizarse mediante la administración de un agente en el que están presentes todos los principios activos o mediante la administración de dos agentes distintos o más en los que se formuló respectivamente un principio activo.

20 La presente invención pone además a disposición un procedimiento para la preparación de un fármaco que contiene una citocina y un compuesto según la invención y que es adecuado para nuevas terapias de combinación. Agentes correspondientes son especialmente adecuados para el tratamiento de carcinoma de células renales avanzado.

La presente invención se refiere a compuestos que comprenden un conjugado de HAS y un principio activo antiinfeccioso, o un antibiótico, así como su uso para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

25 La penetración de microorganismos (virus, bacterias, hongos, protozoos) en un macroorganismo (planta, animal, ser humano) y la propagación en éstos se denomina infección. La formación y la evolución de una enfermedad infecciosa dependen esencialmente de la patogenia del microorganismo y de la inmunidad del macroorganismo.

Desde hace décadas, los principios activos antiinfecciosos se usan como agentes quimioterapéuticos para combatir enfermedades infecciosas.

30 A. Fleming identificó la penicilina ya en 1928 mediante la propiedad del principio activo de formar zonas libres de estafilococos sobre placas de cultivo. La penicilina también fue el primer antibiótico que pudo obtenerse a escala industrial y adquirió gran importancia en la práctica clínica.

35 Como penicilina se designan actualmente principios activos de un grupo de antibióticos de  $\beta$ -lactama que son formados por un hongo de la especie *Penicillium* (por ejemplo, *P. chrysogenum* y *P. notatum*). La acción bactericida se basa en el bloqueo de la síntesis de la pared celular bacteriana. La penicilina inactiva la enzima bacteriana transpeptidasa, impidiéndose la reticulación cruzada de las cadenas de polisacáridos de la mureína de la pared celular.

40 Desde el descubrimiento se han aislado y sintetizado innumerables principios activos que inhiben el crecimiento de microorganismos o que los matan. La mayoría de los antibióticos proceden de *Streptomyces*, que en su posible importancia se apreció hace poco para la patogénesis de arteriosclerosis (Stille y Dittmann, Herz, vol. 23 (1998), pág. 185-192), los antibióticos intracelulares provistos de efecto prolongado pueden significar un avance esencial en la terapia y la profilaxis.

45 Según la invención se ha constatado ahora sorprendentemente que el acoplamiento de principios activos antiinfecciosos a HAS conduce a una mejora de las propiedades farmacocinéticas de los principios activos, especialmente a un semivida *in vivo* prolongada, a una captación intracelular mejorada y/o eficacia del principio activo.

Según la invención, como principio activo antiinfeccioso se usa un antibiótico de glicopéptido.

A este respecto puede tratarse, por ejemplo, de vancomicina.

50 El acoplamiento entre el principio activo antiinfeccioso y el hidroxietilalmidón se realiza mediante los grupos terminales reductores del hidroxietilalmidón.

Según otra forma de realización de la presente invención, el principio activo antiinfeccioso está acoplado al hidroxietilalmidón mediante un adaptador.

5 La presente invención comprende además composiciones farmacéuticas que presentan un compuesto según la invención. Normalmente, las composiciones farmacéuticas contienen además un vehículo farmacéuticamente compatible.

Correspondientemente se ponen a disposición procedimientos para la creación de un conjugado covalente de HAS-principio activo en el que se hacen reaccionar entre sí el HAS y al menos un principio activo en un medio de reacción. El medio de reacción se caracteriza porque es agua o una mezcla de agua con disolvente orgánico que comprende al menos el 10 % en peso de agua.

10 El medio de reacción del procedimiento según la invención comprende al menos el 10 % en peso, preferiblemente al menos el 50 % en peso, especialmente al menos el 80 % en peso como, por ejemplo, el 90 % en peso, o incluso hasta el 100 % en peso de agua, y correspondientemente como máximo el 90 % en peso, preferiblemente como máximo el 50 % en peso, especialmente como máximo el 20 % en peso, por ejemplo, el 10 % en peso, o incluso hasta el 0 % en peso de disolvente orgánico. La reacción también tiene lugar en una fase acuosa. El medio de reacción preferido es agua.

15 Por tanto, el procedimiento según la invención ya es ventajoso porque no deben usarse forzosamente disolventes toxicológicamente inaceptables y, por tanto, en el producto preparado según la invención se suprime la eliminación de restos incluso pequeños de disolventes toxicológicamente inaceptables, como siempre es obligatorio según el procedimiento conocido para evitar la contaminación no deseada con disolvente. Además, el control de calidad adicional necesario según el procedimiento anterior a los restos de disolventes toxicológicamente inaceptables puede omitirse debido a que el procedimiento según la invención prefiere el uso de disolventes toxicológicamente aceptables. Disolventes preferidos según la invención son, por ejemplo, disolventes próticos toxicológicamente aceptables como etanol o propilenglicol.

20 Además, es una ventaja del procedimiento según la invención que básicamente se eviten cambios estructurales irreversibles o reversibles de proteínas o péptidos inducidos por disolventes orgánicos que no pueden excluirse sistemáticamente en los procedimientos en disolventes orgánicos. Por consiguiente, los polipéptidos obtenidos según el procedimiento según la invención pueden ser distintos de los preparados en DMSO.

25 Según la invención se constató además sorprendentemente que puede realizarse un acoplamiento de HAS a principios activos en una solución acuosa sin que a este respecto se observen reacciones secundarias a un grado significativo. Por tanto, el procedimiento según la invención conduce directamente a productos mejorados con mayor pureza. Por tanto, el procedimiento según la invención hace posible por primera vez la sencilla preparación de conjugados de HAS-principio activo en los que el principio activo está presente en forma activa y se conservan las ventajosas propiedades del HAS. Para aislar el conjugado de HAS-principio activo de la mezcla de reacción no se necesita ningún procedimiento especial, ya que la reacción se realiza en la fase acuosa, es decir, no deben purificarse forzosamente disolventes orgánicos.

30 Según la invención se prefiere que el HAS se una directamente a un grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>, grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, grupo SH, grupo COOH o grupo -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> del principio activo. Alternativamente a esto, en el HAS puede introducirse otro grupo reactivo o realizarse la unión entre el HAS y el principio activo mediante un adaptador. El uso de adaptadores correspondientes para la unión de principios activos a PEG es conocido en el estado de la técnica. Se prefiere el uso de aminoácidos, especialmente glicina, alanina, leucina, isoleucina y fenilalanina, así como de derivados de hidrazina y oxilamina como adaptadores, como se da a conocer en los documentos WO 97/38727 y EP 605 963.

35 Según una forma de realización del procedimiento de la presente invención, el HAS se oxida antes de la unión al principio activo, realizándose una oxidación selectiva del grupo terminal reductor del HAS. Esta manera de proceder hace posible procedimientos en los que el grupo terminal reductor oxidado del HAS reacciona con un grupo amino del principio activo con formación de una amida. Esta forma de realización presenta la ventaja especial de que se logra una unión específica entre el HAS y los principios activos y, por tanto, un producto especialmente homogéneo.

40 A este respecto, el HAS puede reaccionar con el grupo terminal reductor oxidado y el principio activo preferiblemente al menos 12, con especial preferencia al menos 24 horas. Además, puede ser ventajoso añadir un activador discrecional, por ejemplo, etildimetil-aminopropil-carbodiimida (EDC). La relación molar entre HAS y el principio activo durante la reacción puede elegirse discrecionalmente, normalmente se encuentra en el intervalo de HAS:principio activo de 20:1 a 1:20, prefiriéndose especialmente una relación de 6:1 a 1:6. Los mejores resultados se obtuvieron con una relación molar de HAS:principio activo de aproximadamente 2:1.

Según una forma de realización alternativa de la presente invención, el HAS y el principio activo se hacen reaccionar

directamente entre sí, formándose una base de Schiff entre el HAS y el principio activo como producto intermedio. El grupo azometino  $-\text{CH}=\text{N}-$  de la base de Schiff puede reducirse a continuación con adición formal de  $<2\text{H}>$  a un grupo metilnamino  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ . Para esta reducción, el experto puede usar múltiples agentes reductores conocidos en el estado de la técnica, prefiriéndose especialmente la reducción mediante BH.

5 El acoplamiento de HAS puede realizarse a un grupo discrecional del principio activo. El acoplamiento se realiza preferiblemente de forma que el conjugado metabolizado presente al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 75 % de la actividad del principio activo antes del acoplamiento, prefiriéndose especialmente una retención de al menos el 95 % de la actividad. La reacción de acoplamiento también puede controlarse naturalmente de forma que enlance la unión de HAS se realice exclusivamente a uno o varios grupos determinados del principio activo, por ejemplo, a  
10 restos de lisina o cisteína de un péptido. Resultan ventajas especiales cuando el HAS se une a uno o varios grupos determinados del principio activo mediante el grupo terminal reductor oxidado, ya que en una manera de proceder correspondiente se obtienen conjugados de HAS-principio activo homogéneos.

Según el procedimiento de la presente invención, como sustancias de partida para la reacción se usa HAS y una proteína o un péptido. A este respecto pueden usarse proteínas terapéuticas o diagnósticas discrecionales de origen  
15 natural o recombinante. Una lista de los principios activos de preparación recombinante que actualmente se encuentran en el mercado se encuentra en Pharma Business, julio/agosto de 2000, páginas 45 a 60. La presente invención comprende la preparación de conjugados de HAS-principio activo que comprenden cualquiera de los principios activos mencionados en esta publicación.

Se prefiere especialmente la preparación de conjugados usando citocinas, por ejemplo, interferones, interleucinas, factores de crecimiento, enzimas, inhibidores de enzimas, receptores, fragmentos de receptores, insulina, factor VIII, factor IX, antibióticos (o antiinfecciosos), antibióticos peptídicos, proteínas de la envuelta viral, hemoglobinas, eritropoyetina, albúminas, TPAh, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, o un derivado de los mismos. Resultan ventajas especiales en el uso de proteínas o péptidos recombinantes en el procedimiento según la invención. Como ya se ha citado, proteínas correspondientes no pueden usarse frecuentemente como  
20 principios activos debido a sus propiedades antigénicas para seres humanos. Sin embargo, después del acoplamiento a HAS por el procedimiento según la invención, se reduce la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes, lo que hace posible el uso médico en seres humanos.

Además, resultan ventajas especiales en el acoplamiento de HAS a proteínas de cadena corta y péptidos más pequeños. Actualmente se han creado múltiples bibliotecas de péptidos, por ejemplo, bibliotecas de expresión en fago en las que oligopéptidos cortos (por ejemplo, 3 a 20-meros) se expresan sobre la superficie de fagos. Además, se expresan anticuerpos de una única cadena de polipéptidos (los llamados anticuerpos monocatenarios, de "single chain antibodies") en bacterias o sobre la superficie de fagos. Estas bibliotecas se criban para una determinada actividad de principio activo o de unión. Sin embargo, el uso terapéutico y diagnóstico de principios activos de péptidos correspondientes o anticuerpos ha fracasado hasta la fecha a causa de que éstos son secretados muy rápidamente en el organismo debido a su pequeño tamaño (véase Chapman y col., 1999, en el sitio citado). Según el procedimiento según la invención, estos péptidos pueden acoplarse ventajosamente a HAS y presentan una semivida *in vivo* que hace posible un uso como principio activo.  
30

Según la invención, como material de partida pueden usarse HES fisiológicamente compatibles discrecionales. Se prefiere el HES con un peso molecular promedio (media ponderada) de 1 a 300 kDa, especialmente de 1 a 150 kDa. Se prefiere especialmente el HES con un peso molecular promedio de 2 a 40 kD. El HES presenta preferiblemente un grado de sustitución molar de 0,1 a 0,8 y una relación de sustitución de  $\text{C}_2:\text{C}_6$  en el intervalo de 2 a 20, referida respectivamente a los grupos hidroxietilo.  
40

La invención se refiere además a los conjugados de HAS-principio activo que pueden obtenerse según el procedimiento anterior. Estos conjugados presentan propiedades ventajosas, concretamente alta actividad del principio activo, baja inmunogenicidad, largo tiempo de permanencia en el cuerpo y excelentes propiedades reológicas que aumentan el aprovechamiento médico de los conjugados.  
45

Correspondientemente, la presente invención también comprende procedimientos para la preparación de un fármaco o agente de diagnóstico en los que un conjugado de HAS-principio activo se prepara según uno de los procedimientos anteriores y se mezcla con uno del vehículo, adyuvante o coadyuvante farmacéuticamente compatible conocido en el estado de la técnica, así como fármacos o agentes de diagnóstico que pueden obtenerse según este procedimiento.  
50

El uso médico del fármaco correspondiente depende del tipo de principio activo. Si se usa, por ejemplo, hemoglobina como principio activo, el conjugado puede usarse como agente de transporte de oxígeno. Por otra parte, si se usa una citocina como principio activo para la preparación, el conjugado puede usarse, por ejemplo, en la terapia de tumores. La concentración del conjugado que va a usarse en cada caso en el fármaco puede determinarla  
55

inmediatamente cualquier experto medio mediante pruebas de efecto a dosis.

Los agentes de diagnóstico pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades o trastornos. Si se usa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como principio activo, el conjugado es adecuado, por ejemplo, para la realización de los procedimientos de detección de ELISA habituales en el estado de la técnica.

5 En los ejemplos se usaron los materiales descritos a continuación:

Albúmina de suero humano: Sigma-Aldrich A3782

HES 130kD: Tipo 130/0,5, preparado a partir de T91SEP (Fresenius Kabi)

Datos:  $M_w$ : 130.000 ± 20.000 D

$M_n$ : 42.600 D

HES 10 kD: Tipo HHH 4-2 (Fresenius Kabi)

Datos:  $M_w$ : 9.800 D

$M_n$ : 3.695 D

EDC: Sigma-Aldrich nº 16.146-2

(Etildimetil-aminopropil-carbodiimida)

HOBt Sigma-Aldrich nº 15.726-0

(1-Hidroxi-1H-benzotriazol hidratado)

Kit de detección de glicanos DIG: Roche-Boehringer nº 1142 372

10

Los siguientes Ejemplos 1 a 6 describen el acoplamiento de HSA y diaminobutano a HES con grupos terminales reductores oxidados o el acoplamiento directo de HSA a HES. A este respecto, el HSA y el diaminobutano son sólo ejemplos de los principios activos anteriormente definidos. El Ejemplo 7 describe el acoplamiento de oligonucleótidos a HES.

Ejemplo 1: Oxidación selectiva de los grupos terminales reductores del hidroxietilalmidón:

Para la oxidación selectiva de los grupos terminales reductores del hidroxietilalmidón (130 kD y 10 kD), éstos se disolvieron en una cantidad mínima de agua y se mezclaron con una cantidad distinta de una solución de yodo y una solución de KOH.

15

La mezcla se agitó hasta que desapareció el color que indicaba el I<sub>2</sub>. Esta manera de proceder se repitió varias veces para conseguir la adición de una mayor cantidad de solución de yodo y solución de KOH. A continuación, la solución se purificó a través de una resina de intercambio catiónico de Na<sup>+</sup> Amberlite IR 120, se dializó durante 20 horas contra agua destilada (tubos de diálisis con un límite de exclusión de 4-6 kD) y se liofilizó.

20

El grado de oxidación se determinó en cada caso mediante el procedimiento dado a conocer en Somogyi, N. (Method in Carbohydride Chemistry, vol. 1, (1962) pág. 384-386). Los protocolos de la reacción de oxidación se reproducen en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Oxidación de los grupos terminales reductores de HES (130 kD y 10 kD) bajo distintas condiciones

Procedimiento	HES (Mn)	Solución de yodo 0,1 N	Solución de KOH 0,1 M	Disolvente	Tiempo de reacción	Rendimiento
OXIDACIÓN (1)	1 g	0,3 ml	0,5 ml	Agua	4 h	30,1 %
HES 130	$2,4 \times 10^{-5}$ moles	$3,0 \times 10^{-5}$ moles	$5,0 \times 10^{-5}$ moles	4,0 ml	25 °C	

ES 2 371 865 T3

Procedimiento	HES (Mn)	Solución de yodo 0,1 N	Solución de KOH 0,1 M	Disolvente	Tiempo de reacción	Rendimiento
OXIDACIÓN (2) HES 130	4 g $9,4 \times 10^{-5}$ moles	1,0 ml $1,0 \times 10^{-4}$ moles	1,5 ml $1,5 \times 10^{-4}$ moles	Agua 6,0 ml	Durante la noche 25 °C	24,8 %
OXIDACIÓN (3) HES 130	5 g $1,2 \times 10^{-4}$ moles	1,2 ml $1,2 \times 10^{-4}$ moles	1,5 ml $1,5 \times 10^{-4}$ moles	Agua 7,5 ml	Durante la noche 25 °C	24,3 %
OXIDACIÓN (4) HES 130	5 g $1,2 \times 10^{-4}$ moles	3,0 ml $3,0 \times 10^{-4}$ moles	4,5 ml $4,5 \times 10^{-4}$ moles	Agua 7,5 ml	Durante la noche 25 °C	60,8 %
OXIDACIÓN (5) HES 130	5 g $1,2 \times 10^{-4}$ moles	4,0 ml $4,0 \times 10^{-4}$ moles	5 ml $5,0 \times 10^{-4}$ moles	Agua 7,5 ml	Durante la noche 25 °C	80,0 %
OXIDACIÓN (6) HES 130	8 g $1,9 \times 10^{-4}$ moles	7,0 ml $7,0 \times 10^{-4}$ moles	11,5 ml $1,2 \times 10^{-3}$ moles	Agua 7,5 ml	Durante la noche 25 °C	88,4 %
OXIDACIÓN (7) HES 130	10 g $2,4 \times 10^{-4}$ moles	10 ml $1,0 \times 10^{-3}$ moles	20 ml $2,0 \times 10^{-3}$ moles	Agua 7,5 ml	Durante la noche 25 °C	100 %
OXIDACIÓN (1) HES 10	5 g $1,4 \times 10^{-3}$ moles	2,0 ml $2,0 \times 10^{-4}$ moles	2,0 ml $2,0 \times 10^{-4}$ moles	Agua 10,0 ml	20 h 25 °C	3,0 %
OXIDACIÓN (2) HES 10	5 g $1,4 \times 10^{-3}$ moles	3,5 ml $3,5 \times 10^{-4}$ moles	4,5 ml $4,5 \times 10^{-4}$ moles	Agua 10,0 ml	Durante la noche 25 °C	5,3 %
OXIDACIÓN (3) HES 10	15 g $4,1 \times 10^{-3}$ moles	21,0 ml $2,1 \times 10^{-3}$ moles	31,0 ml $3,1 \times 10^{-3}$ moles	Agua	Durante la noche 25 °C	10,5 %
OXIDACIÓN (4) HES 10	8 g $2,2 \times 10^{-3}$ moles	83,0 ml $8,3 \times 10^{-3}$ moles	180,0 ml 1,8 x 10 moles	Agua	Durante la noche 25 °C	80,0 %
OXIDACIÓN (5) HES 10	7 g $1,9 \times 10^{-3}$ moles	95,0 ml $9,5 \times 10^{-3}$ moles	210,0 ml $2,1 \times 10^{-2}$ moles	Agua	Durante la noche 25 °C	100,0 %
OXIDACIÓN (6) HES 10	6,4 g $1,7 \times 10^{-3}$ moles	50 ml $5,0 \times 10^{-3}$	150 ml $1,5 \times 10^{-2}$	Agua	Durante la noche 25 °C	100,0 %

5 Los protocolos resumidos en esta tabla se reproducen a continuación en detalle para la oxidación (6), HES 10 kD: 6,4 g de HES 10 kD ( $1,7 \text{ mmoles}$ ) se disolvieron en un recipiente de reacción con agitación continua en pocos ml de agua. A ésta se añadieron 50 ml de una solución de yodo 0,1 N ( $5,0 \text{ mmoles}$ ) y 150 ml de una solución de KOH 0,1 N ( $15 \text{ mmoles}$ ). Esta mezcla se dejó reposar durante la noche a 25 °C. La mezcla se purificó con Amberlite IR 120 (forma de  $\text{Na}^+$ ) y se dializó contra agua (tubo de diálisis de acetato de celulosa; corte 4 a 6 kD). El producto dializado se liofilizó (Heraeus-Christ Alpha, secado en matraz durante la noche).

10 Como puede deducirse de la Tabla 1, se consiguió una oxidación completa de los grupos terminales reductores (se corresponde con un rendimiento del 100 %) de HES 130 kD, después la cantidad de yodo aumentó de  $3,0 \times 10^{-5}$  moles a  $1,0 \times 10^{-3}$  moles.

Para una oxidación completa de los grupos terminales reductores de HES 10 kD se necesitó otro aumento de la cantidad de yodo a una concentración de más de  $2,1 \times 10^{-3}$  moles.

Ejemplo 2: Unión de HES con grupos terminales reductores oxidados a HSA en fase acuosa:

5 Para el acoplamiento, el hidroxietilalmidón se disolvió completamente en agua con grupos terminales reductores oxidados (ox-HES) y HSA. Cuando la solución quedó transparente, se añadió etildimetil-aminopropil-carbodiimida (EDC) disuelta en agua. Después de la activación por EDC con agitación moderada se añadieron más cantidades de EDC. La reacción se activó dado el caso con HOBt y se dejó reposar durante la noche. El producto se purificó por diálisis contra agua destilada durante 15 horas y a continuación se liofilizó (a continuación se designa procedimiento A).

Los protocolos de la reacción de acoplamiento se encuentran en la Tabla 2.

10 **Tabla 2:** Reacciones de acoplamiento entre HES (130 kD y 10 kD) con grupos terminales reductores oxidados y HSA bajo distintas condiciones (procedimiento A; el número entre paréntesis en la columna HES describe el procedimiento de oxidación según la Tabla 1)

Procedimiento A	HSA	ox-HES (Mn)	EDC	HOBt	Disolvente	Activador	Reacción
Acoplamiento I ox-HES 130	300 mg $4,4 \times 10^{-6}$ moles	100 mg (1) $2,4 \times 10^{-6}$ moles	25 mg $1,6 \times 10^{-4}$ moles	100 mg $7,7 \times 10^{-4}$ moles	H <sub>2</sub> O/dioxano 13 ml/2 ml	1,5 h 3-4 °C	4 h 25 °C
Acoplamiento II ox-HES 130	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	300 mg (2) $7,0 \times 10^{-6}$ moles	15 mg $9,7 \times 10^{-5}$ moles	100 mg $7,7 \times 10^{-4}$ moles	H <sub>2</sub> O/dioxano 10 ml/3 ml	1,5 h 3-4 °C	Durante la noche 25 °C
Acoplamiento III ox-HES 130	200 mg $3,0 \times 10^{-6}$ moles	3,8 g (5) $8,9 \times 10^{-5}$ moles	46,5 mg $3,0 \times 10^{-4}$ moles	20 mg $1,5 \times 10^{-4}$ moles	H <sub>2</sub> O/dioxano 10 ml/3 ml	0 h	24 h 25 °C
Acoplamiento IV ox-HES 130	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	1,9 (5) $4,5 \times 10^{-5}$ moles	25 mg $1,6 \times 10^{-4}$ moles	20 mg $1,5 \times 10^{-4}$ moles	Agua	1,5 h 3-4 °C	Durante la noche 25 °C
Acoplamiento V ox-HES 130	200 mg $3,0 \times 10^{-6}$ moles	4,3 g (5) $1,0 \times 10^{-4}$ moles	100 mg $6,0 \times 10^{-4}$ moles	0 mg	Agua	0 h	Durante la noche 25 °C
Acoplamiento VI ox-HES 130	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	130 mg (7) $3,0 \times 10^{-6}$ moles	50 mg $3,0 \times 10^{-4}$ moles	0 mg	Agua 5 ml + 10ml	0 h	5 h 25 °C
Acoplamiento VII ox-HES 10	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	130 mg (7) $3,0 \times 10^{-6}$ moles	200 mg $3,0 \times 10^{-4}$ moles	0 mg	Agua* 5ml + 2x 10ml	0 h	24 h 25 °C
Acoplamiento I ox-HES 10	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	300 mg (1) $8,1 \times 10^{-6}$ moles	5 mg $3,0 \times 10^{-5}$ moles	100 mg $7,7 \times 10^{-4}$ moles	H <sub>2</sub> O/dioxano 13 ml/2 ml	1,5 h 3-4 °C	Durante la noche 25 °C
Acoplamiento II ox-HES 10	70 mg $1,0 \times 10^{-6}$ moles	1,0 g (2) $2,7 \times 10^{-4}$ moles	15,5 mg $1,0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Agua	10 ml 0 h	Durante la noche 25 °C
Acoplamiento III	200 mg	3,0 g (3)	77,5 mg	20 mg	Agua	0 h	6 h

## ES 2 371 865 T3

Procedimiento A	HSA	ox-HES (Mn)	EDC	HOBt	Disolvente	Activador	Reacción
ox-HES 10	$3,0 \times 10^{-6}$ moles	$8,1 \times 10^{-4}$ moles	$5,0 \times 10$ moles	$1,5 \times 10^{-4}$ moles			25 °C
Acoplamiento IV ox-HES 10	50 mg $7,4 \times 10^{-7}$ moles	7,4 g (4) $2,0 \times 10^{-3}$ moles	282 mg $1,5 \times 10^{-3}$ moles	0 mg	Agua	0 h	Durante la noche 25 °C
Acoplamiento V ox-HES 10	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	103 g (6) $2,8 \times 10^{-5}$ moles	93 mg $5,6 \times 10^{-4}$ moles	0 mg	Agua 4 ml	0 h	20 h 25 °C
Acoplamiento VI ox-HES 10	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	103 g (6) $2,8 \times 10^{-5}$ moles	200 mg $1,2 \times 10^{-3}$ moles	0 mg	Agua* 3x5 ml	0 h	30 h 25 °C
- adición de solución de EDC con un embudo de goteo en el transcurso de 60 min.							

5 La reacción de acoplamiento VII entre ox-HES 130 kD y HSA se explica en detalle a continuación: en un matraz redondo se disolvieron 130 mg de ox-HES 130 kD (grado de oxidación de aproximadamente el 100 %) y 100 mg de HSA con agitación en aproximadamente 5 ml de agua a temperatura ambiente. Tan pronto como la solución se volvió clara se añadieron gota a gota 200 mg de EDC en 3 porciones disueltas respectivamente en 5-10 ml de agua durante un periodo de tiempo de una hora. Entre cada adición se dejó con agitación aproximadamente 4 h a temperatura ambiente. Después de 24 h de tiempo de reacción, la mezcla se dializó contra agua (tubo de diálisis de acetato de celulosa; corte 4-6 kD). A continuación se liofilizó el producto.

### Ejemplo 3: Unión directa de HES a HSA en fase acuosa:

10 El principio de esta reacción se basa en la formación de bases de Schiff entre HES y grupos amino de la proteína, controlándose la reacción mediante la reacción de la base de Schiff en la amina correspondiente mediante  $\text{NaBH}_4$  (a continuación se designa procedimiento B).

15 Para esto, el HES se disolvió completamente en poca agua. A ésta se añadió HSA disuelto en tampón borato, pH 9,0. A esta solución se añadió  $\text{NaBH}_4$  y se dejó con agitación a temperatura ambiente. Se añadió otra alícuota de HES 130 kD, seguido de más  $\text{NaBH}_4$ . Después de terminar la reacción se dializó y se liofilizó como se ha descrito.

Los protocolos de los ensayos individuales se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Acoplamiento directo entre HES (130 kD y 10 kD) y HSA bajo distintas condiciones (procedimiento B)

Procedimiento B	HSA	HES (Mn)	$\text{NaBH}_4$	pH del tampón	Tiempo de reacción
Acoplamiento I HES 130	50 mg $7,5 \times 10^{-7}$ moles	500 mg $1,2 \times 10^{-5}$ moles	500 mg $1,3 \times 10^{-2}$ moles	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0 ml 7,4	48 h 25 °C
Acoplamiento II HES 130	100 mg $1,5 \times 10^{-6}$ moles	1,0 g $2,4 \times 10^{-5}$ moles	60 mg $1,6 \times 10^{-3}$ moles	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 ml 7,4	20 h 25 °C
Acoplamiento III HES 130	50 mg $7,5 \times 10^{-7}$ moles	9,8 g $2,3 \times 10^{-4}$ moles	285 mg $7,5 \times 10^{-3}$ moles	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 ml 7,4	36 h 25 °C
Acoplamiento IV HES 130	50 mg $7,5 \times 10^{-7}$ moles	2,0 $4,7 \times 10^{-5}$ moles	180 mg $4,7 \times 10^{-3}$ moles	Borato 0,1 M 9,0	30 h 25 °C

Procedimiento B	HSA	HES (Mn)	NaBH <sub>4</sub>	pH del tampón	Tiempo de reacción
Acoplamiento V	50 mg	4,0 g	60 mg	Borato 0,1 M	100 h
HES 130	$7,5 \times 10^{-7}$ moles	$9,4 \times 10^{-5}$ moles	$1,6 \times 10^{-3}$ moles	9,0	25 °C
Acoplamiento	50 mg	2,8 g	28 mg	Borato 0,1 M	80 h
HES 10	$7,5 \times 10^{-7}$ moles	$9,4 \times 10^{-5}$ moles	$1,6 \times 10^{-3}$ moles	9,0	25 °C

5 En particular, para el acoplamiento de HES 130 kD, 2,0 g de este compuesto se disolvieron completamente en agua (aproximadamente 5 ml). A ésta se añadieron 50 mg de HSA disuelto en 1 ml de tampón borato 0,1 M, pH 9,0. A esta solución se añadieron 30 mg de NaBH<sub>4</sub> y se dejó con agitación a temperatura ambiente. Después de 18 h se añadió otra alícuota de 2,0 g de HES 130 kD, seguido de otros 30 mg de NaBH<sub>4</sub>. Después de 100 h en total de tiempo de reacción se dializó y se liofilizó (acoplamiento V, HES 130 kD).

10 Para el acoplamiento de HES 10 kD, 1,4 g de este compuesto se disolvieron completamente en agua (aproximadamente 5 ml). A ésta se añadieron 50 mg de HSA disuelto en 1 ml de tampón borato 0,1 M, pH 9,0. A esta solución se añadieron 14 mg de NaBH<sub>4</sub> y se dejó con agitación a temperatura ambiente. Después de 18 h se añadió otra alícuota de 1,4 g de HES 10 kD, seguido de otros 14 mg de NaBH<sub>4</sub>. Después de 80 h en total de tiempo de reacción se dializó y se liofilizó (acoplamiento I, HES 10 kD).

#### Ejemplo 4: Análisis del producto de acoplamiento mediante GPC:

Los productos de reacción se analizaron inicialmente usando cromatografía de exclusión molecular (GPC).

15 4.1 Para la GPC se usó un instrumento de FPLC (Pharmacia) que estaba conectado a un monitor de HPLC UV (Hitachi). Además, se usaron las siguientes condiciones:

Columna:	Superose 12 HR 10/30 (1x30 cm) (Pharmacia)
Monitor de W:	280 nm
Bomba:	0,2 ml/min
Tampón:	Fosfato 50 mM / NaCl 150 mM a pH 7,2.

Bajo estas condiciones, el pico de HSA se encuentra normalmente después de 63 min, pudiendo medirse adicionalmente un pico pequeño a aproximadamente 57 min que lo ocasionan los dímeros de HSA. Los cromatogramas obtenidos mediante GPC pueden analizarse del siguiente modo:

20 4.2 La Fig. 1 es un cromatograma que muestra la distribución de tamaños de los productos después del acoplamiento de ox-HES 130 kD a HSA (acoplamiento III). En este procedimiento de acoplamiento se consiguieron muy buenos resultados sin activación con HOBt. Se midieron un único pico ancho claro a 37 min y otra banda más pequeña a 45 min, lo que indica un producto de acoplamiento con mayor peso molecular que el HSA. Al mismo tiempo se encontraron trazas de HSA sin modificar.

25 La Fig. 2 muestra la distribución de tamaños de los productos después del acoplamiento de ox-HES 130 kD a HSA (acoplamiento IV). La reacción se activó con HOBt. Se muestra que esta activación reduce el rendimiento, posiblemente debido a la promoción de reacciones secundarias.

30 Las Fig. 3 y 4 muestran la distribución de tamaños de los productos de reacción durante y después de la reacción de acoplamiento de ox-HES 130 kD a HSA (acoplamiento V). Después de 2 horas de tiempo de reacción, el HSA sin modificar se encontró como el producto con la mayor concentración, pero al mismo tiempo también los primeros productos de acoplamiento con el mayor peso molecular. Después de terminar la reacción, se encontró una alta concentración de un producto de acoplamiento homogéneo con un tiempo de retención de aproximadamente 35 min. El HSA sin modificar y otros productos de acoplamiento se encontraron con concentración relativamente baja.

35 La Fig. 5 muestra la distribución de tamaños correspondiente de los productos de reacción durante y después de la reacción de acoplamiento de ox-HES 10 kD a HSA (acoplamiento V). Aquí también se muestra que la concentración de los productos de acoplamiento con un peso molecular que se encuentra por encima del peso de HSA aumenta en el transcurso de la reacción.

Finalmente, en la Fig. 6 se muestra una reacción de acoplamiento en la que casi todas las moléculas de HSA podrían convertirse en un producto de acoplamiento homogéneo (productos de reacción del acoplamiento VII).

5 4.2 En la Fig. 7 se muestra un ejemplo de los cromatogramas que se obtuvieron en el análisis del acoplamiento directo de HES a HSA (procedimiento B, HES 130 kD, acoplamiento V). Puede apreciarse un pico claro a aproximadamente 65 min (HSA). Pero además también se detectó un producto de acoplamiento (pico a aproximadamente 42 min).

Ejemplo 5: Análisis de los productos de acoplamiento mediante SDS-PAGE y transferencia Western:

10 5.1 Se realizó PAGE en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) usando un instrumento Miniprotean II de la empresa Biorad y geles de acrilamida al 7,5 %. La realización de la electroforesis se realizó según los protocolos del fabricante. Los geles se tiñeron con plata según el procedimiento de Blum (Elektrophoresis, vol. 8, (1997) pág. 93-99) para hacer visibles las proteínas.

15 La presencia de glicanos en los productos de acoplamiento se detectó mediante transferencia Western y el kit de detección de glicanos de la empresa Roche-Boehringer. Después de separar los productos mediante SDS-PAGE, éstos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el instrumento de transferencia de la unidad de electroforesis Miniprotean II. A continuación, la membrana se oxidó mediante peryodato bajo condiciones a las que sólo se oxidan los grupos OH vecinales. Éstos se hicieron reaccionar a continuación con una digoxigenina funcionalizada con amino. La digoxigenina unida se detectó mediante anticuerpos monoclonales específicos que estaban unidos a una fosfatasa alcalina. Para esto se añadió un sustrato de fosfatasa (cloruro de 4-nitro-tetrazolio/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo), que genera un producto azul-violeta difícilmente soluble. Este producto precipita sobre la membrana y así pueden hacerse visibles las bandas. El HSA sin modificar y la creatinasa se usaron como controles negativos, mientras que la transferrina hizo de control positivo.

20 Las etapas de procedimiento exactas se describen en el prospecto adjunto a este kit (Roche-Boehringer).

25 5.2 Las Fig. 8 y 9 muestran respectivamente una fotografía del gel de SDS-PAGE teñido con plata (arriba) y la fotografía de los productos correspondientes después de la transferencia a una membrana y la detección de glicanos (abajo). Como puede extraerse de estas figuras, durante la reacción de acoplamiento se forma como producto de reacción un glicano relativamente homogéneo, mientras que al mismo tiempo disminuye la concentración de HSA sin modificar.

Ejemplo 6: Aclaración de posibles reacciones secundarias:

30 Se prepararon las siguientes mezclas de reacción para aclarar si las reacciones secundarias se realizan en forma de una autocondensación de HES con grupos terminales reductores oxidados:

**Tabla 4:** Mezclas de reacción para aclarar reacciones secundarias.

	ox-HES	EDC	HOBt	Agua	Tiempo de reacción
HES 130 kD	500 mg $1,2 \times 10^{-5}$ moles	15 mg $7,8 \times 10^{-5}$ moles	-	5,0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	500 mg $1,2 \times 10^{-5}$ moles	15 mg $7,8 \times 10^{-5}$ moles	Solución saturada	5,0 ml	30 h 25 °C
HE5 10 kD	100 mg $2,7 \times 10^{-5}$ moles	3,4 mg $1,8 \times 10^{-5}$ moles	-	5,0 ml	30 h 25 °C
HES 10 kD	100 mg $2,7 \times 10^{-5}$ moles	3,4 mg $1,8 \times 10^{-5}$ moles	Solución saturada	5,0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	700 mg $1,6 \times 10^{-5}$ moles	31 mg $1,6 \times 10^{-4}$ moles	-	5,0 ml	30 h 25 °C

	ox-HES	EDC	HOBt	Agua	Tiempo de reacción
HES 130 kD	700 mg $1,6 \times 10^{-5}$ moles	31 mg $1,6 \times 10^{-4}$ moles	Solución saturada	5,0 ml	30 h 25 °C

El objetivo de los experimentos era detectar en qué grado tiene lugar una posible autocondensación de HES en presencia o ausencia de HOBt. Las muestras se liofilizaron y se analizaron.

5 Mediante GPC y mediciones de luz dispersa, dentro de los límites de detección de algunos porcentaje no pudieron encontrarse indicaciones de aumentos del peso molecular.

Ejemplo 7: Acoplamiento de HES oxidado a ADN y análisis de la funcionalidad de los productos de acoplamiento (acoplamiento con principio activo no según la invención)

#### Principio de reacción:

10 Una representación esquemática de la reacción se encuentra en la Fig. 10. En la primera etapa, el grupo amino de la amina-HES12KD **3** reacciona con el grupo N-hidroxisuccinimida de SMCC **4** dando el conjugado **5**. Mediante centrifugación con la unidad de centrifugación-diálisis se separa el SMCC **4** sin reaccionar. El grupo maleimida del conjugado **5** reacciona luego con el grupo tiol del tio-ADN **1** dando el producto **6** deseado. El intervalo marcado en **6** es sólo un espaciador y puede tener cualquier forma.

15 La comprobación de la actividad biológica del conjugado **6** se realizó mediante la escisión por la enzima de restricción EcoR1. Una enzima de restricción sólo corta el ADN bicatenario con la secuencia de reconocimiento intacta.

#### ADN:

Se usó ADN bicatenario, sintetizado por MWG Biotech AG, Ebersberg. Las secuencias de las cadenas sencillas son:

SEC ID Nº 1: 5' - GTAGAGACAGGAGGCAGCAGTTGAATTCGCAGGGT -  
GAGTAGCAGTAGAGC-3' ;

SEC ID Nº 2: 5' - GCTCTACTGCTACTCACCCCTGCGAATT -  
CAACTGCTGCCTCCTGTCTCTAC-3' ;

modificadas con 5'-tiol C6 S-S por MWG (véase la Fig. 10).

20 Ambas cadenas sencillas del ADN se disolvieron en agua bidestilada con una concentración de cada vez 2 µg/µl y se hibridaron en la relación 1 : 1 a 96 °C dando un tio-ADN bicatenario **1** con una concentración de 2 µg/µl.

#### Análisis de los productos:

25 El análisis se realizó mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 4 % con una fase móvil de TBE de Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, por cada 1 µg de ADN en presencia de 50 µg de bromuro de etidio por 100 ml de gel. Las fotografías se tomaron con un sistema modular de CCD (INTAS Imaging Instruments, Göttingen, D) y un transiluminador de UV UVT-20 S/M/L (Herolab GmbH, Wiesloch, D) a 312 nm.

30 De la mezcla de reacción se tomó 1 µl (1 µg de ADN) y se cortó con 1 µl (20 U) de enzima de restricción EcoR1 (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, D), 1 µl de tampón de reacción (cloruro sódico 50 mM, Tris-HCl 100 mM, cloruro de magnesio 10 mM, 0,025 % de Triton X-100, pH 7,5, de New England Biolabs) y 7 µl de agua bidestilada a 37 °C durante 3 h.

#### Modificación del HES

La oxidación de HES12KD (Fresenius, lote 2540SR2.5P) con un peso molar promedio de 12000 g/mol con solución de yodo en oxo-HES12KD **2** se realizó según el procedimiento dado a conocer en el documento DE 19628705.

Reacción de 1,4-diaminobutano con oxo-HES12KD **2**:

35 Se disolvieron 1,44 g (0,12 mmoles) de oxo-HES12KD **2** en ml de dimetilsulfóxido anhidro (DMSO), se añadieron

5 gota a gota bajo nitrógeno a una solución de 1,5 ml (1,50 mmoles) de 1,4-diaminobutano y se agitó a 40 °C durante 19 h. La mezcla de reacción se añadió a una mezcla de 80 ml de etanol y 80 ml de acetona. El precipitado formado se separó por centrifugación y se recogió en 40 ml de agua. La solución se dializó durante 4 días contra agua (tubo de diálisis SnakeSkin, corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D) y a continuación se liofilizó. El rendimiento ascendió al 80 % (1,06 g) de amino-HES12KD 3.

#### Acoplamiento de amino-HES12KD 3 a tio-ADN 1.

10 A 400 µl de una solución de 10 mg/ml de amino-HES12KD 3 en un tampón de fosfato de sodio 10 mM y cloruro sódico 150 mM, pH 7,44, se añadió 1 mg de SMCC 4 disuelto en 50 µl de DMSO anhidro y la mezcla se trató 80 min a temperatura ambiente y 10 min a 46 °C. La mezcla se separó luego por centrifugación, el sobrenadante se recogió del precipitado y se centrifugó de nuevo. Se recogieron 200 µl de sobrenadante y se centrifugaron 45 min a 14000 g con una unidad de centrifugación-diálisis MICROCON YM-3 (Amicon, Millipore GmbH, Eschborn, D). Después de la adición de 400 µl de tampón de fosfato de sodio 10 mM y cloruro sódico 150 mM, pH 7,44, se centrifugó de nuevo durante 45 min, se añadieron otros 400 µl de tampón y se centrifugó 60 min. La cantidad de solución de conjugado que quedó en la unidad de diálisis se completó hasta 50 µl. Se añadieron 10 µl de esta solución a 10 µl de la solución de tio-ADN 1 y se dejó reaccionar 14 h a temperatura ambiente. Para el análisis se tomó 1 µl. Los resultados se muestran en la Fig. 11 en el carril 2 y 3.

Las condiciones de reacción para el ensayo descrito y para los ensayos con condiciones de reacción modificadas se resumen en la Tabla 1 y los resultados se representan en la Fig. 11.

Resumen de los resultados:

20 Se investigaron las siguientes condiciones:

1. Cantidad de SMCC: 1 mg (carriles 2, 6, 10, 14) o 5,6 mg (carriles 4, 8, 12, 16);

2. Temperatura para la reacción con tio-ADN 1:

Temperatura ambiente (carriles 2, 4, 6, 8) o 37 °C (carriles 10, 12, 14, 16);

3. Condiciones del tampón:

25 Fosfato 10 mM, NaCl 150 mM sin EDTA, pH 7,44 (carriles 2, 4, 10, 12) o

Fosfato 100 mM, NaCl 150 mM + EDTA 50 mM, pH 7,23 (carriles 6, 8, 14, 16)

30 En la Figura 11, los carriles 2-18 representan los resultados de los 8 ensayos de acoplamiento de amino-HES12KD 3 a tio-ADN 1 con ayuda de SMCC. A este respecto, los resultados directamente de la reacción o después de la reacción y posterior corte del ADN se representan los unos al lado de los otros. En el carril 1 se representa una mezcla de distintos ADN de referencia como marcador de longitud y los carriles 18 y 19 muestran tio-ADN 1 o tio-ADN 1 cortado. Además del tio-ADN 1 todavía sin reaccionar, todos los ensayos muestran adicionalmente productos de acoplamiento a masas mayores (carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16). Como HES12KD es una mezcla de moléculas de distinto tamaño, los productos de acoplamiento también muestran una distribución de peso molar. Todos los productos de acoplamiento contienen ADN intacto, ya que pueden ser completamente digeridos por EcoR1. Esto se muestra en la desaparición casi completa de las bandas difusas correspondientes después del corte (carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17).

Tabla 1: Condiciones de reacción del acoplamiento de amino-HES12KD 3 a tio-ADN 1

Carril	Ensayo	Temp [°C]	SMCC [mg]	ADN	HES12KD	Tampón	
1	Marcador						
2	19A1	TA	1	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,44, 10 mM	
3							cortado
4	19B1	TA	5,6	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,44, 10 mM	
5							cortado
6	19C1	TA	1	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,23, 100 mM	

ES 2 371 865 T3

Carril	Ensayo	Temp [°C]	SMCC [mg]	ADN	HES12KD	Tampón	
7							cortado
8	1901	TA	5,6	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,23, 100 mM	
9							cortado
10	19A2	37 °C	1	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,44, 10 mM	
11							cortado
12	19B2	37 °C	5,6	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,44, 10 mM	
13							cortado
14	19C2	37 °C	1	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,23, 100 mM	
15							cortado
16	19D2	37 °C	5,6	Tio-ADN	Amino-HES12KD	7,23, 100 mM	
17							cortado
18				Tio-ADN			
19							cortado

## REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la preparación de un conjugado covalente de HAS-principio activo en el que el HAS y un principio activo se hacen reaccionar selectivamente entre sí mediante el grupo terminal reductor en un medio de reacción, realizándose la reacción mediante el grupo terminal reductor selectivamente oxidado del HAS o haciéndose reaccionar entre sí directamente el HAS y el principio activo con formación de una base de Schiff, caracterizado porque el medio de reacción es agua o una mezcla de agua con disolvente orgánico, que comprende al menos el 10 % en peso de agua, siendo el principio activo una proteína, un oligopéptido o un polipéptido.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se usa hidroxietilalmidón con un peso molecular promedio (media ponderada) de 1 a 300 kDa.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que se usa hidroxietilalmidón con un peso molecular promedio (media ponderada) de 1 a 150 kDa.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se usa hidroxietilalmidón con un peso molecular promedio (media ponderada) de 2 a 40 kDa.
- 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se usa hidroxietilalmidón con un grado de sustitución promedio de 0,1 a 0,8 y una relación de sustitución de C<sub>2</sub>:C<sub>6</sub> en el intervalo de 2 a 20, referido en cada caso a los grupos hidroxietilo.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el principio activo es una enzima, un inhibidor de enzimas, un receptor, un fragmento de receptor, una insulina, un factor VIII, un factor IX, una citocina, un interferón, una interleucina, un factor de crecimiento, un antibiótico peptídico, una proteína de la cápside vírica, una hemoglobina, una eritropoyetina, una albúmina, un TPAh, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el principio activo es una vacuna, un antibiótico o un antidiabético.
- 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que un grupo amino del principio activo se hace reaccionar con HAS de manera que se forma una base de Schiff.
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el HAS se une a un grupo ε-NH<sub>2</sub>, grupo α-NH<sub>2</sub> o grupo -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> del principio activo.
- 10.- Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que el grupo azometino -CH=N- de la base de Schiff se reduce dando un grupo metilnamino -CH<sub>2</sub>-NH-.
- 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, en el que como agente reductor se usa BH<sub>4</sub>.
- 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el grupo terminal reductor del HAS se oxida selectivamente antes de la unión al principio activo.
- 13.- Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el HAS se une a un grupo ε-NH<sub>2</sub>, grupo α-NH<sub>2</sub>, grupo SH, grupo COOH o grupo -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> del principio activo.
- 14.- Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, en el que el grupo terminal reductor oxidado del HAS reacciona con un grupo amino del principio activo con formación de una amida.
- 15.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el HAS se une a un adaptador antes de la preparación del conjugado.
- 16.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el principio activo se une a un adaptador antes de la preparación del conjugado.
- 17.- Procedimiento para la preparación de un fármaco o agente de diagnóstico que comprende las etapas en las que se prepara un conjugado covalente de HAS-principio activo según una de las reivindicaciones 1 a 16 y se mezcla con un vehículo, un adyuvante o un coadyuvante farmacéuticamente compatibles.
- 18.- Conjugado de HAS-principio activo, en el que el principio activo está directamente unido covalentemente al HAS, que puede obtenerse mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 11.
- 19.- Conjugado de HAS-principio activo, en el que el principio activo está directamente unido covalentemente a HAS

mediante un grupo azometino  $-\text{CH}=\text{N}-$  selectivamente mediante el grupo terminal reductor del HAS, siendo el principio activo una proteína, un oligopéptido o un polipéptido.

- 5 20.- Conjugado de HAS-principio activo, en el que el principio activo está directamente unido covalentemente a HAS mediante un grupo metilnamino  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  selectivamente mediante el grupo terminal reductor del HAS, siendo el principio activo una proteína, un oligopéptido o un polipéptido.
- 21.- Conjugado de HAS-principio activo según la reivindicación 19 ó 20, en el que el HAS está unido a un grupo  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ , grupo  $\alpha$ - $\text{NH}_2$  o grupo  $-\text{C}(\text{NH}_2)_2$  del principio activo.
- 22.- Conjugado de HAS-principio activo según una de las reivindicaciones 19 a 21, en el que se usa hidroxietilalmidón con un peso molecular promedio (media ponderada) de 1 a 150 kDa.
- 10 23.- Conjugado de HAS-principio activo según una de las reivindicaciones 19 a 22, en el que se usa hidroxietilalmidón con un grado de sustitución promedio de 0,1 a 0,8 y una relación de sustitución de  $\text{C}_2:\text{C}_6$  en el intervalo de 2 a 20, referido en cada caso a los grupos hidroxietilo.
- 15 24.- Conjugado de HAS-principio activo según una de las reivindicaciones 19 a 23, en el que el principio activo es una enzima, un inhibidor de enzimas, un receptor, un fragmento de receptor, una insulina, un factor VIII, un factor IX, una citocina, un interferón, una interleucina, un factor de crecimiento, un antibiótico peptídico, una proteína de la cápside vírica, una hemoglobina, una eritropoyetina, una albúmina, un TPAh, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
- 25.- Conjugado de HAS-principio activo según una de las reivindicaciones 19 a 23, en el que el principio activo es una vacuna, un antibiótico o un antidiabético.
- 20 26.- Composición farmacéuticas que presenta un compuesto según una de las reivindicaciones 18 a 25.
- 27.- Composición farmacéutica según la reivindicación 26 que presenta además un vehículo farmacéuticamente compatible.

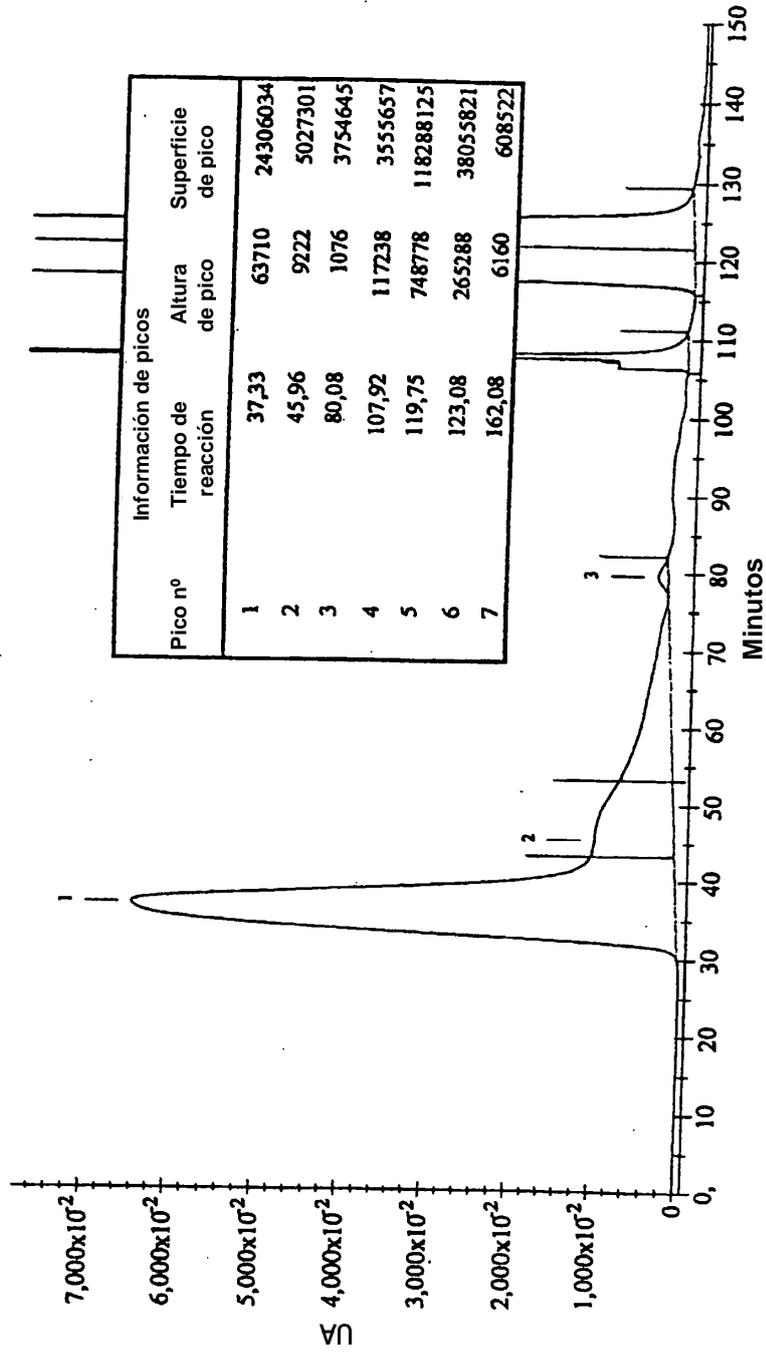


Fig. 1: Cromatograma de GPC del acoplamiento III de ox-HES 130 kD a HSA

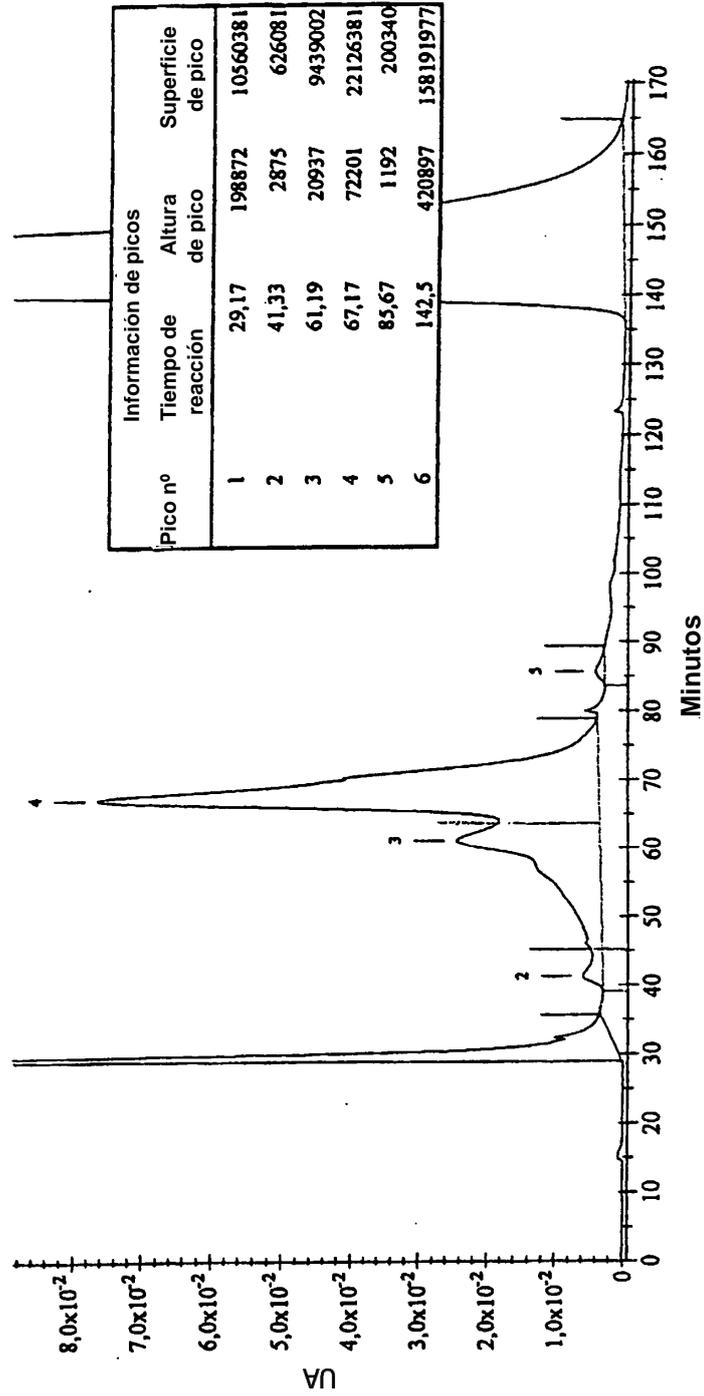


Fig. 2: Cromatograma de GPC del acoplamiento IV de ox-HES 130 kD a HSA

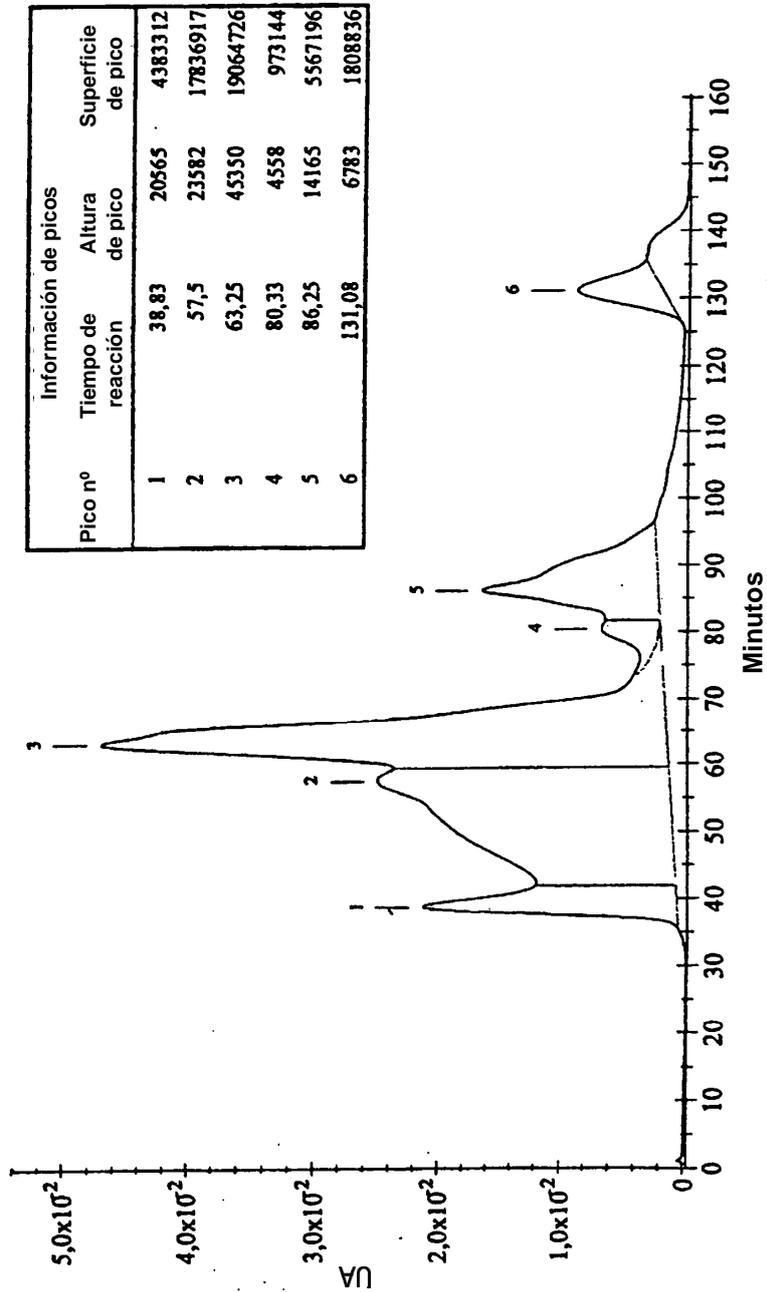


Fig. 3: Cromatograma de GPC del acoplamiento V de ox-HES 130 kD a HSA (tiempo de reacción 2 h)

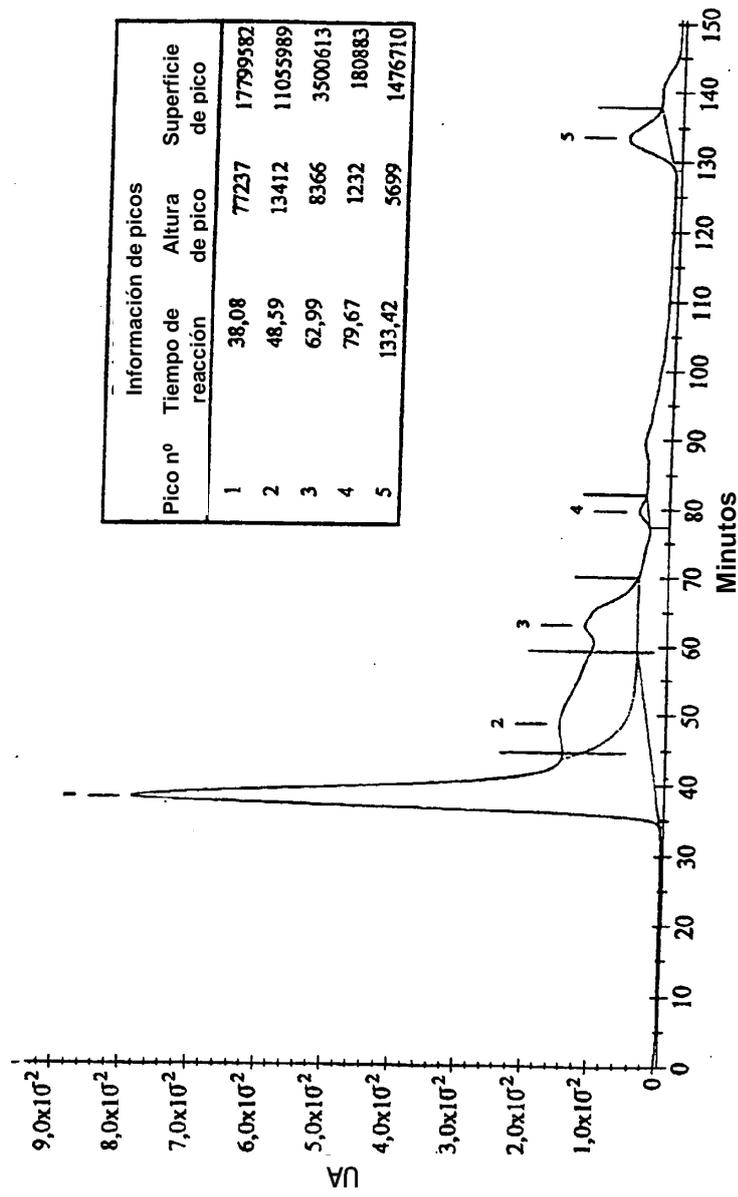


Fig. 4: Cromatograma de GPC del acoplamiento V de ox-HES 130 kD a HSA (después de la reacción completa)

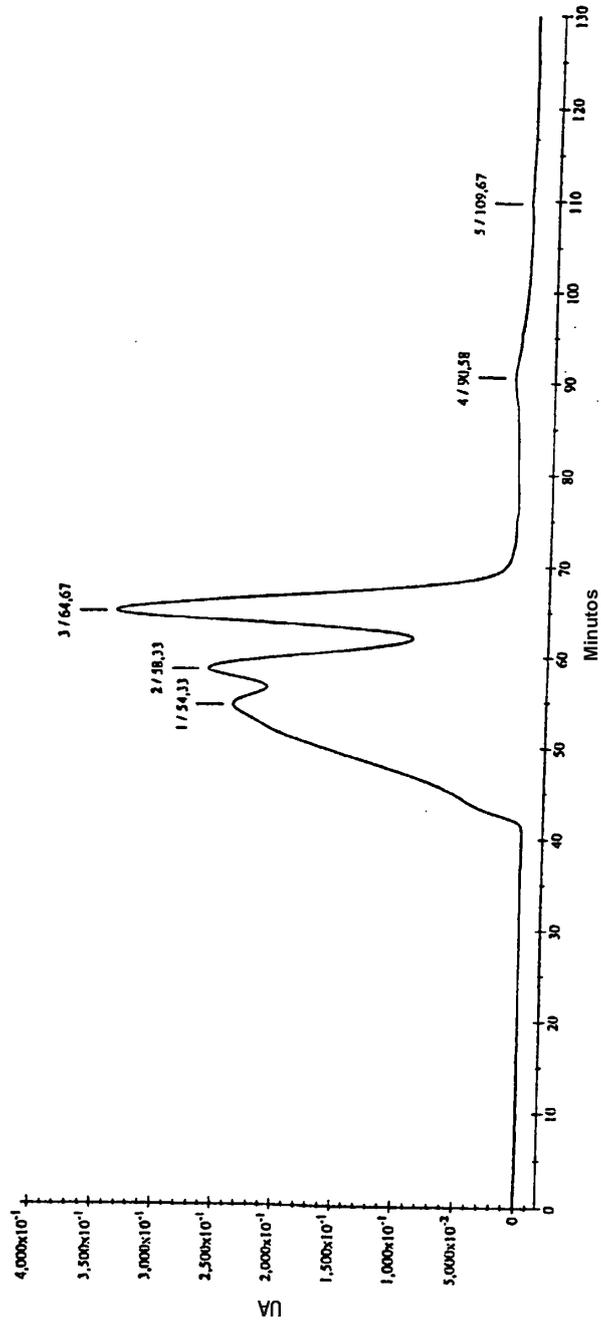


Fig. 5a: Análisis de GPC de la cinética de reacción del acoplamiento V de ox-HES 10 kD a HSA después de 2 h

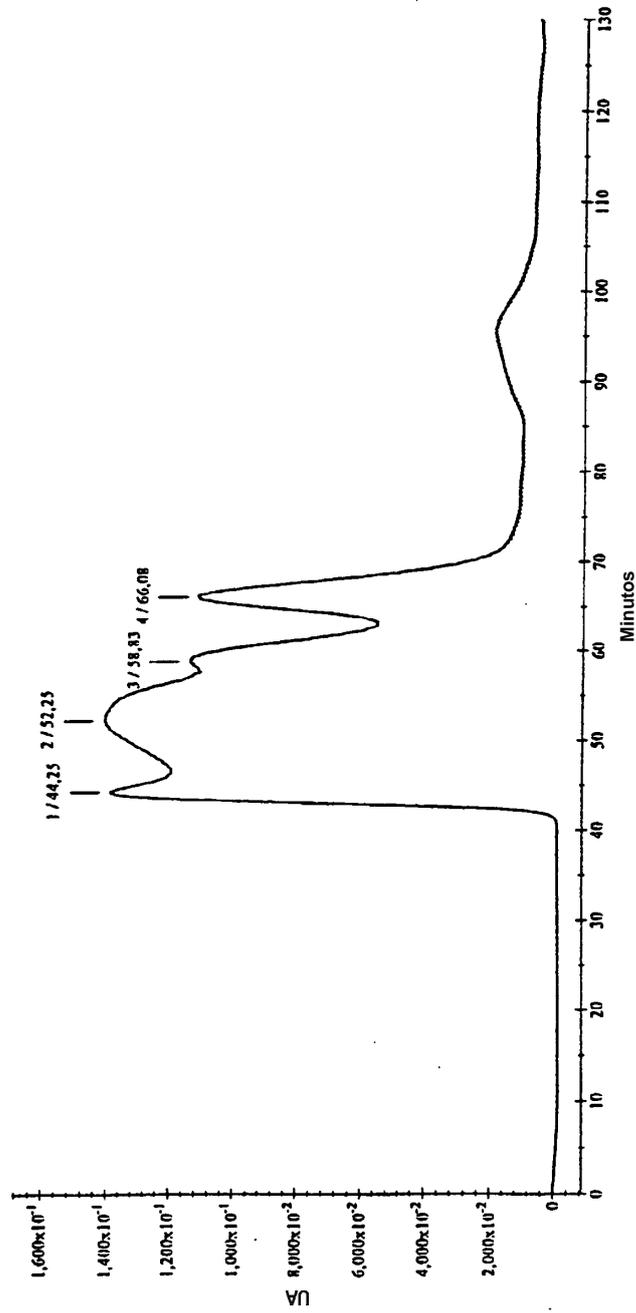


Fig. 5b: Análisis de GPC de la cinética de reacción del acoplamiento V de ox-HES 10 kD a HSA después de 16 h

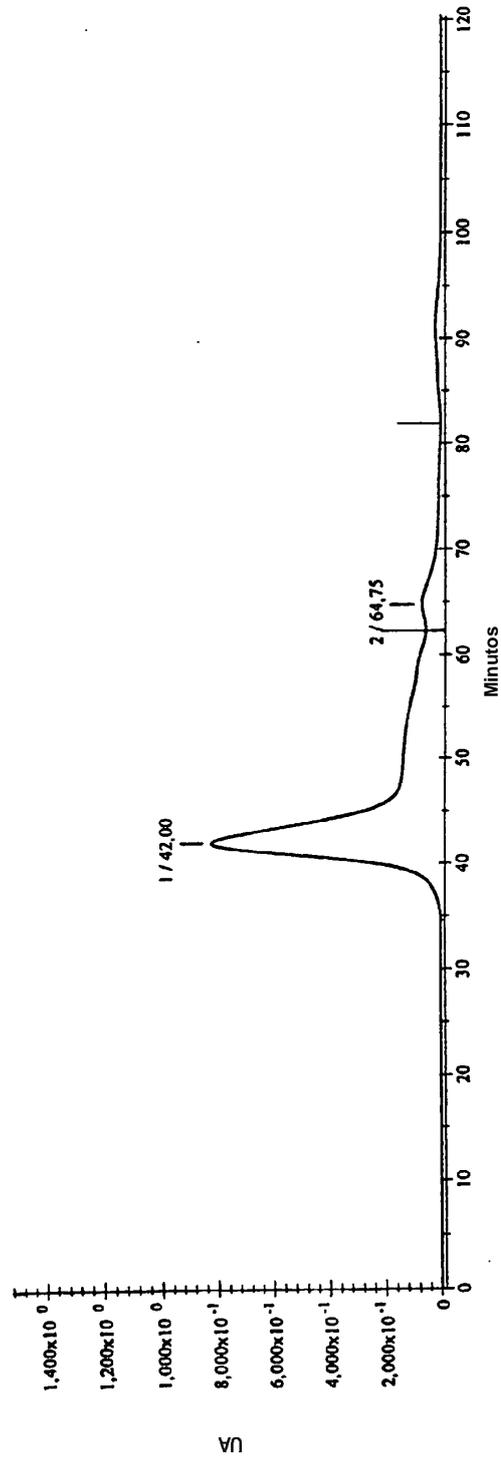


Fig. 6: Analítica de GPC de la mezcla de reacción después de 24 h de incubación del acoplamiento VII de ox-HES 130 kD a HSA

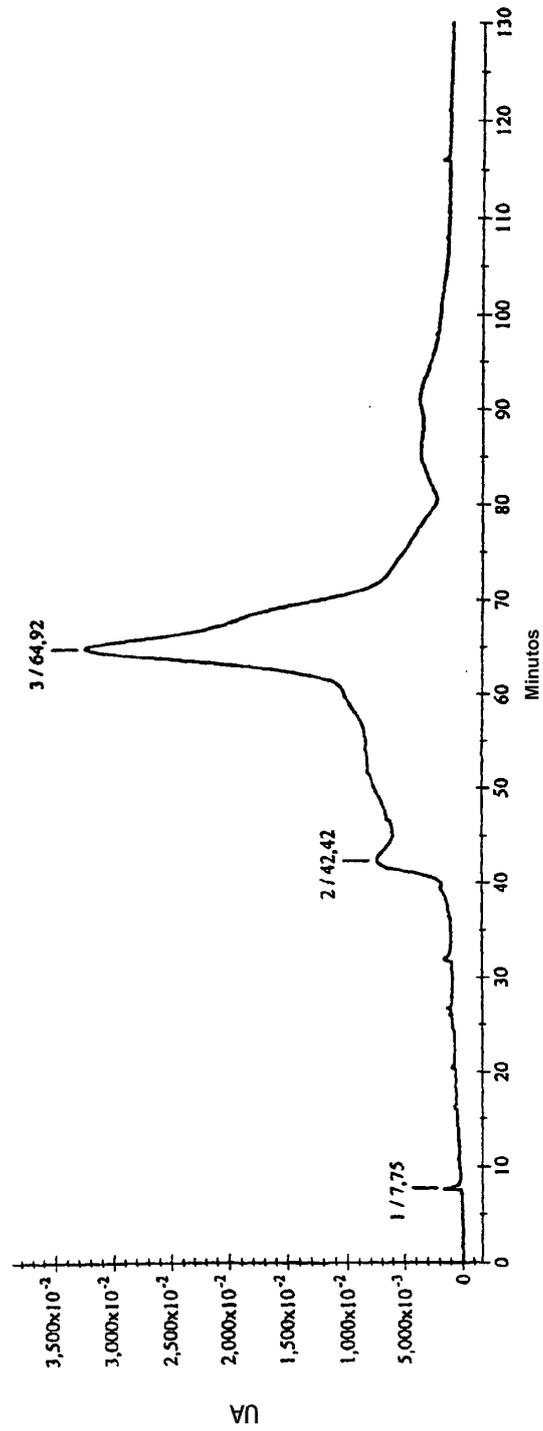
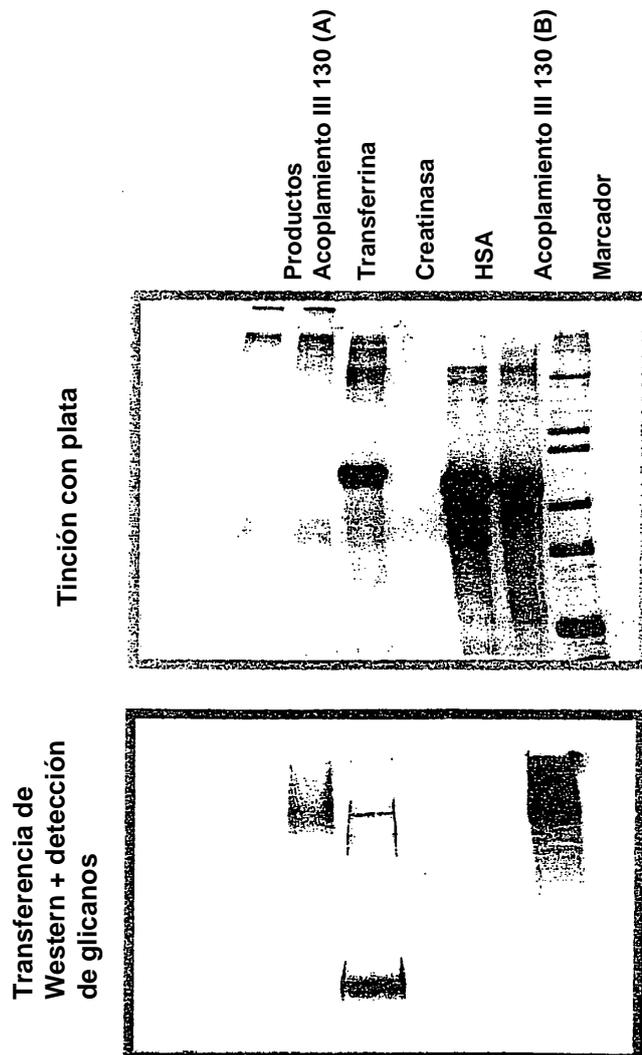
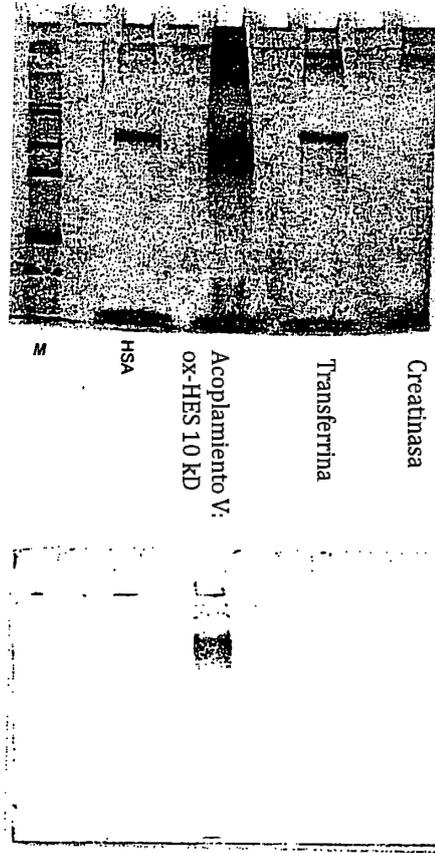


Fig. 7: Cromatograma de GPC del acoplamiento V de HES 130 kD a HSA y reducción con borohidruro



**Fig. 8:** Fotografía superior: SDS-PAGE de las reacciones de acoplamiento III (procedimientos A y B) entre HSA y ox-HES 130 kD y HES 130 kD, respectivamente, con tinción con plata (carril 1: acoplamiento III, procedimiento A); carril 2: transferrina; carril 3: creatinasa; carril 4: HSA sin modificar; carril 5: acoplamiento III (procedimiento B); carril 6: marcador.

Fotografía inferior: transferencia Western con detección de glicanos de las mismas muestras, haciendo la transferrina (carril 2) de control positivo y la creatinasa (carril 3), así como el HSA (carril 4), de control negativo.



**Fig. 9:** SDS-PAGE, teñido con plata, 12 % de PAA (arriba) y transferencia Western/glicano (abajo) de la mezcla de reacción del acoplamiento V de ox-HES 10 kD con HSA



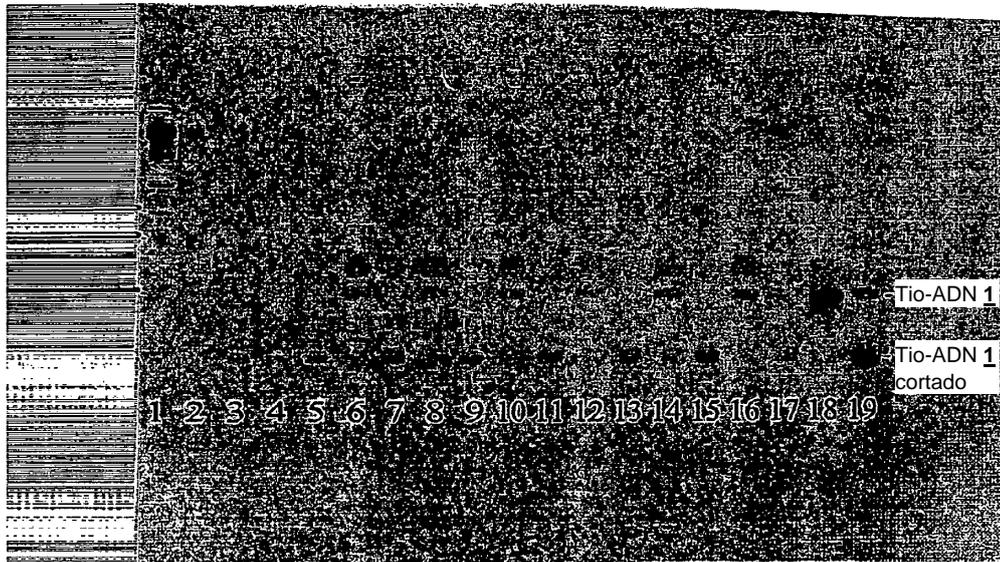


Fig. 11