

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 323**

51 Int. Cl.:
C08B 31/12 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08861560 .4**
96 Fecha de presentación: **15.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2231710**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **Método para producir un derivado de hidroxialquilalmidón con dos conectores**

30 Prioridad:
14.12.2007 EP 07024351

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2012

73 Titular/es:
FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH
(100.0%)
ELSE-KRÖNER-STRASSE 1
61352 BAD HOMBURG, DE

72 Inventor/es:
HACKET, FRANK;
EICHNER, WOLFRAM;
KNOLLER, HELMUT;
MITSCH, ANDREAS;
SCHIMMEL, MARTIN;
ZANDER, NORBERT y
HAUSCHILD, FRANZISKA

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

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).

ES 2 389 323 T3

DESCRIPCIÓN

Método para producir un derivado de hidroxialquilalmidón con dos conectores.

La invención se refiere a un método de producción de un derivado de hidroxialquilalmidón (HAS), que comprende a) hacer reaccionar hidroxialquilalmidón opcionalmente oxidado con un compuesto (D) que comprende al menos dos grupos funcionales -O-NH₂ o una sal del mismo, y b) hacer reaccionar el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) con un compuesto (L) que comprende al menos dos grupos funcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo cetona y un grupo cetona adecuadamente protegido. En particular, el compuesto (L) comprende al menos dos grupos funcionales W₁ y W₂ seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo hemiacetal, -CH(OH)₂, un grupo acetal o un grupo cetona. En el caso de que cualquier W₁ o W₂ o W₁ y W₂ sea un grupo cetona -C(O)-R, R se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido. Adicionalmente, la presente invención se refiere a derivados de hidroxialquilalmidón, en particular derivados de hidroxietilalmidón, que pueden obtenerse y/o se obtienen mediante dicho método, y al uso de los mismos. Además, la presente invención se refiere a derivados de hidroxialquilalmidón específicos, en particular derivados de hidroxietilalmidón como tales.

El hidroxialquilalmidón (HAS), en particular hidroxietilalmidón (HES), es un derivado sustituido del polímero de hidratos de carbono que se produce de manera natural amilopectina, que está presente en el almidón de maíz a una concentración de hasta el 95% en peso, y se degrada mediante la alfa-amilasa en el cuerpo. HES, en particular, presenta propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de reemplazo del volumen sanguíneo y en terapia de hemodilución en la práctica clínica (Sommermeyer *et al.*, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278; Weidler *et al.*, 1991, *Arzheimittelforschung/Drug Res.*, 41, 494-498).

Se describen en la técnica algunos modos de producción de un derivado de hidroxietilalmidón.

El documento DE 26 16 086 da a conocer la conjugación de hemoglobina con hidroxietilalmidón en la que, en una primera etapa, un agente de reticulación, por ejemplo bromociano, se une a hidroxietilalmidón y posteriormente se une a hemoglobina al producto intermedio.

Un campo importante en el que se usa HES es la estabilización de polipéptidos que se aplican, por ejemplo, al sistema circulatorio con el fin de obtener un efecto fisiológico particular. Un ejemplo específico de estos polipéptidos es la eritropoyetina, una glicoproteína ácida de aproximadamente 34.000 kDa que es esencial en la regulación del nivel de glóbulos rojos en la circulación.

Un problema bien conocido con la aplicación de polipéptidos y enzimas es que estas proteínas presentan a menudo una estabilidad no satisfactoria. Especialmente, la eritropoyetina tiene una semivida plasmática relativamente corta (Spivak y Hogans, 1989, *Blood* 73, 90; McMahon *et al.*, 1990, *Blood* 76, 1718). Esto significa que los niveles plasmáticos terapéuticos se pierden rápidamente y deben llevarse a cabo administraciones intravenosas repetidas. Además, en ciertas circunstancias, se observa una respuesta inmunitaria contra los péptidos.

Se acepta generalmente que la estabilidad de los polipéptidos puede mejorarse y que la respuesta inmunitaria contra estos polipéptidos se reduce cuando los polipéptidos se acoplan a moléculas poliméricas.

El documento WO 94/28024 da a conocer que polipéptidos fisiológicamente activos modificados con polietilenglicol (PEG) presentan una inmunogenicidad y antigenicidad reducida y circulan en el torrente sanguíneo considerablemente durante más tiempo que proteínas no conjugadas, es decir, tienen una tasa de aclaramiento más larga. Sin embargo, los conjugados de PEG-fármaco presentan varias desventajas, por ejemplo no presentan una estructura natural que pueda ser reconocida por elementos de rutas de degradación *in vivo*. Por tanto, aparte de conjugados de PEG, se han producido otros conjugados y polimerizados de proteínas.

El documento WO 02/080979 da a conocer compuestos que comprenden un conjugado de un agente activo y un hidroxialquilalmidón en el que el agente activo y el hidroxialquilalmidón están unidos o bien directamente o bien mediante un compuesto conector. En lo que se refiere al enlace directo, la reacción del agente activo y el hidroxialquilalmidón se lleva a cabo en un medio acuoso que comprende al menos el 10% en peso de agua. No se proporcionan ejemplos que se refieran a un derivado de hidroxialquilalmidón que se une a un grupo carbonilo comprendido en el reactivo activo, ni un grupo aldehído o cetona ni un grupo acetal o hemiacetal.

El documento WO 03/074087 da a conocer conjugados de hidroxialquilalmidón-proteína en los que la unión entre la molécula de hidroxialquilalmidón y la proteína es covalente y es el resultado de un acoplamiento de un aldehído terminal o un grupo funcional que resultaba de la reacción del grupo aldehído con un grupo funcional de una proteína.

El documento WO 03/074088 da a conocer conjugados de hidroxialquilalmidón con un compuesto de bajo peso molecular en el que la unión entre el hidroxialquilalmidón y el compuesto de bajo peso molecular es covalente y es el resultado de un acoplamiento de un aldehído terminal o un grupo funcional que resultaba de la reacción del grupo

aldehído con un grupo funcional del compuesto de bajo peso molecular.

5 El documento WO 2005/014024 da a conocer polímeros funcionalizados mediante un grupo aminoóxido o un derivado del mismo, conjugados, en el que los polímeros funcionalizados están acoplados covalentemente con una proteína mediante un grupo de unión de oxima, un procedimiento para preparar los polímeros funcionalizados, un procedimiento para preparar los conjugados, polímeros funcionalizados tal como pueden obtenerse mediante el procedimiento de la presente invención, conjugados tal como pueden obtenerse mediante el procedimiento y composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un conjugado y el uso de dichos conjugados y composición para la profilaxis o terapia del cuerpo humano o animal.

10 El documento WO 2005/092390 da a conocer conjugados de hidroxialquilalmidón y una proteína en la que se forman estos conjugados mediante un enlace covalente entre el hidroxialquilalmidón o un derivado del hidroxialquilalmidón y la proteína y un método de producción de estos conjugados y el uso de estos conjugados.

15 El documento WO 2004/024777 da a conocer derivados de hidroxialquilalmidón, particularmente derivados de hidroxialquilalmidón que pueden obtenerse mediante un procedimiento en el que se hace reaccionar hidroxialquilalmidón con un grupo amino primario o secundario de un compuesto conector. Según una realización especialmente preferida, el documento WO 2004/024777 da a conocer derivados de hidroxialquilalmidón que pueden obtenerse mediante un procedimiento según el cual se hace reaccionar hidroxialquilalmidón con un grupo amino primario o secundario de un compuesto conector y el producto de reacción resultante se hace reaccionar con un polipéptido, preferiblemente con una glicoproteína y de manera especialmente preferible con eritropoyetina, mediante al menos otro grupo reactivo del compuesto conector. Un hidroxialquilalmidón que se prefiere especialmente es hidroxietilalmidón. Según el documento WO 2004/024777, el hidroxialquilalmidón y preferiblemente el hidroxietilalmidón se hace reaccionar con el compuesto conector en su extremo reductor que no se oxida antes de la reacción.

25 El compuesto WO 2004/024776 da a conocer derivados de hidroxialquilalmidón, particularmente derivados de hidroxialquilalmidón que pueden obtenerse mediante un procedimiento en el que se hace reaccionar hidroxialquilalmidón con un grupo amino primario o secundario de un compuesto de reticulación o con dos compuestos de reticulación en el que el derivado de hidroxialquilalmidón resultante tiene al menos un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con un grupo funcional Y de un compuesto adicional y en el que este grupo Y es un grupo aldehído, un grupo ceto, un grupo hemiacetal, un grupo acetal o un grupo tio. Según una realización especialmente preferida, el documento WO 2004/024776 se refiere a derivados de hidroxialquilalmidón que pueden obtenerse mediante un procedimiento según el cual se hace reaccionar hidroxialquilalmidón con un grupo amino primario o secundario de un compuesto de reticulación, haciéndose reaccionar adicionalmente el producto de reacción resultante con un segundo compuesto de reticulación, en el que el derivado de hidroxialquilalmidón resultante tiene al menos un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con un grupo funcional Y de un compuesto adicional y en el que este grupo Y es un grupo aldehído, un grupo ceto, un grupo hemiacetal, un grupo acetal o un grupo tio, y el producto de reacción resultante se hace reaccionar con un polipéptido, preferiblemente con un polipéptido tal como AT III, IFN-beta o eritropoyetina y de manera especialmente preferible con eritropoyetina, que comprende al menos uno de estos grupos funcionales Y. Un hidroxialquilalmidón que se prefiere especialmente es hidroxietilalmidón. Según el documento WO 2004/024776, el hidroxialquilalmidón y preferiblemente el hidroxietilalmidón se hace reaccionar con el compuesto conector en su extremo reductor que opcionalmente se oxida antes de la reacción. El documento WO 2004/024776 no dice nada sobre un procedimiento en el que un derivado de HAS, preparado haciendo reaccionar HAS con un primer compuesto conector, se hace reaccionar con un segundo compuesto conector mediante la reacción de un grupo funcional -O-NH₂ del derivado de HAS y un grupo funcional del segundo compuesto conector en el que se obtiene un enlace oxima.

45 También el documento DE 30 29 307 A1, que se refiere a un procedimiento en el que se une hemoglobina a un polisacárido mediante un espaciador, no dice nada sobre un procedimiento en el que se hace reaccionar un derivado de HAS, preparado haciendo reaccionar HAS con un primer compuesto conector, con un segundo compuesto conector mediante la reacción de un grupo funcional -O-NH₂ del derivado de HAS y un grupo funcional del segundo compuesto conector en el que se obtiene un enlace oxima.

50 El documento WO 2005/092928 da a conocer conjugados de hidroxialquilalmidón, preferiblemente hidroxietilalmidón, y una proteína, en el que estos conjugados se forman mediante una reacción de aminación reductora entre al menos un grupo aldehído del hidroxialquilalmidón o de un derivado del hidroxialquilalmidón y al menos un grupo amino de la proteína, de modo que el hidroxialquilalmidón o el derivado del mismo se une covalentemente a la proteína mediante un enlace azometina o un enlace aminometileno. El documento WO 2005/092928 también se refiere a un método de producción de estos conjugados y a usos específicos de los conjugados.

55 El documento US 2006/0194940 A1 da a conocer alcanales de polímero solubles en agua. Entre otros, se dan a conocer reactivos de aldehído protegidos que se hacen reaccionar con un polímero. Aunque se mencionan genéricamente poli(sacáridos), polímeros especialmente preferidos son polietilenglicoles. No se dan a conocer almidones o, en particular, almidones modificados tales como hidroxialquilalmidones en el documento US 2006/0194940 A1. En consecuencia, el documento US 2006/0194940 A1 no contiene ninguna descripción referente a modos específicos de acoplamiento de un compuesto conector dado con hidroxialquilalmidón. Lo mismo se aplica

60

a los documentos US 7.157.546 B2, EP 1591 467 A1 y WO 2004/022630 A2.

5 El documento US 6.916.962 B2 da a conocer un compuesto de reticulación de aminoacetal en forma protegida y no protegida. No está contenida en este documento ninguna descripción referente a un posible acoplamiento de este compuesto de reticulación con polímeros distintos de polietilenglicoles. En particular, no se dan a conocer almidones, menos aún almidones modificados tales como hidroxialquilalmidones en el documento US 6.916.962 B2. En consecuencia, el documento US 6.916.962 B2 no contiene descripciones referentes a modos específicos de acoplamiento de un compuesto conector dado a hidroxialquilalmidón. Lo mismo se aplica a los documentos US 6.956.135 B2 y WO 03/049699 A2.

10 El documento US 3.990,237 da a conocer estructuras que contienen un grupo aldehído protegido. Se acoplan preferiblemente compuestos que comprenden estas estructuras con polietilenglicol, y el acoplamiento se lleva a cabo mediante un haluro como grupo funcional comprendido en los compuestos que contienen un grupo aldehído protegido, grupo haluro que reacciona con un grupo hidroxilo del polietilenglicol.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método novedoso para obtener derivados de hidroxialquilalmidón.

15 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método novedoso para obtener derivados de hidroxialquilalmidón que permiten condiciones de reacción preferidas de un derivado de hidroxialquilalmidón dado con el grupo amino de un principio biológicamente activo.

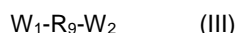
20 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar derivados de hidroxietilalmidón novedosos, en particular derivados de hidroxietilalmidón que, en particular, se caracterizan por una estructura espaciadora novedosa entre el hidroxialquilalmidón, en particular hidroxietilalmidón, y un agente biológico dado, en particular proteínas.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método de producción de un derivado de hidroxialquilalmidón (HAS), que comprende

25 a) hacer reaccionar hidroxialquilalmidón opcionalmente oxidado con un compuesto (D) que comprende al menos dos grupos funcionales -O-NH₂ o una sal del mismo, y

b) hacer reaccionar los derivados de hidroxialquilalmidón obtenidos en la etapa a) con un compuesto (L) que comprende al menos dos grupos funcionales W₁ y W₂ seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo ceto y un grupo ceto adecuadamente protegido,

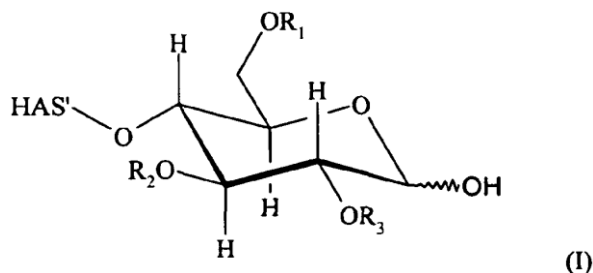
30 en el que el compuesto (L) usado en la etapa b) tiene la estructura según la fórmula (III)



35 en la que R₉ se selecciona de un enlace químico, preferiblemente un enlace sencillo, un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido.

1. Hidroxialquilalmidón

40 En el contexto de la presente invención, el término "hidroxialquilalmidón" (HAS) se refiere a un derivado de almidón que se ha sustituido con al menos un grupo hidroxialquilo. Un hidroxialquilalmidón preferido de la presente invención tiene una constitución según la fórmula (I')



en la que HAS' es el resto de la molécula de hidroxialquilalmidón y R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno, un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado o el grupo



en el que R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo, preferiblemente hidrógeno y grupo metilo

m es de 2 a 4, en el que los residuos R¹ y R² pueden ser iguales o diferentes en los m grupos CR¹R²;

5 n es de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 4;

o es de 2 a 20, preferiblemente de 2 a 4, en el que los residuos R³ y R⁴ pueden ser iguales o diferentes en los o grupos CR³R⁴.

Preferiblemente, R₁, R₂ y R₃ son independientemente un grupo -(CH₂CH₂O)_n-H, en el que n es un número entero, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, y en particular, R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno o 2-hidroxietilo.

10 En la fórmula (I), el extremo reductor de la molécula de almidón se muestra en la forma no oxidada y la unidad de sacárido terminal de HAS se muestra en la forma de hemiacetal que, dependiendo de por ejemplo el disolvente, puede estar en equilibrio con la forma de aldehído (libre). La abreviatura HAS' tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a la molécula de HAS sin la unidad de sacárido terminal en el extremo reductor de la molécula de HAS. Esto quiere decirse mediante el término "resto de la molécula de hidroxialquilalmidón" tal como se
15 usa en el contexto de la presente invención.

El término "hidroxialquilalmidón" tal como se usa en la presente invención no se limita a compuestos en los que el resto de hidrato de carbono terminal comprende grupos hidroxialquilo R₁, R₂ y/o R₃ tal como se representa, por motivos de brevedad, en la fórmula (I), pero también se refiere a compuestos en los que al menos un grupo hidroxilo que está presente en cualquier lugar, o bien en el resto de hidrato de carbono terminal y/o bien en el resto de la molécula de hidroxialquilalmidón, HAS', se sustituye por un grupo hidroxialquilo R₁, R₂ y/o R₃.
20

También es posible hidroxialquilalmidón que comprende dos o más grupos hidroxialquilo diferentes.

El al menos un grupo hidroxialquilo comprendido en HAS puede contener uno o más, en particular dos o más grupos hidroxilo. Según una realización preferida, el al menos un grupo hidroxialquilo comprendido en HAS contiene un grupo hidroxilo.

25 La expresión "hidroxialquilalmidón" también incluye derivados en los que 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. Además, el grupo hidroxilo de un grupo hidroxialquilo puede esterificarse o eterificarse.

Además, en lugar de alquilo, también pueden usarse grupos alqueno lineales o ramificados sustituidos o no sustituidos.

30 El hidroxialquilalmidón es un derivado de éter del almidón. Además de dichos derivados de éter, también pueden usarse otros derivados del almidón en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, son útiles derivados que comprenden grupos hidroxilo esterificados. Estos derivados pueden ser por ejemplo derivados de ácido mono- o dicarboxílicos no sustituidos con 2-12 átomos de carbono o de derivados sustituidos de los mismos. Especialmente
35 útiles son derivados de ácidos monocarboxílicos no sustituidos con 2-6 átomos de carbono, especialmente derivados de ácido acético. En este contexto, se prefieren acetilalmidón, butirilalmidón y propionilalmidón.

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

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

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

Se conocen en la técnica técnicas para la esterificación de almidón (véase por ejemplo Klemm D. *et al*, Comprehensive Cellulose Chemistry vol. 2, 1998, Wiley-VCH, Weinheim, Nueva York, especialmente el capítulo 4.4, Esterificación de celulosa (ISBN 3-527-29489-9).

45 Según una realización preferida de la presente invención, se emplea hidroxialquilalmidón según la fórmula (I) mencionada anteriormente. Las otras estructuras de anillo de sacárido comprendidas en HAS' pueden ser las mismas que o diferentes del anillo de sacárido descrito explícitamente, con la diferencia de que carecen de un extremo reductor.

50 En lo que se refiere a los residuos R₁, R₂ y R₃ según la fórmula (I), no hay ninguna limitación específica. Según una realización preferida, R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, un grupo hidroxialaralquilo o un grupo hidroxialcarilo que tiene de desde 2 hasta 10 átomos de carbono en el residuo de alquilo

5 respectivo. Se prefieren hidrógeno y grupos hidroxialquilo que tienen de desde 2 hasta 10 átomos de carbono. Más preferiblemente, el grupo hidroxialquilo tiene desde 2 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente desde 2 hasta 4 átomos de carbono e incluso más preferiblemente desde 2 hasta 3 átomos de carbono. En una realización preferida, el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón en el que R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno o un grupo (CH₂CH₂O)_n-H, en el que n es un número entero, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

“Hidroxialquilalmidón” comprende por tanto preferiblemente hidroxietilalmidón, hidroxipropilalmidón e hidroxibutilalmidón, prefiriéndose particularmente hidroxietilalmidón e hidroxipropilalmidón y siendo hidroxietilalmidón el más preferido.

El grupo alquilo, aralquilo y/o alcarilo puede ser lineal o ramificado y estar adecuadamente sustituido.

10 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y a un derivado de HAS tal como se describió anteriormente en el que R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado con desde 2 hasta 6 átomos de carbono.

15 Por tanto, R₁, R₂ y R₃ pueden ser preferiblemente H, hidroxihexilo, hidroxipentilo, hidroxibutilo, hidroxipropilo tal como 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 1-hidroxisopropilo, hidroxietilo tal como 2-hidroxietilo, hidrógeno y prefiriéndose especialmente el grupo 2-hidroxietilo.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y a un derivado de HAS tal como se describió anteriormente en el que R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo, prefiriéndose especialmente una realización en la que al menos un residuo R₁, R₂ y R₃ es 2-hidroxietilo.

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

20 Por tanto, la presente invención se refiere al método y a un derivado de HAS tal como se describió anteriormente, en el que el polímero es hidroxietilalmidón y el derivado es un derivado de hidroxietilalmidón (HES).

HAS, en particular HES, se caracteriza principalmente por la distribución de peso molecular, el grado de sustitución y la razón de sustitución C₂ : C₆. Hay dos posibilidades de descripción del grado de sustitución:

25 El grado de sustitución (DS) de HAS se describe en relación con la parte de monómeros de glucosa sustituidos con respecto a todos los restos de glucosa.

El patrón de sustitución de HAS también puede describirse como la sustitución molar (MS), en la que se cuenta el número de grupos hidroxietilo por resto de glucosa.

30 En el contexto de la presente invención, el patrón de sustitución de HAS, preferiblemente HES, se denomina MS, tal como se describió anteriormente (véase también Sommermeyer *et al.*, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278, en particular p. 273).

Se determina el MS mediante cromatografía de gases tras la hidrólisis total de la molécula de HES. Se facilitan valores de MS de HAS respectivos, en particular material de partida de HES. Se supone que el valor de MS no se ve afectado durante el procedimiento de derivatización en las etapas a) y b) del procedimiento de la invención.

35 Están presentes disoluciones de HAS y en particular HES como composiciones polidispersas, en las que cada molécula difiere de la otra con respecto al grado de polimerización, el número y patrón de los sitios de ramificación y el patrón de sustitución. Por tanto, HAS y en particular HES es una mezcla de compuestos con diferente peso molecular. En consecuencia, una disolución de HAS particular y en particular HES se determina mediante el peso molecular promedio con la ayuda de medios estadísticos. En este contexto, M_n se calcula como la media aritmética dependiendo del número de moléculas. Alternativamente, M_w (o MW), el peso molecular promedio en peso, representa una unidad que depende de la masa del HAS, en particular HES.

En este contexto, el peso molecular promedio en número se define mediante la ecuación 1:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i \cdot M_i}{\sum_i n_i}$$

en la que n_i es el número de moléculas de la especie i de masa molar M_i.

\bar{M}_n indica que el valor es un promedio, aunque la línea se omite normalmente por convención.

45 M_w es el peso molecular promedio en peso, definido mediante la ecuación 2:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i n_i \cdot M_i^2}{\sum_i n_i M_i}$$

en la que n_i es el número de moléculas de la especie i de masa molar M_i .

\bar{M}_w indica que el valor es un promedio, aunque la línea se omite normalmente por convención.

5 Preferiblemente, el hidroxialquilalmidón, en particular el hidroxietilalmidón, usado en la invención tiene un peso molecular medio (media en peso) de desde 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa. El hidroxietilalmidón puede presentar además una sustitución molar preferida de desde 0,1 hasta 3, preferiblemente de 0,1 a 2, más preferido de 0,1 a 0,9 o de 0,4 a 2, preferiblemente de 0,4 a 1,3, y una razón preferida entre sustitución $C_2 : C_6$ en el intervalo de desde 2 hasta 20 con respecto a los grupos hidroxietilo.

15 El término "peso molecular medio" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere al peso tal como se determina según el método LALLS-(dispersión de luz láser de ángulo bajo ("low angle laser light scattering"))-GPC tal como se describe en Sommermeyer *et al.*, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278; y Weidler *et al.*, 1991, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.*, 41, 494-498. Para pesos moleculares medios de 10 kDa y más pequeños, adicionalmente, la calibración se llevó a cabo con un patrón que se había calificado previamente mediante LALLS-GPC.

20 Según una realización preferida de la presente invención, el peso molecular medio del hidroxietilalmidón empleado es de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa.

25 Además, la sustitución molar de HAS y en particular HES es preferiblemente de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 3, preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3.

30 Un ejemplo de HES que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5 a 300 kDa, preferiblemente de 50 a 150 kDa es un HES con una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1, 1,1, 1,2 ó 1,3.

En lo que se refiere a la razón de sustitución $C_2 : C_6$, dicha sustitución está preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12.

II. Etapa a)

35 En la etapa a) del método de la invención, se hace reaccionar HAS opcionalmente oxidado con un compuesto (D) que comprende al menos dos grupos funcionales -O-NH₂ o una sal del mismo.

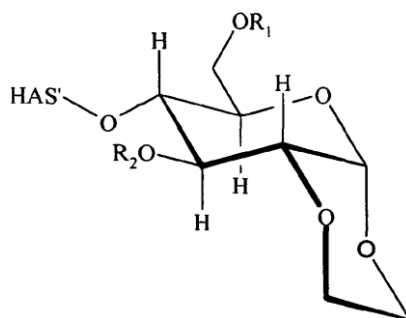
En una realización preferida, HAS no se oxida antes de la reacción con el compuesto (D). En una realización particular preferida, HAS se hace reaccionar con compuestos D) en el al menos un extremo reductor de HAS que no se oxida antes de la reacción con compuestos (D).

40 La expresión "el HAS se hace reaccionar en el al menos un extremo reductor" tal como se usa en el contexto de la presente invención puede referirse a un procedimiento según el cual el HAS se hace reaccionar predominantemente mediante su extremo reductor.

45 Este término "predominantemente mediante su extremo reductor" se refiere a procedimientos según los cuales estadísticamente más del 50%, preferiblemente al menos el 55%, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 65%, más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y todavía más preferiblemente al menos el 95% tal como el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de las moléculas de HAS empleadas para una reacción dada se hacen reaccionar mediante al menos un extremo reductor por molécula de HAS, en el que una molécula de HAS dada que se hace reaccionar mediante al menos un extremo reductor puede hacerse reaccionar en la misma reacción dada mediante al menos un grupo funcional adecuado adicional que

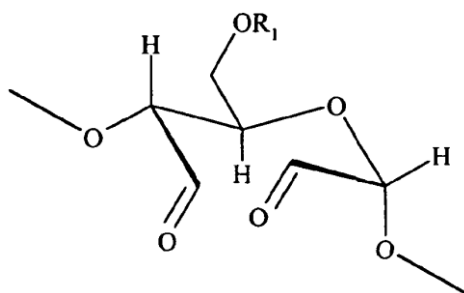
está comprendido en dicha molécula de polímero y que no es un extremo reductor. Si una o más moléculas de HAS se hace(n) reaccionar mediante al menos un extremo reductor y simultáneamente mediante al menos un grupo funcional adecuado adicional que está comprendido en esta(s) molécula(s) de HAS y que no es un extremo reductor, de manera estadística preferiblemente más del 50%, preferiblemente al menos el 55%, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 65%, más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y todavía más preferiblemente al menos el 95% tal como el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de de todos los grupos funcionales reaccionados de estas moléculas de HAS, incluyendo dichos grupos funcionales los extremos reductores, son extremos reductores.

- 5
- 10 El término "extremo reductor" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere al grupo terminal aldehído de una molécula de HAS que puede estar presente como grupo aldehído y/o como forma de hemiacetal correspondiente y/o como grupo acetal, teniendo el grupo acetal la siguiente estructura



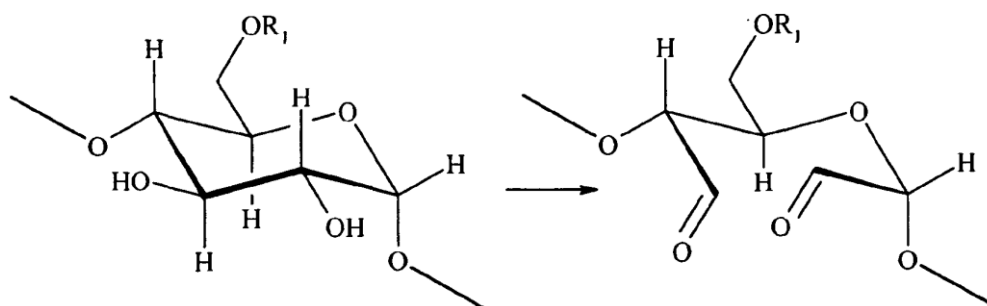
que puede estar presente si el residuo $-OR_3$ según la fórmula (I) anterior es $-O-CH-CH_2-OH$.

- 15 Si HAS se oxida antes de la reacción con el compuesto (D), la reacción puede llevarse a cabo, en una realización, de modo que se introducen al menos dos grupos aldehído en HAS según la siguiente fórmula



Según esta realización de la presente invención, cada agente de oxidación o combinación de agentes de oxidación que puede emplearse puede 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 mediante 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:

- 20

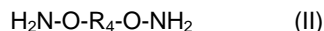


- 25 Agentes oxidantes adecuados son, entre otros, peryodatos tales como peryodatos de metales alcalinos o mezclas de dos o más de los mismos, prefiriéndose peryodato de sodio y peryodato de potasio.

En una realización preferida, el compuesto (D) o una sal del mismo se hace reaccionar mediante al menos uno de los al menos dos grupos funcionales $-O-NH_2$ con un aldehído y/o grupo hemiacetal y/o grupo acetal del hidroxialquilalmidón en la etapa a), en particular el compuesto (D) o una sal del mismo se hace reaccionar mediante al menos uno de los al menos dos grupos funcionales $-O-NH_2$ con el al menos un extremo reductor del

hidroxialquilalmidón y en la que el hidroxialquilalmidón no se oxida antes de la reacción en la etapa a).

En una realización preferida, el compuesto (D) usado en la etapa a) tiene la estructura según la fórmula (II)



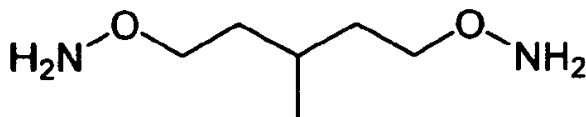
5 o una sal del mismo en el que R_4 se selecciona de un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido. Una sal del compuesto D) es preferiblemente un compuesto D) en el que los grupos funcionales $-\text{O-NH}_2$ se protonan e independientemente entre sí grupos $-\text{O-NH}_3^+$ con un anión farmacéuticamente aceptable, tal como cloruro, hidrogenosulfato, sulfato, carbonato, hidrogenocarbonato, citrato, fosfato y/o hidrogenofosfato.

15 En una realización preferida, en la que R_4 se selecciona de un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, y no contiene heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido, R_4 puede estar sustituido con de 1 a 4, preferiblemente con 1 sustituyente, seleccionado del grupo que consiste en alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, tal como metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo y t-butilo, halógeno, tal como cloruro y bromuro, hidroxilo y tiol.

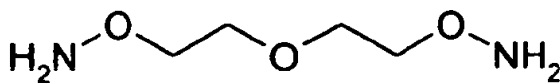
20 En una realización preferida, R_4 en el compuesto (D) de fórmula (II) se selecciona del grupo que consiste en alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{12}$, arileno $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y $-\text{[(CR}_5\text{R}_6)_m\text{O]}_n\text{[CR}_7\text{R}_8\text{]}_o^-$, en el que R_5 , R_6 , R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo, m es de 2 a 4; n es de 0 a 20; y o es de 0 a 20, en el que en el caso de que n sea 0, o no es 0.

25 Preferiblemente, R_4 en el compuesto (D) de fórmula (II) es $-\text{[(CR}_5\text{R}_6)_m\text{O]}_n\text{[CR}_7\text{R}_8\text{]}_o^-$, en el que R_5 , R_6 , R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ y arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$, m es 1 ó 2; n es de 1 a 5; y o es 1 ó 2, lo más preferido en el que R_5 , R_6 , R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido, en particular hidrógeno, m es 2, n es 1 y o es 2.

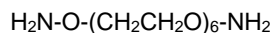
En una realización preferida particular, el compuesto (D) usado en la etapa a) es



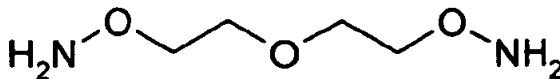
30 y/o



y/o



35 o una sal del mismo, en particular,



o una sal del mismo.

40 La reacción en la etapa a) se realiza preferiblemente porque HAS se disuelve en un medio acuoso, preferiblemente en un tampón de reacción, y se añade el compuesto (D). Tampones de reacción preferidos son, por ejemplo, tampón citrato de sodio, tampón acetato de sodio, tampón fosfato de sodio, tampón carbonato de sodio, tampón borato de sodio, agua. Valores de pH preferidos de los tampones de reacción están en el intervalo de desde 2 hasta 9, más preferiblemente de desde 3 hasta 7, más preferiblemente de desde 4 hasta 6 y lo más preferiblemente de aproximadamente 5.

45 La razón molar de compuesto (D) con respecto a HAS es preferiblemente ≤ 200 , más preferiblemente ≤ 100 basándose en el M_n del derivado de HAS. Razones molares especialmente preferidas de compuesto (D) con

respecto a HAS están en el intervalo de desde 90 hasta 10, más preferiblemente desde 80 hasta 30 e incluso más preferiblemente desde 70 hasta 50.

La mezcla de reacción se agita a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C, más preferido de aproximadamente 10°C a aproximadamente 30°C, preferiblemente a temperatura ambiente.

- 5 La reacción se realiza preferiblemente durante de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 h, más preferido desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 h.

10 El derivado de hidroxialquilalmidón obtenido se aísla preferiblemente de la mezcla de reacción mediante ultrafiltración o diálisis, preferiblemente ultrafiltración seguido por liofilización del derivado de hidroxialquilalmidón aislado. En una realización alternativa, el derivado de hidroxialquilalmidón se precipita de la mezcla de reacción, en particular añadiendo un alcohol, preferiblemente 2-propanol o se separa mediante ultrafiltración y/o liofilización. El precipitado obtenido puede purificarse con etapas convencionales, en particular mediante centrifugación, diálisis, ultrafiltración y/o liofilización.

15 En una realización alternativa, la etapa a) comprende adicionalmente que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido se reduzca antes de la etapa b). En particular, según esta realización, el grupo de enlace oxima -CH=N-O- obtenido de la reacción de o bien el agente reductor, preferiblemente HES, o al menos un grupo aldehído obtenido de la reacción de oxidación de apertura de anillo descrita anteriormente, preferiblemente el agente reductor, con el grupo NH₂-O- del compuesto (D) se reduce al grupo -CH₂-NH-O-. En esta realización, la reducción puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 80°C durante de aproximadamente 5 h a aproximadamente 24 h, tal como durante la noche, en presencia de un agente reductor adecuado, tal como borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, compuestos de complejo de borano orgánico tales como un 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, preferiblemente NaCNBH₃ o NaBH₄.

25 En la realización alternativa descrita anteriormente, el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) se usa directamente en la etapa b) sin ninguna reacción química adicional, preferiblemente sin una reducción.

III. Etapa b)

30 En la etapa b) del método de la invención, el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) se hace reaccionar con un compuesto (L) que comprende al menos dos grupos funcionales W₁ y W₂ seleccionados independientemente de un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo ceto y un grupo ceto adecuadamente protegido.

El término "grupo aldehído" tal como se usa en este contexto de la presente invención también abarca el aldehído hidratado, concretamente -CH(OH)₂, y un grupo hemiacetal correspondiente al grupo aldehído.

35 Como posible "grupo aldehído protegido", pueden mencionarse grupos acetal adecuados a modo de ejemplo. Como posible "grupo ceto protegido", pueden mencionarse grupos cetales adecuados a modo de ejemplo.

Por tanto, según una realización preferida de la presente invención, el compuesto (L) comprende al menos dos grupos funcionales W₁ y W₂ seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo hemiacetal, -CH(OH)₂, un grupo acetal, un grupo ceto y un grupo cetal.

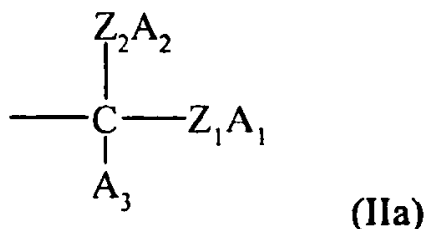
40 Incluso más preferiblemente, el compuesto (L) comprende al menos dos grupos funcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo hemiacetal, -CH(OH)₂, un grupo acetal, y un grupo cetal, y el grupo -C(O)-R, en el que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido.

45 En una realización preferida, en el caso de que el grupo -C(O)-R sea un grupo ceto, el residuo R se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆ y arilo C₆-C₁₄, incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido.

50 En una realización preferida, el compuesto (L) se hace reaccionar mediante al menos uno de los al menos dos grupos funcionales W₁ y W₂ con al menos uno de los grupos funcionales H₂N-O- del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) o una sal del mismo.

En lo que se refiere al grupo acetal o grupo cetal, indicado como "A" a continuación en el presente documento, no existen limitaciones específicas. En el contexto de la presente invención, el término "grupo acetal" también comprende acetales de azufre y acetales de nitrógeno, y el término "grupo cetal" también comprende cetales de azufre y cetales de nitrógeno. Según una realización preferida de la presente invención, el grupo A es un residuo

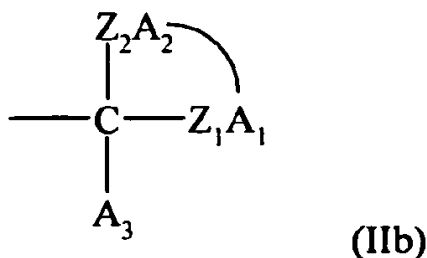
según la fórmula (IIa)



en la que

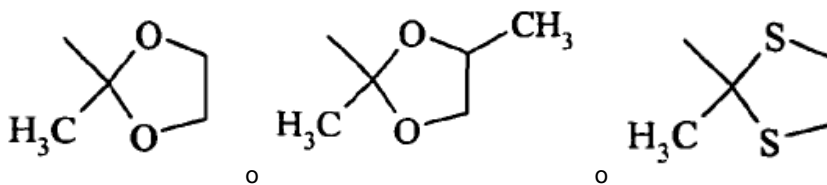
5 Z_1 y Z_2 son cada uno independientemente O o S o NR_x , preferiblemente O, en el que R_x es H o alquilo inferior tal como metilo, etilo, o propilo tal como n-propilo o i-propilo, o $C(O)-R_y$ en el que R_y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y arilo C_6-C_{14} , incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido;

10 A_1 y A_2 son cada uno independientemente metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, bencilo, 1,1,1-tricloroetilo, nitrobencilo, metoxibencilo, etoxibencilo o están formando un anillo según la fórmula (IIb)

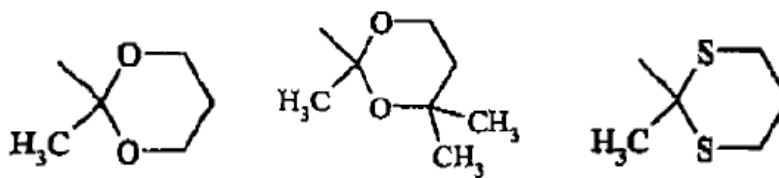


en la que A_1 y A_2 , tomados juntos, son $-(CH_2)_2-$ sustituido de manera opcionalmente adecuada $-(CH_2)_3-$ o sustituido de manera opcionalmente adecuada o $-(CH_2CH(CH_3))-$ sustituido de manera opcionalmente adecuada, y

15 en la que A_3 es H o metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, pentilo, bencilo. Preferiblemente, al menos uno de Z_1 y Z_2 es O, más preferiblemente tanto Z_1 como Z_2 son O. En lo que se refiere al residuo A_3 , se prefieren grupos acetales según la presente invención, es decir, A_3 es preferiblemente H. Si A es un grupo cetal, se prefiere que A_3 sea metilo. Por tanto, grupos cetales A concebibles según la presente invención son, entre otros,



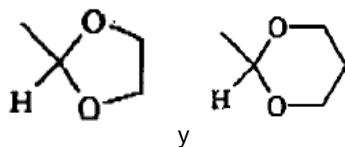
o



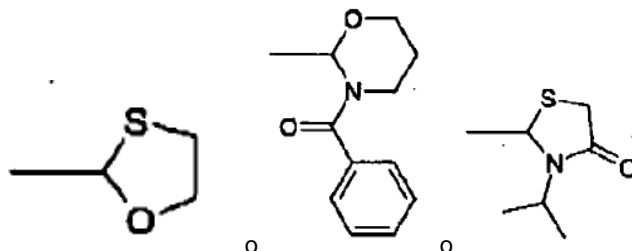
20

Según una realización preferida, A_1 y A_2 son cada uno metilo o etilo, incluso más preferiblemente etilo. Por tanto, un grupo acetal A particularmente preferido según la presente invención es $-CH(OCH_3)_2$ o $-CH(OC_2H_5)_2$, en particular $-CH(OC_2H_5)_2$. Según una realización adicional en la que A_1 y A_2 están formando un anillo según la fórmula (IIb), A_1 y A_2 , tomados juntos, son preferiblemente $-(CH_2)_2-$. En lo que se refiere a esta realización, grupos acetales A particularmente preferidos según la presente invención son

25

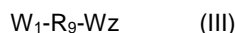


Grupos acetales concebibles adicionales pueden ser, por ejemplo,



5 El compuesto (L) usado en la etapa b) es un compuesto de reticulación bifuncional. Tal compuesto de reticulación bifuncional no contiene, aparte de los dos grupos funcionales W_1 y W_2 seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo ceto y un grupo ceto adecuadamente protegido, ningún grupo funcional adicional. Tales grupos funcionales adicionales pueden ser grupos aldehído y/o ceto protegidos de manera opcionalmente adecuada, pero también otros grupos funcionales tales como grupos amino, grupos tio, grupos carboxilo, grupos hidroxilo, grupos haluro y similares en cada caso protegidos de manera opcionalmente adecuada.

El compuesto (L) usado en la etapa b) tiene la estructura según fórmula (III)



15 en la que R_9 se selecciona de un enlace químico, preferiblemente un enlace sencillo, un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido,

20 cualquiera o ambos grupos W_1 y W_2 , tal como se definió anteriormente, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo ceto y un grupo ceto adecuadamente protegido, preferiblemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo hemiacetal, $-\text{CH}(\text{OH})_2$, un grupo acetal, un grupo ceto y un grupo cetal, e incluso más preferiblemente del grupo que consiste en un grupo hemiacetal, $-\text{CH}(\text{OH})_2$, un grupo acetal y un grupo cetal, y el grupo $-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, en el que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido. Incluso más preferiblemente, el grupo R se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y arilo C_6-C_{14} , incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido.

30 Preferiblemente, R_9 es un arileno sustituido o no sustituido o alquileo sustituido o no sustituido. En particular, R_9 es un arileno C_6-C_{14} no sustituido o $-(\text{CH}_2)_n$, siendo n preferiblemente 1-6, lo más preferiblemente fenileno. Preferiblemente, R_9 no está sustituido. Si R_9 está sustituido, puede estar sustituido con de 1 a 4, preferiblemente con 1 sustituyente, seleccionado del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 , tal como metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo y t-butilo, halógeno, tal como cloro y bromo, hidroxilo y tiol.

35 En una realización preferida, el compuesto (L) usado en la etapa b) se selecciona de benceno que está sustituido en la posición 1,2-, 1,3 ó 1,4 con dos grupos funcionales W_1 y W_2 seleccionados independientemente del grupo que consiste en $-\text{CH}=\text{O}$, grupo hemiacetal, grupo acetal, grupo cetal, $-\text{CH}(\text{OH})_2$ y el grupo $-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, en el que R se selecciona del grupo que consiste en un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido, preferiblemente del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y arilo C_6-C_{14} , incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido.

Según una realización preferida de la presente invención, ambos grupos funcionales W_1 y W_2 del compuesto (L) son $-\text{CH}=\text{O}$.

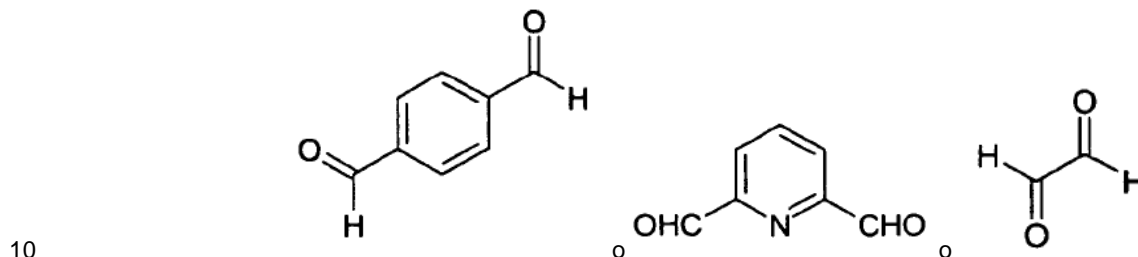
Esta realización de la presente invención se prefiere particularmente si

- o bien el enlace oxima que resulta de la reacción del grupo $-CH=O$ del compuesto (L) con el grupo $-O-NH_2$ del derivado de HAS obtenido según la etapa a)

5 - o bien el enlace oxima que resulta de la reacción del compuesto (D) con el hidroxialquilalmidón, tal como se describió anteriormente, y en enlace oxima que resulta de la reacción del grupo $-CH=O$ del compuesto (L) con el grupo $-O-NH_2$ del derivado de HAS obtenido según la etapa a),

no se reduce(n) antes de la reacción del derivado de HAS obtenido de la etapa b) con un agente biológicamente activo BA tal como se describe a continuación en el presente documento en detalle.

En lo que se refiere a esta realización preferida de la presente invención, compuestos (L) preferidos son, por ejemplo,



Según otra realización preferida de la presente invención, un grupo funcional W_1 o W_2 del compuesto (L) es un grupo aldehído o grupo ceto adecuadamente protegido, preferiblemente un grupo aldehído adecuadamente protegido, siendo preferiblemente el otro grupo funcional un grupo aldehído o grupo ceto no protegido, más preferiblemente un grupo aldehído no protegido.

15 Esta realización de la presente invención se prefiere particularmente si

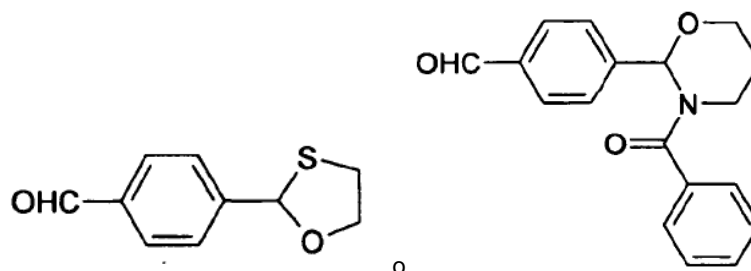
- o bien el enlace oxima que resulta de la reacción del grupo $-CH=O$ del compuesto (L) con el grupo $-O-NH_2$ del derivado de HAS obtenido según la etapa a)

20 - o bien el enlace oxima que resulta de la reacción del compuesto (D) con el hidroxialquilalmidón, tal como se describió anteriormente, y el enlace oxima que resulta de la reacción del grupo $-CH=O$ del compuesto (L) con el grupo $-O-NH_2$ del derivado de HAS obtenido según la etapa a),

25 se reduce(n) antes de la reacción del derivado de HAS obtenido de la etapa b) con un agente biológicamente activo BA tal como se describe a continuación en el presente documento en detalle. En particular, el grupo funcional W_1 o W_2 del compuesto (L) es un grupo aldehído o grupo ceto protegido, preferiblemente un grupo aldehído adecuadamente protegido, que es estable en las condiciones de reacción que se aplican para reducir el/los enlace(s) oxima mencionado(s) anteriormente. Tales condiciones de reacción en las que un grupo protector adecuado debe ser estable son, por ejemplo, condiciones reductoras a un pH en el intervalo de desde 3 hasta 8 en presencia de, por ejemplo, $NaCNBH_3$ como agente reductor. El experto en la técnica conoce grupos protectores adecuados para el grupo funcional W_1 y W_2 y, por tanto, puede elegirlos el experto dependiendo de las condiciones reductoras respectivas que van a aplicarse para la reducción del/de los enlace(s) oxima mencionado(s) anteriormente.

30

En lo que se refiere a esta realización preferida de la presente invención, compuestos (L) concebibles son, por ejemplo,



35 Tal como se describe a continuación en el presente documento, esta realización de la presente invención se elige especialmente si el derivado de HAS obtenido de la reacción del derivado obtenido de la etapa b) con un agente biológicamente activo BA, tal como se describe a continuación en el presente documento en detalle, contiene dos enlaces oxima reducidos, concretamente $-CH_2-NH-O-$ y, preferiblemente, un enlace metilamina, concretamente $-CH_2-NH-$, entre el derivado de HAS obtenido de la etapa b) y BA.

La reacción en la etapa b) se realiza preferiblemente en un disolvente polar, preferiblemente DMF o una mezcla de agua/disolvente polar, preferiblemente agua/DMF con una cantidad de disolvente polar, preferiblemente DMF de $\leq 50\%$ (v:v), más preferido $\leq 30\%$ (v:v).

5 La razón molar de compuesto (L) con respecto a derivado de HAS tal como se obtiene en la etapa a) es preferiblemente ≤ 200 , más preferiblemente ≤ 100 , en particular ≤ 20 , basándose en el M_n del derivado de HAS. Más preferiblemente, la razón molar de compuesto (L) con respecto a derivado de HAS tal como se obtiene en la etapa a) está en el intervalo de desde 70 hasta 1, más preferiblemente desde 40 hasta 2 e incluso más preferiblemente desde 10 hasta 5.

10 La mezcla de reacción se agita preferiblemente a una temperatura de desde 5 hasta 80°C , más preferiblemente de desde 10 hasta 60°C , más preferiblemente de desde 20 hasta 50°C e incluso más preferiblemente de desde 30 hasta 50°C , e incluso más preferiblemente de desde 35 hasta 45°C tal como aproximadamente 35, 40 ó 45°C .

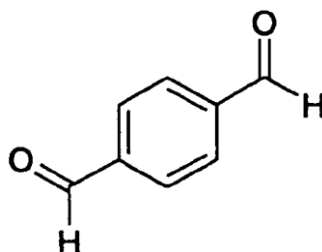
La reacción se realiza preferiblemente durante de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 h, más preferiblemente desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 h.

15 El derivado de hidroxialquilalmidón obtenido se aísla preferiblemente de la mezcla de reacción mediante ultrafiltración o diálisis, preferiblemente ultrafiltración, seguido por liofilización del derivado de hidroxialquilalmidón aislado. En una realización alternativa, el derivado de hidroxialquilalmidón se precipita de la mezcla de reacción, en particular añadiendo un alcohol y/o cetona, preferiblemente una mezcla de acetona y etanol. El precipitado obtenido puede purificarse con etapas convencionales, en particular mediante centrifugación, diálisis, ultrafiltración y/o liofilización.

20 En una realización alternativa, la etapa b) comprende adicionalmente que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido se reduzca. En particular, según esta realización, el grupo de enlace oxima $-\text{O}=\text{N}=\text{CH}-$ obtenido a través de la reacción del grupo $-\text{O}-\text{NH}_2$ del compuesto (D) y el grupo W_1 o W_2 del compuesto (L) se reduce al grupo $-\text{O}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ y/o, si es aplicable, el grupo $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$ obtenido en la etapa a) mediante la reacción del hidroxialquilalmidón y el grupo $\text{NH}_2-\text{O}-$ del compuesto (D) se reduce al grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-$. En esta realización, la reducción puede llevarse a cabo a una temperatura de 10 a 80°C durante de 5 a 24 h, tal como durante la noche, en presencia de un agente reductor adecuado, tal como $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, borohidruro de sodio, compuestos de cianoborohidruro de sodio, complejo de borano orgánicos tales como un 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, preferiblemente NaCNBH_3 o NaBH_4 , posiblemente tras una protección apropiada del grupo aldehído o grupo ceto posiblemente presente del compuesto (L) por ejemplo en forma de un grupo protector adecuado estable en las condiciones de reacción aplicadas para reducir grupo(s) de enlace oxima mencionado(s) anteriormente, por ejemplo en forma de un acetal adecuado. Tal como ya se describió anteriormente, en lugar de proteger el grupo W_1 o W_2 tras la etapa b), también es posible emplear un compuesto (L) como material de partida para la etapa b) que ya contiene un grupo W_1 o W_2 adecuadamente protegido que es estable en las condiciones de reacción aplicadas para reducir el/los grupo(s) de enlace oxima mencionados anteriormente.

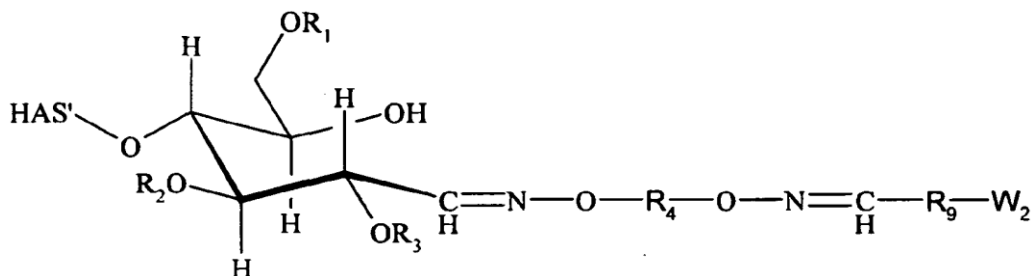
En una realización alternativa, el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) puede usarse directamente en la etapa c), sin ninguna reacción química adicional, preferiblemente sin una reducción.

40 En una realización preferida, el derivado de hidroxialquilo obtenido en la etapa a) puede hacerse reaccionar en la etapa b) con de aproximadamente 2 a aproximadamente 70 equivalentes basándose en el M_n del compuesto (L), en particular

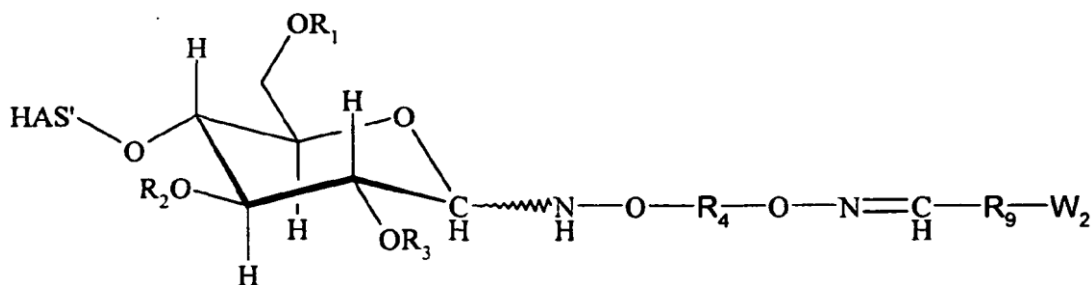


45 a temperatura ambiente o a aproximadamente 40°C y posteriormente temperatura ambiente, durante un tiempo de reacción de aproximadamente 10 a aproximadamente 24 h, en un disolvente polar, tal como DMF o una mezcla de DMF/agua (10:90, v:v). El derivado de HAS obtenido puede precipitarse entonces con una mezcla 1:1 (v:v) de etanol/acetona y el precipitado puede disolverse entonces en un disolvente polar, tal como DMF, y precipitarse de nuevo. El precipitado puede disolverse entonces en agua y ultrafiltrarse y liofilizarse. Preferiblemente, la mezcla de reacción puede diluirse con agua 1:1 (v:v), el precipitado obtenido puede filtrarse o centrifugarse y diluirse de nuevo con agua 1:1 (v:v) y la disolución obtenida puede entonces ultrafiltrarse y liofilizarse.

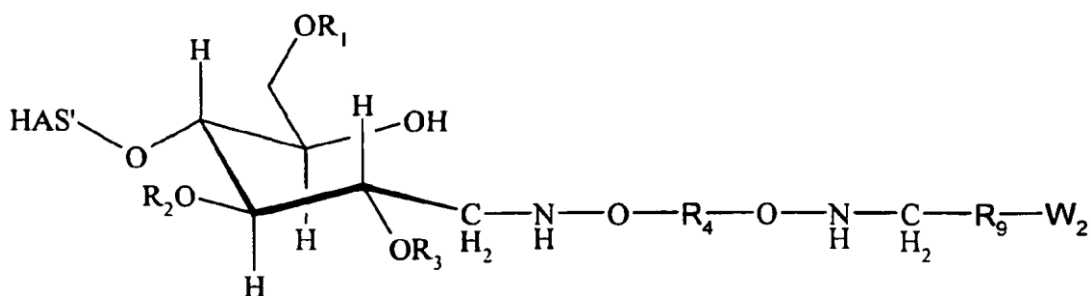
Por consiguiente, la presente invención se refiere a derivados de HAS que tienen las siguientes estructuras (a continuación, se supone que la reacción del compuesto (L) con el derivado de HAS obtenido de la etapa a) se produce mediante el grupo funcional W_1 del compuesto (L)):



- 5 y/o la estructura de anillo correspondiente (en todas las fórmulas de estructuras siguientes que contienen un enlace oxima no reducido entre el extremo reductor de HAS o HES y el compuesto (D), la estructura de anillo abierto mostrada debe abarcar también la estructura de anillo correspondiente mostrada a continuación)

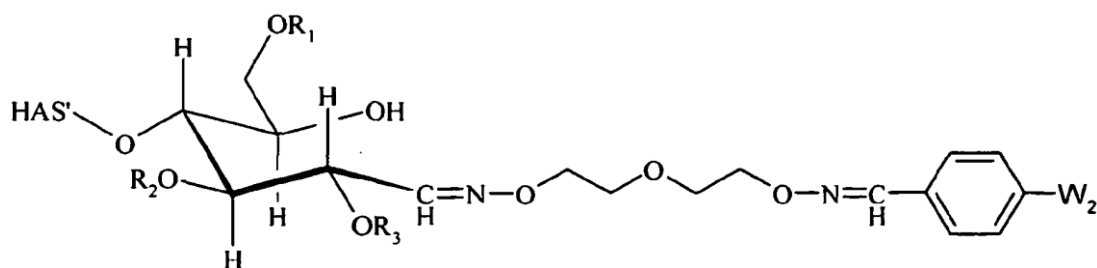


y/o

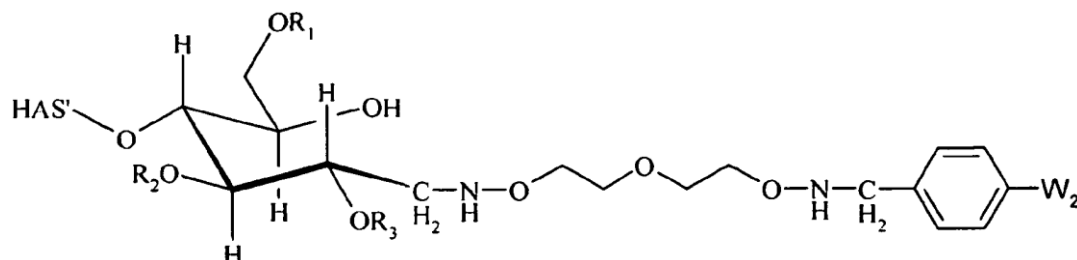


- 10 Dependiendo de las condiciones de reacción y/o la naturaleza química específica del compuesto de reticulación, el doble enlace C-N puede estar presente en conformación E o Z, pudiendo también estar presente una mezcla de ambas formas que tiene una determinada distribución en equilibrio; en lo que se refiere a la estructura de anillo correspondiente que para los fines de la presente invención debe considerarse como idéntica a la estructura abierta anterior, y dependiendo de las condiciones de reacción y/o la naturaleza química específica del compuesto de reticulación, estos derivados de HAS puede estar presentes con el átomo de N en posición ecuatorial o axial pudiendo también estar presente una mezcla de ambas formas que tiene una determinada distribución en equilibrio.

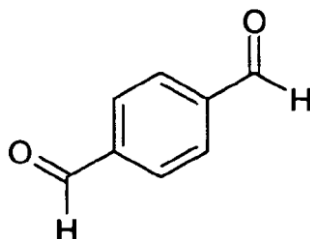
- 15 Por tanto, según una realización preferida, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución $C_2 : C_6$ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:



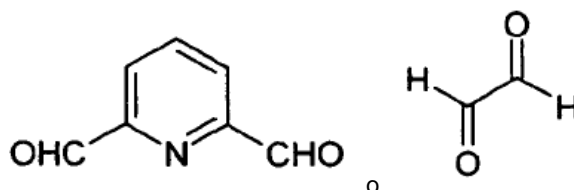
y/o



5 Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS, preferiblemente derivados de HES según las 2 estructuras anteriores en las que, en lugar de

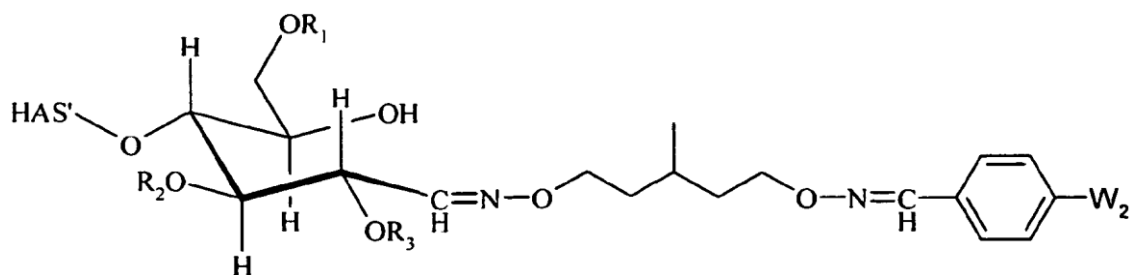


se ha empleado el compuesto

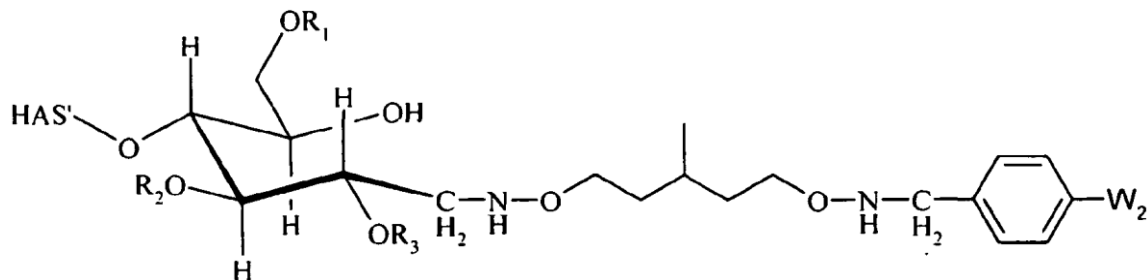


como compuesto (L).

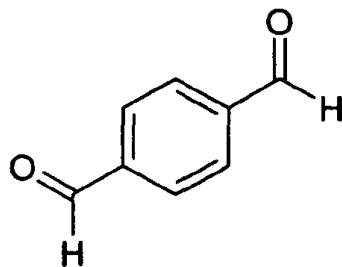
10 Según una realización adicional, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución C₂ : C₆ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:



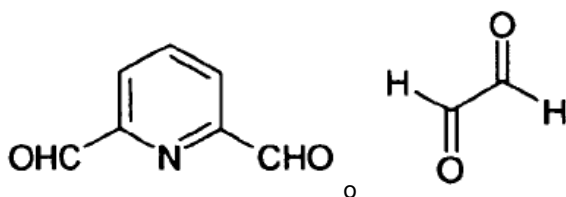
y/o



5 Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS, preferiblemente derivados de HES según las 2 estructuras anteriores en las que, en lugar de



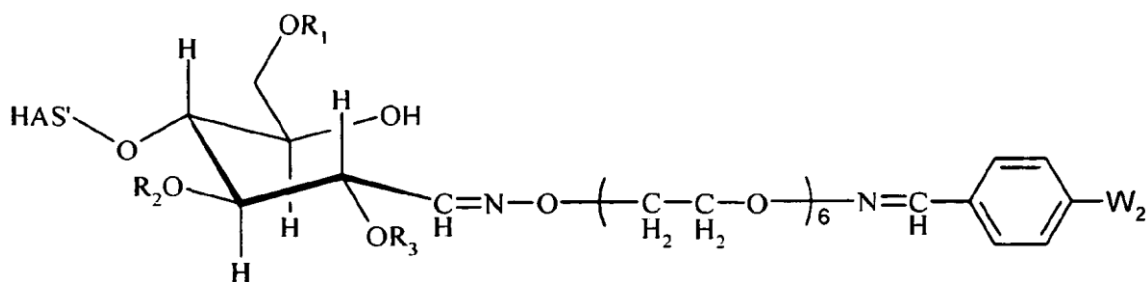
se ha empleado el compuesto



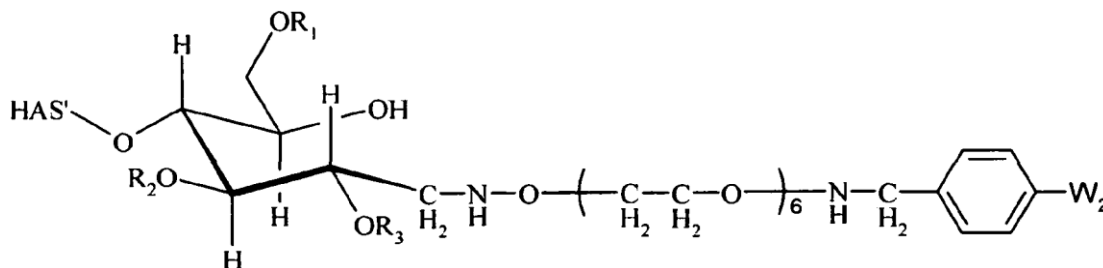
como compuesto (L).

10 Según una realización adicional, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución C₂: C₆ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:

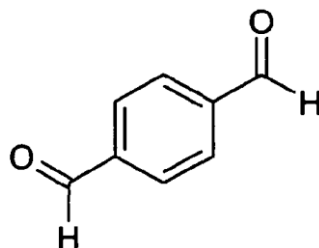
15



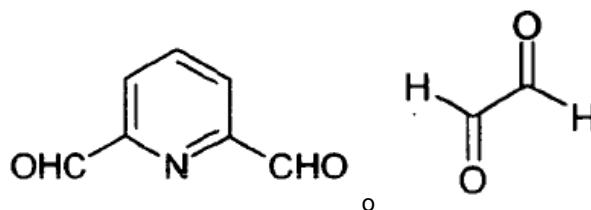
y/o



5 Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS, preferiblemente derivados de HES según las 2 estructuras anteriores en las que, en lugar de



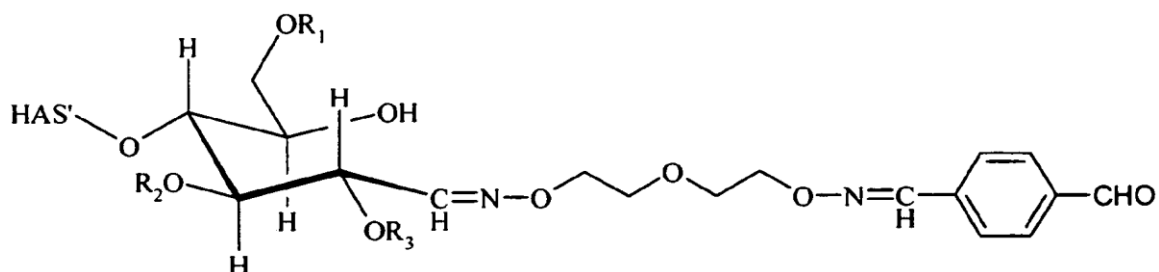
se ha empleado el compuesto



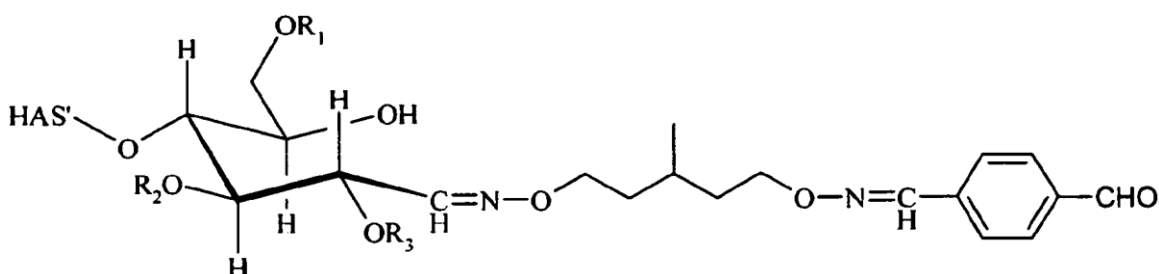
como compuesto (L).

- 10 En cada uno de los derivados de HAS dados a conocer anteriormente que comprende el grupo terminal W_2 , W_2 se selecciona del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo ceto y un grupo ceto adecuadamente protegido, preferiblemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo hemiacetal, $-CH(OH)_2$, un grupo acetal, un grupo ceto y un grupo cetal, e incluso más preferiblemente del grupo que consiste en un grupo hemiacetal, $-CH(OH)_2$, un grupo acetal, un grupo cetal y el grupo $-C(O)-R$, en el que
- 15 R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido. Incluso más preferiblemente, en el caso de que el grupo $-C(O)-R$ sea un grupo ceto, R se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y arilo C_6-C_{14} , incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido.
- 20 Según una de las realizaciones preferidas de la presente invención, según la cual el/los enlace(s) oxima no se reduce(n) antes de la reacción según la etapa c) tal como se describe a continuación en el presente documento, el grupo W_2 es preferiblemente un grupo aldehído no protegido o grupo ceto no protegido, en particular un grupo aldehído no protegido. Por tanto, a modo de ejemplo, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular
- 25 medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta

5 aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución C₂ : C₆ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:

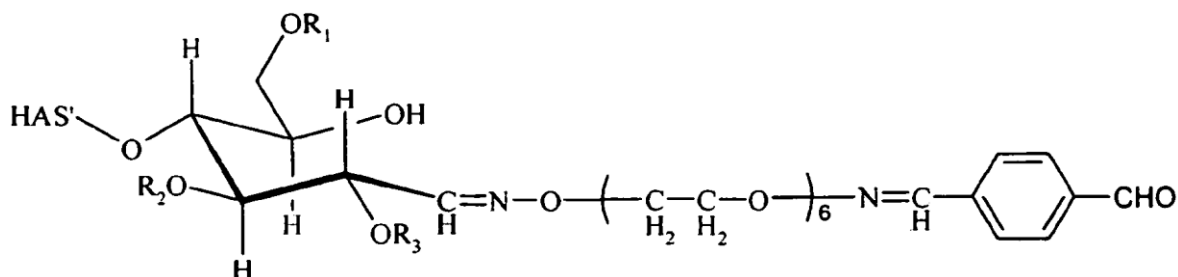


y/o

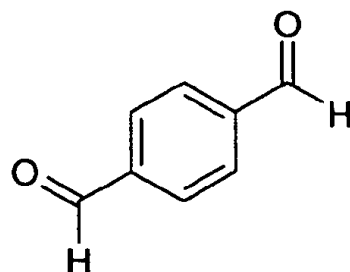


10

y/o

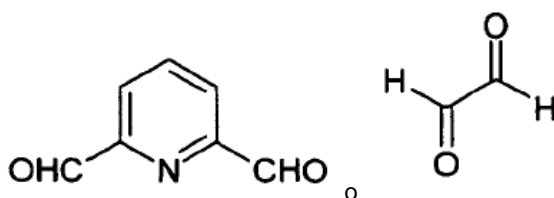


Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS, preferiblemente derivados de HES según las 3 estructuras anteriores en las que, en lugar de



15

se ha empleado el compuesto

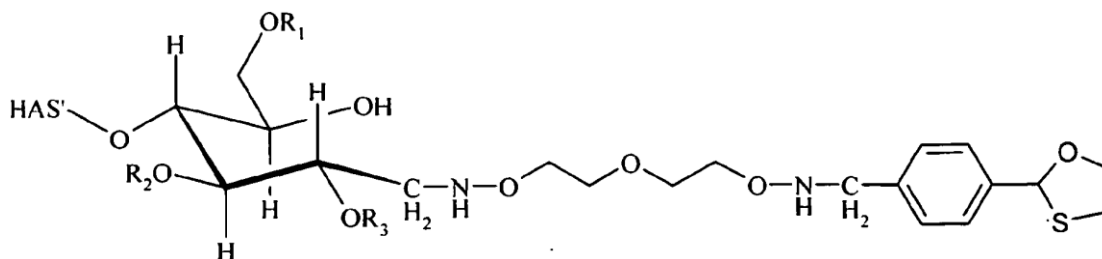


como compuesto (L).

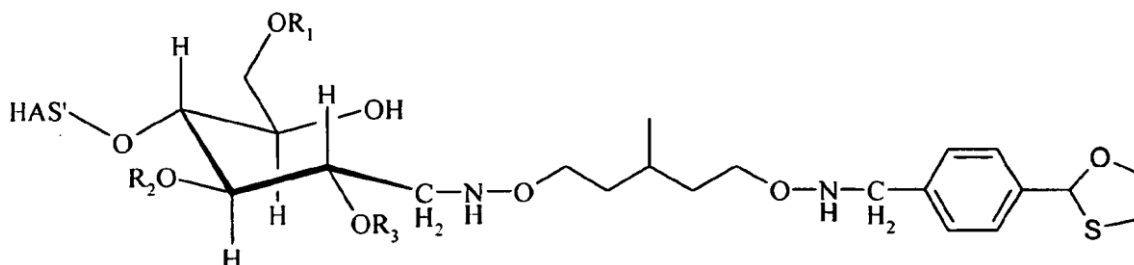
Según otra realización preferida de la presente invención, según la cual el/los enlace(s) oxima se reduce(n) antes de la reacción según la etapa c) tal como se describe a continuación en el presente documento, el grupo W_2

- 5 - o bien está adecuadamente protegido, si está presente como grupo aldehído o grupo ceto no protegido antes del procedimiento de reducción, antes de que se lleve a cabo la reducción de los enlaces oxima;
- ya está presente como grupo aldehído adecuadamente protegido o grupo ceto adecuadamente protegido en el compuesto (L) empleado como material de partida en la etapa b).

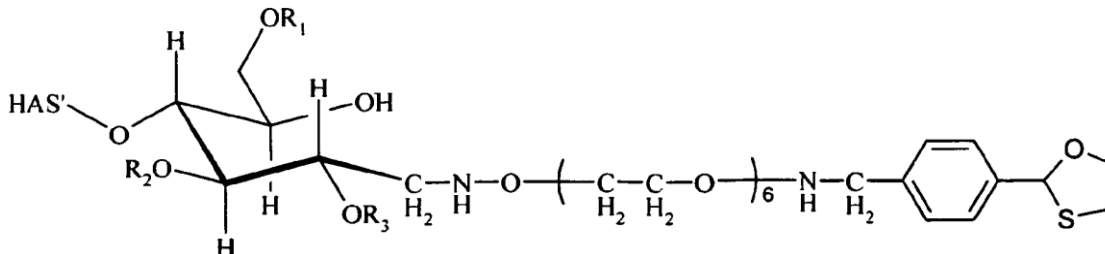
10 Por tanto, en lo que se refiere a los derivados de HAS que comprenden enlaces oxima reducidos, y a modo de ejemplo, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución $C_2 : C_6$ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:



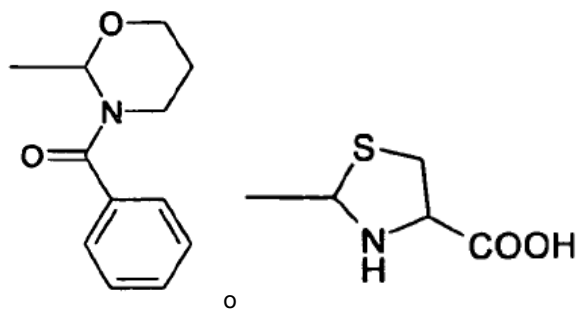
20 y/o



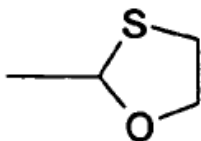
y/o



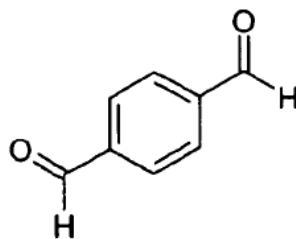
25 Según otra realización concebible referente a las tres estructuras anteriores, que presentan cada una enlaces oxima reducidos, el grupo terminal W_2 puede ser, por ejemplo,



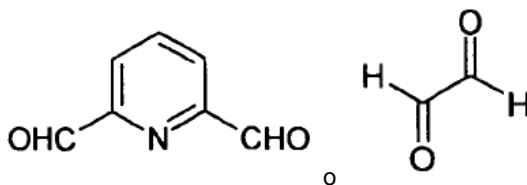
en lugar de



5 Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS, preferiblemente derivados de HES según las 3 estructuras anteriores en las que, en lugar de



se ha empleado el compuesto



como compuesto (L).

10 IV. Etapa c)

En una realización preferida, el derivado de hidroxialquilimidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar en una etapa c) adicional con al menos un agente biológicamente activo BA. El al menos un agente biológicamente activo BA usado en la etapa c) comprende al menos un grupo funcional NH₂. Para tales casos y para los fines de la presente invención, BA también se representa como H₂N-BA' en el que BA' es el resto de BA.

15 Según una realización de la presente invención, el derivado de HAS obtenido de la etapa b) que tiene un grupo aldehído no protegido o grupo ceto no protegido, preferiblemente un grupo aldehído no protegido como grupo W₂, se hace reaccionar, opcionalmente tras purificación adecuada mediante métodos tales como, por ejemplo, ultrafiltración, diálisis y/o precipitación, con BA en la etapa c) de la presente invención.

20 Según otra realización de la presente invención, el derivado de HAS obtenido de la etapa b) que tiene un grupo aldehído protegido o grupo ceto protegido, preferiblemente un grupo aldehído protegido como grupo W₂, se somete, opcionalmente tras purificación adecuada mediante métodos tales como, por ejemplo, ultrafiltración, diálisis y/o precipitación, a una transformación del grupo protegido en el grupo ceto o aldehído correspondiente en la que el derivado de HAS resultante se somete a una etapa de purificación y/o aislamiento adecuada antes de la reacción con BA. La transformación en el grupo ceto o aldehído se realiza preferiblemente mediante una reacción de hidrólisis catalizada por ácido. La reacción se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de desde 0 hasta 100°C, más preferiblemente desde 10 hasta 80°C y más preferiblemente desde 20 hasta 60°C, a un pH que está preferiblemente en el intervalo de desde 1 hasta 6, más preferiblemente desde 1 hasta 5, más preferiblemente desde 1 hasta 4, más

preferiblemente desde 1 hasta 3 e incluso más preferiblemente desde 1 hasta menos de 3. La purificación y el intercambio del tampón del producto de la reacción de hidrólisis pueden lograrse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante diálisis o ultrafiltración. El material transformado puede recuperarse de la disolución como un sólido, por ejemplo mediante secado por congelación.

5 Según aún otra realización de la presente invención, el derivado de HAS obtenido de la etapa b) que se ha purificado preferiblemente se somete adecuadamente a una transformación del grupo protegido W_2 en el grupo ceto o aldehído correspondiente en la que el derivado de HAS resultante se hace reaccionar directamente con BA, es decir, sin una etapa de purificación y/o aislamiento adecuada separada del derivado de HAS que comprende el grupo ceto o aldehído. La transformación en el grupo ceto o aldehído se realiza preferiblemente mediante una
10 reacción de hidrólisis catalizada por ácido. La reacción se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de desde 0 hasta 100°C, más preferiblemente desde 10 hasta 80°C y más preferiblemente desde 20 hasta 60°C, a un pH que está preferiblemente en el intervalo de desde 1 hasta 6, más preferiblemente desde 1 hasta 5, más preferiblemente desde 1 hasta 4, más preferiblemente desde 1 hasta 3 e incluso más preferiblemente desde 1 hasta menos de 3. El producto de la reacción de hidrólisis puede combinarse con el BA en una disolución tamponada o bien directamente o bien tras haberse ajustado el pH a un valor compatible con la reacción con el BA.
15

Según aún otra realización concebible de la presente invención, el derivado de HAS obtenido de la etapa b) que preferiblemente se ha purificado se hace reaccionar directamente con BA, es decir, se hace reaccionar con BA en condiciones de reacción que permiten la transformación *in situ* del grupo protegido en el grupo ceto o aldehído correspondiente sin una etapa de purificación y/o aislamiento adecuada separada y sin una etapa separada para la transformación del grupo protegido en el grupo ceto o aldehído correspondiente.
20

En lo que se refiere a los principios biológicamente activos (BA) de la presente invención, estos compuestos pueden comprender uno o más grupos amino para el acoplamiento según la fase (ii) de la presente invención. Para casos en los que BA como tal no comprende un grupo amino adecuado para este acoplamiento, es concebible que se introduzca al menos un grupo amino de este tipo en BA mediante funcionalización adecuada mediante métodos conocidos para el experto, antes de someter BA a (ii).
25

El término "principio biológicamente activo" (BA) tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a una sustancia que puede afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un organismo biológico incluyendo, pero sin limitarse a, virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, el término "principio biológicamente activo" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a una sustancia destinada a diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en seres humanos o animales, o a de otro modo mejorar el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Los ejemplos de principios activos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, colorantes, lípidos, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Preferiblemente, una sustancia biológica según la presente invención contiene un grupo amino nativo.
30
35

Los ejemplos de proteínas incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina (EPO), tal como EPO humana recombinante (rhEPO) o un mimético de EPO, factores estimulantes de colonias (CSF), tales como G-CSF como G-CSF humano recombinante (rhGCSF), interferón alfa (IFN alfa), interferón beta (IFN beta) o interferón gamma (IFN gamma), tal como IFN alfa e IFN beta como IFN alfa o IFN beta humano recombinante (rhIFN alfa o (rhIFN beta), interleucinas, por ejemplo IL-1 a IL-34 tal como IL-2 o IL-3 o IL-11 como IL-2 o IL-3 humana recombinante (rhIL-2 o rhIL-3), proteínas séricas tales como factores de coagulación II-XIII como factor VIII, factor VII, factor IX, factor II, factor III, factor IV, factor V, factor VI, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, inhibidores de serina proteasas tales como alfa-1-antitripsina (A1AT), proteína C activada (APC), activadores del plasminógeno tales como activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), tal como activador del plasminógeno tisular humano (hTPA), AT III tal como AT III humano recombinante (rhAT III), mioglobina, albúmina tal como albúmina sérica bovina (BSA), factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de trombocitos (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de células B (BCGF), factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factores de crecimiento transformante tales como TGF alfa o TGF beta, BMP (proteínas morfogénicas óseas), hormonas del crecimiento tales como hormona del crecimiento humana (hGH), factores de necrosis tumoral tales como TNF alfa o TNF beta, somatostatina, somatotropina, somatomedinas, hemoglobina, hormonas o prohormonas tales como insulina, gonadotropina, hormona estimulante de melanocitos (alfa-MSH), triptorelina, hormonas hipotalámicas tales como hormonas antiuréticas (ADH y oxitocina así como hormonas liberadoras y hormonas inhibidoras de la liberación, hormona paratiroidea, hormonas tiroideas tales como tiroxina, tirotropina, tiroliberina, calcitonina, glucagón, péptidos similares a glucagón (GLP-1, GLP-2 etc.), exendinas tales como exendina-4, leptina, vasopresina, gastrina, secretina, integrinas, hormonas glicoproteicas (por ejemplo LH, FSH etc.), hormonas estimulantes de melanocitos, lipoproteínas y apo-lipoproteínas tales como apo-B, apo-E, apo-La, inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de las mismas, hirudina, inhibidor de la ruta tisular, proteínas vegetales tales como lectina o ricina, veneno de abeja, veneno de serpiente, inmunotoxinas, antígeno E, inhibidor de alfa-proteinasa, alérgeno de ambrosía, melanina, proteínas de oligolisina, proteínas RGD o receptores opcionalmente correspondientes para una de estas proteínas; prolactina o un mutante de la misma, tal como G129R, en el que el aminoácido de tipo natural en la posición 129, glicina, se reemplaza por arginina (un
40
45
50
55
60

nombre comercial de este mutante es “LactoVert”) y un fragmento o derivado funcional de cualquiera de estas proteínas o receptores, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, o un almacén proteico alternativo. El término “almacén proteico alternativo” tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula que tiene capacidades de unión similares a un anticuerpo dado en el que la molécula se basa en un entramado proteico que no es de anticuerpo alternativo. En este contexto, pueden mencionarse los artículos de A. Skerra, T. Hey *et al.*, y H.K. Binz (véase la lista de referencias más adelante).

La principio activo se selecciona preferiblemente del grupo compuesto por antibióticos, antidepresivos, antidiabéticos, antiuréticos, anticolinérgicos, antiarrítmicos, antieméticos, antitusivos, antiepilépticos, antihistaminas, antimicóticos, antisimpatotónicos, antitrombóticos, andrógenos, antiandrógenos, estrógenos, antiestrógenos, antiosteoporóticos, agentes antitumorales, vasodilatadores, otros agentes antihipertensores, agentes antipiréticos, analgésicos, agentes antiinflamatorios, beta-bloqueantes, inmunosupresores y vitaminas.

Algunos ejemplos adicionales, no restrictivos de principios activos son alendronato, amikazina, atenolol, azatioprina, cimetidina, clonidina, cosintropina, cicloserina, desmopresina, dihidroergotamina, dobutamina, dopamina, ácido ϵ -aminocaproico, ergometrina, esmolol, famotidina, flecainida, ácido fólico, flucitosina, furosemida, ganciclovir, glucagón, hidrazalina, isoproterenol, ketamina, liotironina, LHRH, merpatricina, metildopa, metoprolol, neomicina, nimodipina, nistatina, oxitocina, fentolamina, fenilefrina, procainamida, procaína, propranolol, ritodrina, sotalol, terbutalina, tiamina, tiludronato, tolazolina, trimetoprim, trometamina, vasopresina; amifostina, amiodarona, ácido aminocaproico, aminohipurato sódico, aminoglutetimida, aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amsacrina, anagrelida, anastrozol, asparaginasa, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfano, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucina, cilastatina sódica, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, camptotecinas, ácido 13-cis-retinoico, ácido todo-trans-retinoico; dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxidurea, idarubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, itraconazol, goserelina, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina sódica, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, bitartrato de metaraminol, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, naloxona, nicotina, nilutamida, octreotida, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, pilcamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetrón, raltitrexed, sirolimus, estreptozocina, tacrolimus, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tetrahidrocannabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, tretinoína, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, dolasetrón, granisetrón; forinoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, alprazolam, anfotericina B, podofilotoxinas, antivirales de nucleósido, aril hidrazona, sumatriptán; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davercina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, rokitamicina, andazitromicina y swinolida A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, trovafloxacino, alatrofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, enoxacino, grepafloxacino, gatifloxacino, lomexifloxacino, esparfloxacino, temafloxacino, pefloxacino, amifloxacino, fleroxacino, tosufloxacino, prulifloxacino, irloxacino, pazufloxacino, clinafloxacino y sitafloxacino; aminoglicósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amikamicina, kanamicina, neomicina y estreptomina, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramidicina, colistimetato; polimixinas tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penems; penicilinas incluyendo agentes sensibles a penicilinas como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a penicilinas como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos contra microorganismos gram negativos como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina y galampicilina; penicilinas antipseudomónicas como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina; cefalosporinas como cefpodoxima, cefprozil, ceftbuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxilo, cefaloglicina, cefuroxima, ceforamida, cefotaxima, cefatrizina, cefacetilol, cefepima, cefixima, cefonicida, cefoperazona, cefotetán, cefinetazol, ceftazidima, loracarbef, y moxalactam, monobactamas como aztreonam; y carbapenems tales como imipenem, meropenem, isetiuato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaína, sulfato de metaproterenol, diprepiato de beclometasona, acetamida de triamcinolona, acetónido de budesonida, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolin sódico y tartrato de ergotamina; taxanos tales como paclitaxel; SN-38 y tirfostinas.

Por tanto, también compuestos químicos conocidos por el experto como “moléculas pequeñas” son principios biológicamente activos concebibles según la presente invención. El término “molécula pequeña” tal como se usa en este contexto de la presente invención se refiere a un compuesto químico biológicamente activo distinto de una proteína y un oligonucleótido incluyendo, sin embargo, péptidos de hasta 50 aminoácidos. Se enumeran ejemplos típicos de tales moléculas pequeñas en el párrafo anterior.

Ejemplos de un oligonucleótido son aptámeros. También deben mencionarse ácidos nucleicos peptídicos (PNA) como principios biológicamente activos concebibles.

En una realización preferida particular, el al menos un agente biológicamente activo BA usado en la etapa c) se selecciona del grupo que consiste en un péptido, polipéptido, una proteína y un mimético, fragmento o derivado funcional del polipéptido o la proteína.

Preferiblemente, el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina (EPO), tal como EPO humana recombinante (rhEPO) o un mimético de EPO, factores estimulantes de colonias (CSF), tal como G-CSF como G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), interferón alfa (IFN alfa), interferón beta (IFN beta) o interferón gamma (IFN gamma), tal como IFN alfa e IFN beta como IFN alfa o IFN beta humano recombinante (rhIFN alfa o rhIFN beta), interleucinas, por ejemplo IL-1 a IL-18 tal como IL-2 o IL-3 como IL-2 o IL-3 humana recombinante (rhIL-2 o rhIL-3), proteínas séricas tales como factores de coagulación II-XIII como factor VIII, factor VII, factor IX, factor II, factor III, factor IV, factor V, factor VI, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, alfa-1-antitripsina (A1AT), proteína C activada (APC), activadores del plasminógeno tales como activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), tal como activador del plasminógeno tisular humano (hTPA), AT III tal como AT III humano recombinante (rhAT III), mioglobina, albúmina tal como albúmina sérica bovina (BSA), factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de trombocitos (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de células B (BCGF), factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factores de crecimiento transformante tales como TGF alfa o TGF beta, BMP (proteínas morfogénicas óseas), hormonas del crecimiento tales como hormona del crecimiento humana, factores de necrosis tumoral tales como TNF alfa o TNF beta, somatostatina, somatotropina, somatomedinas, hemoglobina, hormonas o prohormonas tales como insulina, gonadotropina, hormona estimulante de melanocitos (alfa-MSH), triptorelina, hormonas hipotálamicas tales como hormonas antidiuréticas (ADH y oxitocina así como hormonas liberadoras y hormonas inhibitoras de la liberación, hormona paratiroidea, hormonas tiroideas tales como tiroxina, tirotrópina, tiroliberina, calcitonina, glucagón, péptidos similares a glucagón (GLP-1, GLP-2 etc.), exendinas tales como exendina-4, leptina, vasopresina, gastrina, secretina, integrinas, hormonas glicoproteicas (por ejemplo LH, FSH etc.), hormonas estimulantes de melanocitos, lipoproteínas y apo-lipoproteínas tales como apo-B, apo-E, apo-La, inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de las mismas, hirudina, inhibidor de la ruta tisular, proteínas vegetales tales como lectina o ricina, veneno de abeja, veneno de serpiente, inmunotoxinas, antígeno E, inhibidor de alfa-proteinasa, alérgeno de ambrosía, melanina, proteínas de oligolisina, proteínas RGD o receptores opcionalmente correspondientes para una de estas proteínas; y un fragmento o derivado funcional de cualquiera de estas proteínas o receptores.

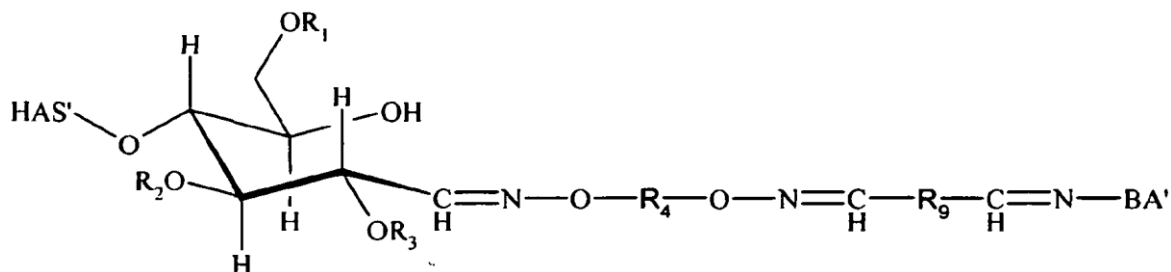
El polipéptido se selecciona incluso más preferiblemente del grupo que consiste en eritropoyetina (EPO), tal como EPO humana recombinante (rhEPO), factores estimulantes de colonias (CSF), tal como G-CSF como G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), alfa-1-antitripsina (A1AT), factor IX, interferón alfa (IFN alfa), interferón beta (IFN beta) e interferón gamma (IFN gamma), tal como IFN alfa o IFN beta humano recombinante (rhIFN alfa o rhIFN beta), en particular A1AT, factor IX, IFN alfa, G-CSF y EPO. En una realización preferida, el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar en la etapa c) con un grupo amino del al menos un agente biológicamente activo mediante el grupo funcional W_2 seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído o un grupo ceto, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en $-CH=O$, grupo hemiacetal, $-CH(OH)_2$ y el grupo $-C(O)-R$, en el que R se selecciona del grupo que consiste en un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido, introducido en el derivado de hidroxialquilalmidón a través del compuesto (L) en la etapa b). En una realización preferida, en el caso de que el grupo $-C(O)-R$ sea un grupo ceto, el residuo R se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y arilo C_6-C_{14} , incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido.

En una realización, el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar en la etapa c) mediante el al menos un grupo funcional $-NH_2$ del agente biológicamente activo con el grupo funcional W_2 del grupo que consiste en un grupo aldehído o un grupo ceto, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en $-CH=O$, grupo hemiacetal, $-CH(OH)_2$ y el grupo $-C(O)-R$, introducido en el derivado de hidroxialquilalmidón a través del compuesto (L) en la etapa b), en el que el al menos un grupo funcional $-NH_2$ comprendido en el al menos un agente biológicamente activo usado en la etapa c) es el grupo amino N-terminal de un polipéptido o una proteína.

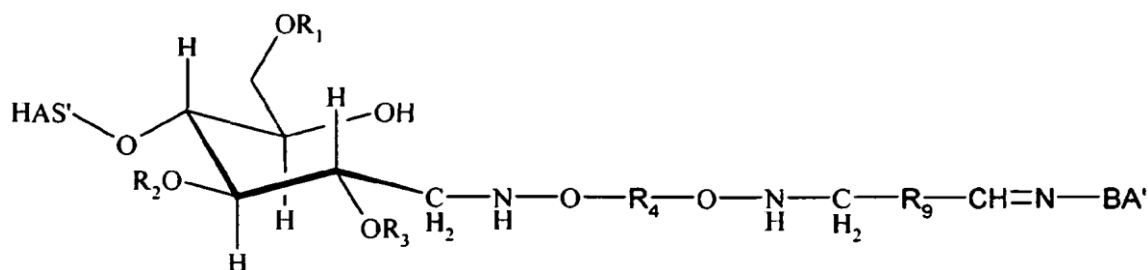
En una realización preferida, la etapa c) se realiza en las condiciones de reacción para una aminación reductora. Las condiciones de reacción para la aminación reductora las conocen los expertos en la técnica. En particular, en estas condiciones, el grupo $-CH=N-$ obtenido a través de la reacción del grupo funcional W_2 seleccionado del grupo que consiste en $-CH=O$, grupo hemiacetal, $-CH(OH)_2$ y el grupo $-C(O)-R$ y el grupo NH_2- del "agente biológicamente activo BA" se reduce a $-CH_2-NH-$.

En una realización alternativa, ni el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) ni el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se reduce tras las respectivas etapas, y sólo se realiza reacción en la etapa c) en condiciones reductoras, más preferido, en la que la etapa c) se realiza con un agente reductor adecuado, tal como $NaBH(OAc)_3$, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, compuestos de complejo de borano orgánicos tales como un complejo de 4-(dimetilamina)piridina-borano, complejo de N-etildiisopropilamina-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, preferiblemente $NaCNBH_3$ o $NaBH_4$. Por tanto, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta

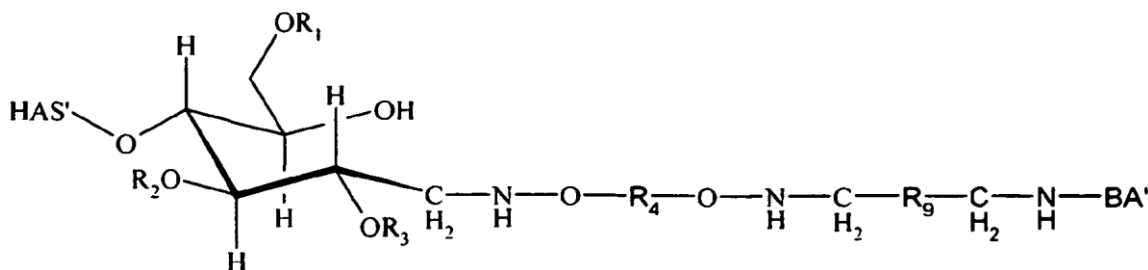
aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución $C_2 : C_6$ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:



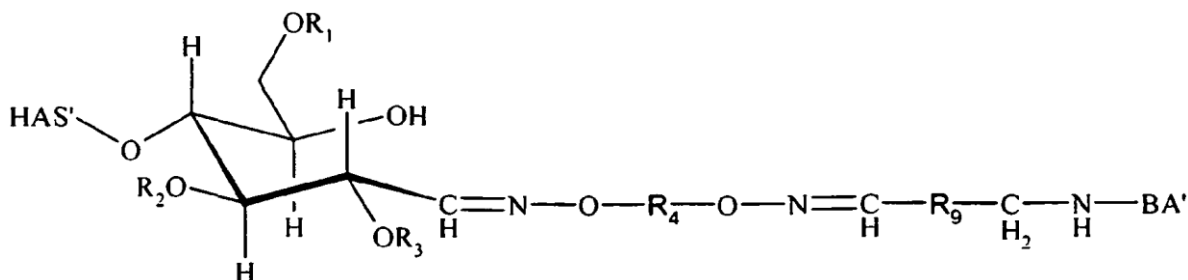
y/o



y/o

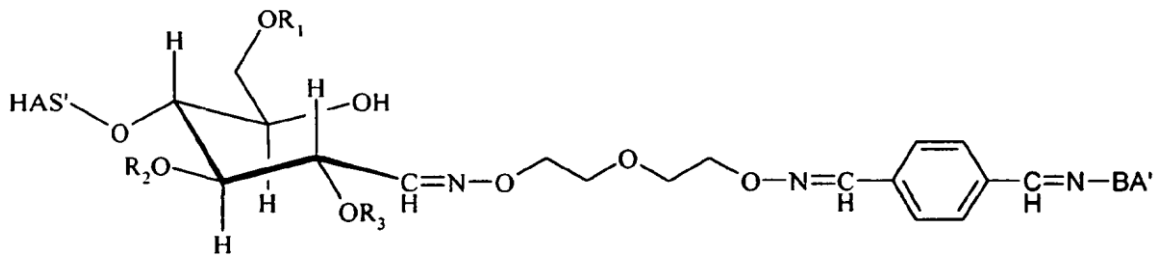


y/o

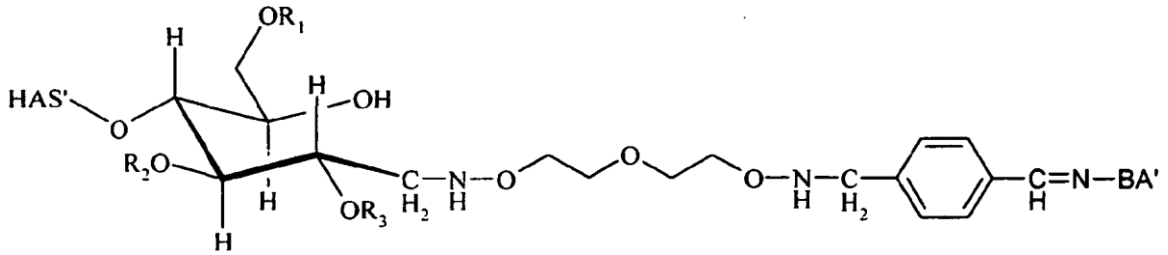


20

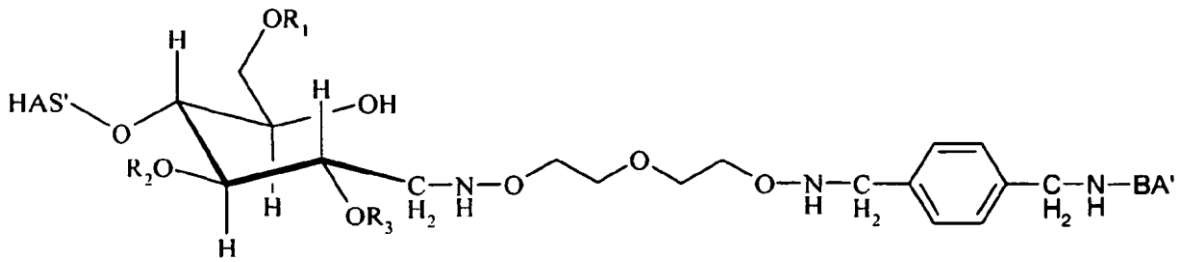
Preferiblemente, entre otros, la presente invención se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución $C_2 : C_6$ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12.



y/o

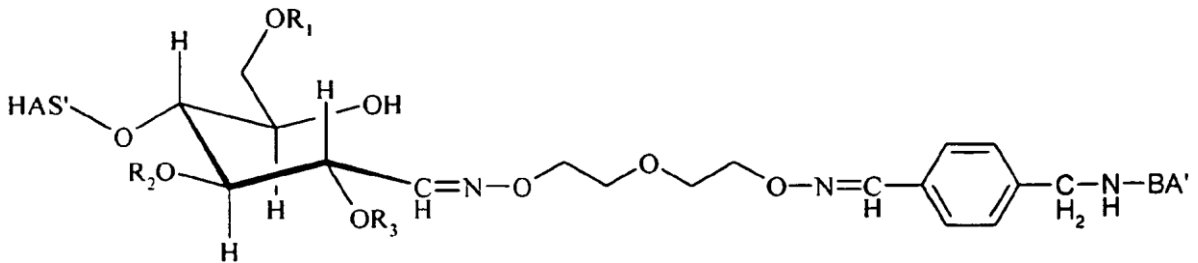


y/o

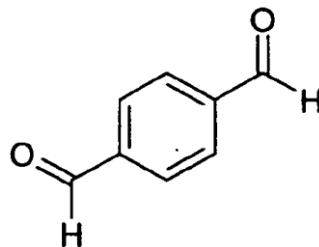


5

y/o

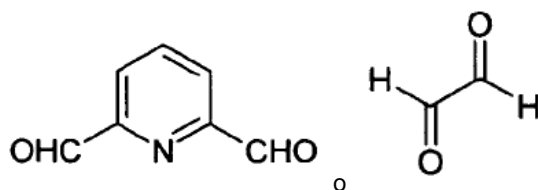


Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS, preferiblemente derivados de HES según las 4 estructuras anteriores en las que, en lugar de



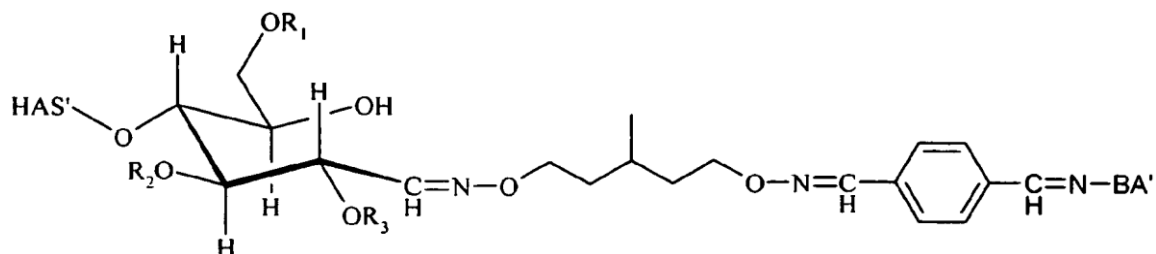
10

se ha empleado el compuesto

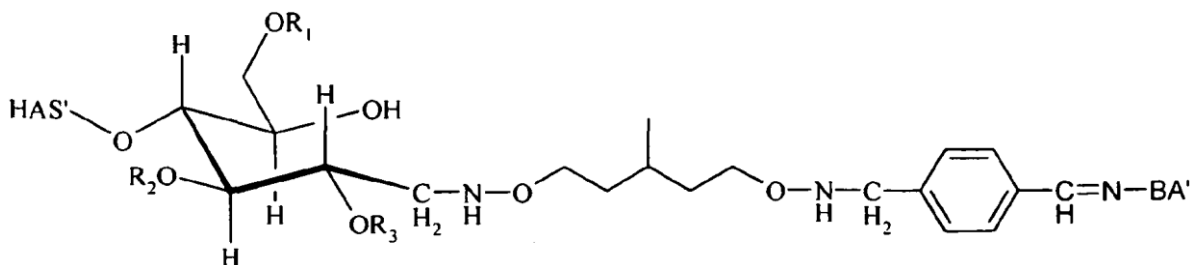


como compuesto (L).

Según una realización adicional, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución C₂ : C₆ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:

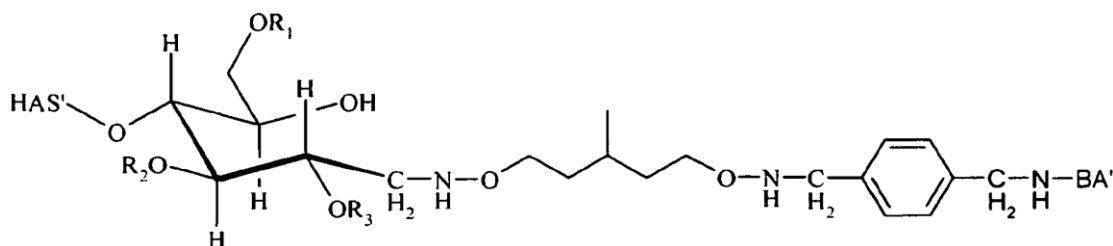


y/o

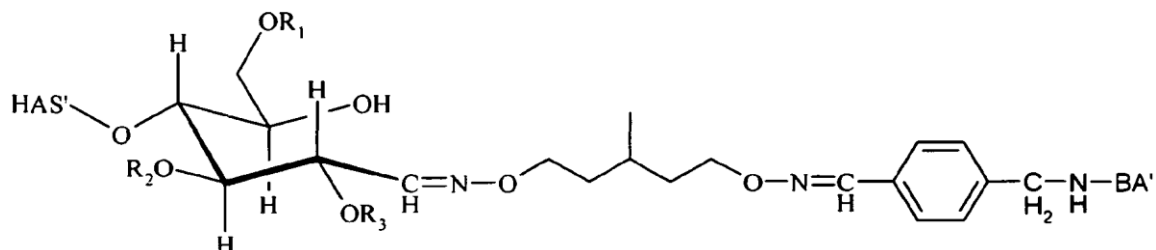


15

y/o

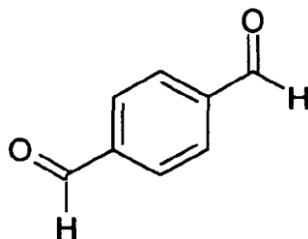


y/o

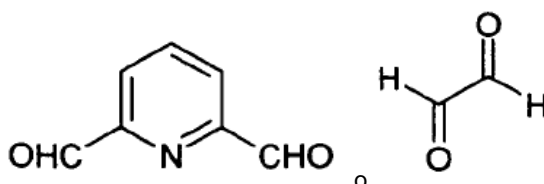


20 Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS,

preferiblemente derivados de HES según las 4 estructuras anteriores en las que, en lugar de

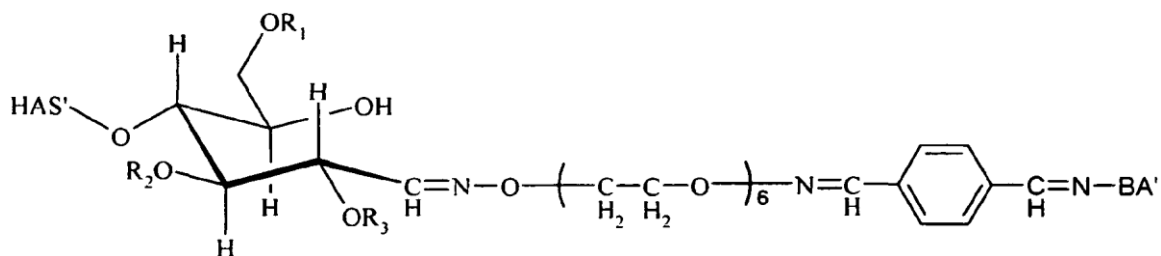


se ha empleado el compuesto

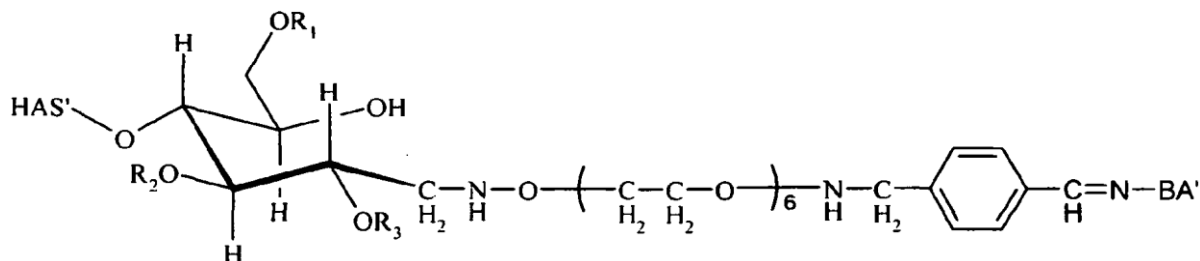


5 como compuesto (L).

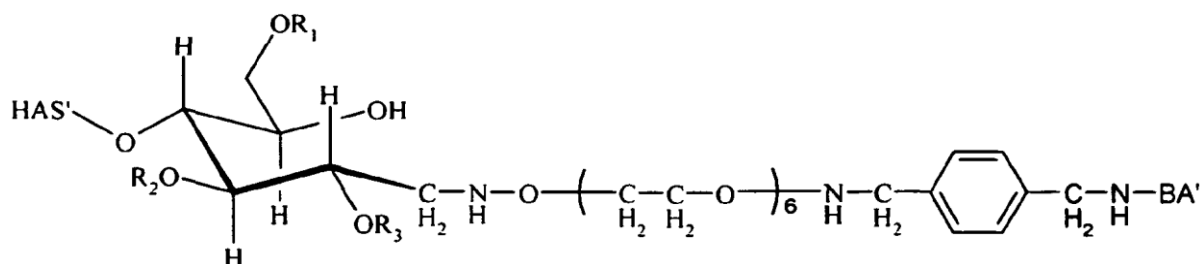
Según una realización adicional, la presente invención también se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución $C_2 : C_6$ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:



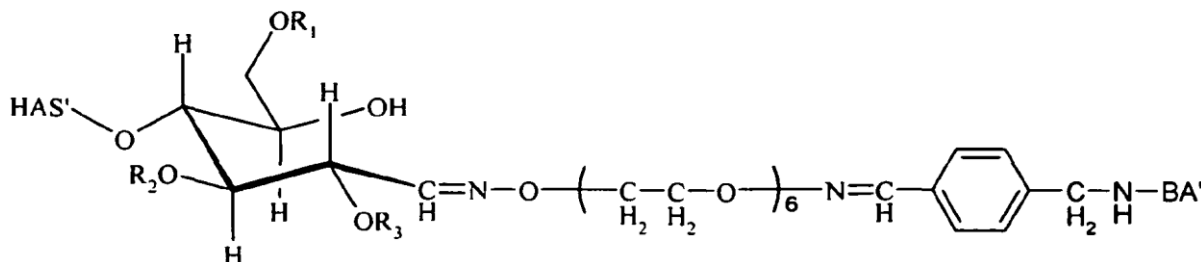
y/o



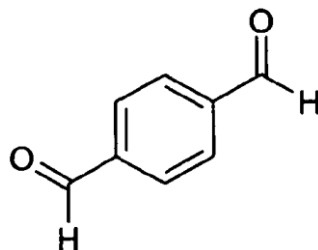
y/o



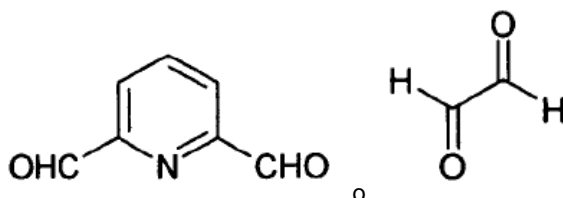
y/o



5 Según otras realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a los derivados de HAS, preferiblemente derivados de HES según las 4 estructuras anteriores en las que, en lugar de



se ha empleado el compuesto

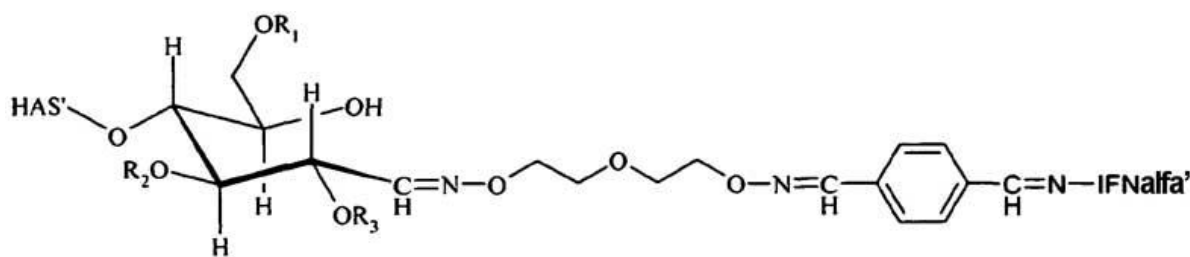


como compuesto (L).

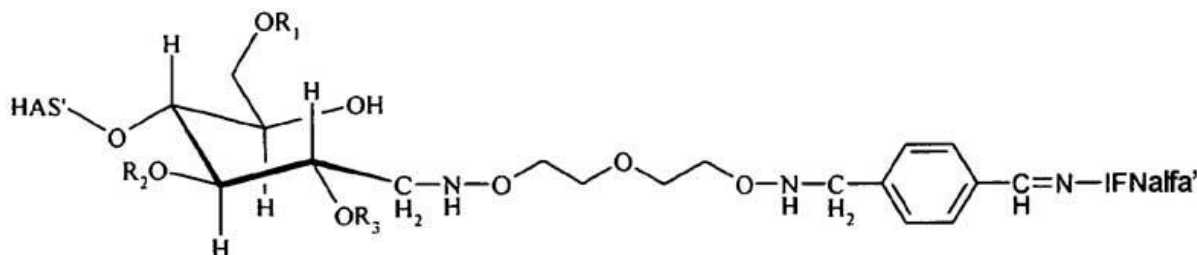
10 En cada uno de los derivados de HAS identificados anteriormente, preferiblemente derivados de HES que contienen BA', BA' se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en IFN-alfa', G-CSF', EPO', A1AT' y factor IX', en particular IFN-alfa'.

15 Por tanto, la presente invención, según una realización particularmente preferida, se refiere a un derivado de HAS, preferiblemente un derivado de HES, en el que, incluso más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución C₂ : C₆ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12:

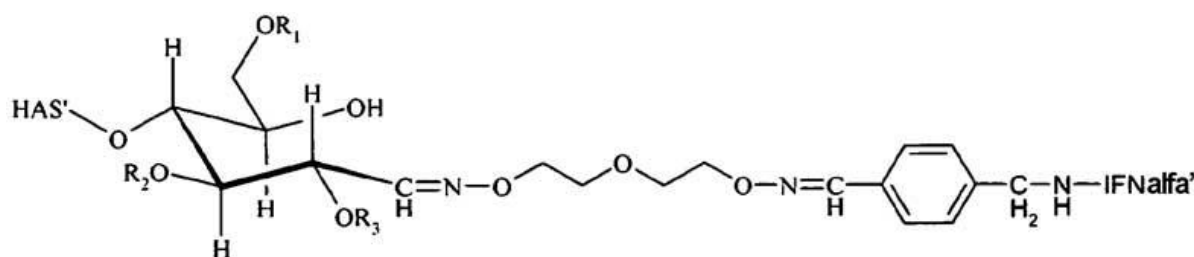
20



y/o

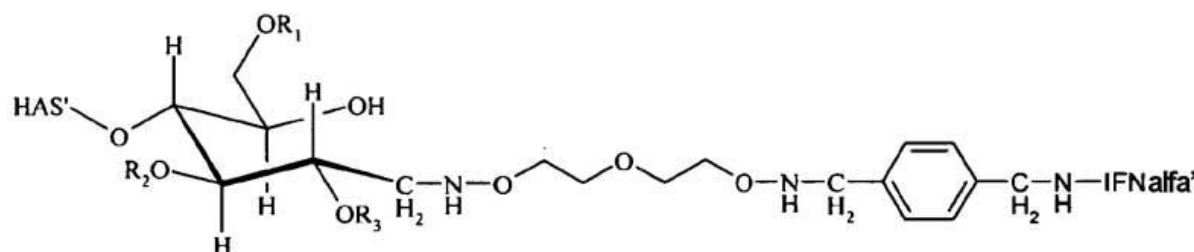


y/o



5

en particular



10 En una realización preferida, el agente biológicamente activo BA, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en IFN-alfa, GCSF, EPO, A1AT y factor IX, en particular IFN-alfa, se disuelve en un medio acuoso, preferiblemente un tampón, en particular un tampón acetato de sodio. El medio acuoso puede contener adicionalmente aditivos, tales como detergentes y/o dispersantes, en particular seleccionados del grupo que consiste en SDS, Chaps, Tween 20, Tween 80, Nonidet P- 40 y Triton X 100. Si se usa un detergente y/o un dispersante, está presente preferiblemente en una cantidad de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 3% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5% en peso.

15 La disolución acuosa de agente biológicamente activo BA tiene preferiblemente un valor de pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, en particular de aproximadamente 4 a aproximadamente 7.

20 En una realización, el derivado de hidroxialquilamidón obtenido en la etapa b) se añade a la disolución acuosa de agente biológicamente activo BA tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, se añade posteriormente un agente reductor adecuado, tal como NaBH(OAc)₃, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, compuestos de complejo de borano orgánicos tales como un 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, preferiblemente NaCNBH₃ o NaBH₄.

25 En una realización alternativa, el derivado de hidroxialquilamidón obtenido en la etapa b) puede llevarse a una disolución opcionalmente acuosa y entonces se añade el agente biológicamente activo BA, preferiblemente una proteína. Preferiblemente, se añade posteriormente un agente reductor adecuado, tal como NaBH(OAc)₃,

borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, compuestos de complejo de borano orgánicos tales como un complejo de 4-(dimetilamina)piridina-borano, complejo de N-etildiisopropilamina-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, preferiblemente NaCNBH_3 o NaBH_4 .

5 La reacción del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) y el agente biológicamente activo BA, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en IFN alfa, G-CSF, EPO, factor IX y A1AT, en particular IFN-alfa, en la etapa c) se lleva a cabo preferiblemente a un valor de pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, en particular de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

10 La reacción del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) y el agente biológicamente activo BA, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en IFN alfa, G-CSF, EPO, A1AT y factor IX, en particular IFN alfa, en la etapa c) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 25°C, en particular a aproximadamente 0°C o a aproximadamente 5°C o a aproximadamente 10°C o a aproximadamente 21°C.

15 El tiempo de reacción en la etapa c) depende de la temperatura, la razón de derivado de HAS, en particular HES, obtenido en la etapa b) y agente biológicamente activo BA y la concentración absoluta del derivado de HAS y el agente biológicamente activo BA.

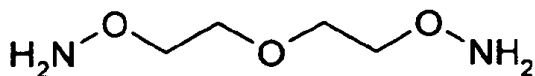
20 La razón molar de derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) con respecto a agente biológicamente activo BA en la etapa c) es generalmente de desde aproximadamente 0,1:1 hasta 200:1, preferiblemente desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 100:1 equivalentes, basándose en el peso molecular promedio en peso (M_w) del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b), preferiblemente la razón molar es de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 40:1, en particular la razón molar es de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 20:1, preferiblemente en el caso de que el agente biológicamente activo se seleccione del grupo que consiste en IFN alfa, G-CSF, EPO, A1AT y factor IX, en particular IFN-alfa.

25 En una realización preferida particular, la concentración del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) usado en la etapa c) es superior a aproximadamente el 10% m/v, en particular superior a aproximadamente el 15% m/v.

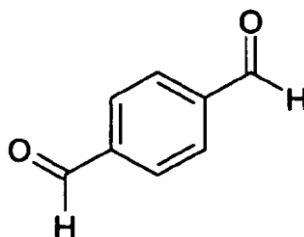
30 En una realización preferida, la concentración de agente biológicamente activo BA, en particular seleccionado del grupo que consiste en IFN alfa, G-CSF, EPO, A1AT y factor IX, en particular IFN-alfa, es superior a aproximadamente 1 mg/ml, preferiblemente superior a aproximadamente 2 mg/ml, en particular superior a aproximadamente 4 mg/ml.

El producto de reacción obtenido en la etapa c) puede aislarse con medios convencionales, tales como cromatografía de líquidos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, SEC, HPLC o cualquier otro medio. La reacción puede detenerse antes de la purificación mediante dilución, reducción de la temperatura de reacción, adición de compuestos de amino primarios, por ejemplo aminoácidos o una combinación de estos métodos.

35 En una de las realizaciones preferidas particulares, en la etapa a), se hace reaccionar hidroxialquilalmidón, preferiblemente hidroxietilalmidón, que no está oxidado, en un extremo reductor del hidroxialquilalmidón con el compuesto (D) que es



40 mediante uno de los grupos funcionales -O-NH₂, y en la etapa b) el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) se hace reaccionar mediante el grupo funcional -O-NH₂ con uno de los grupos funcionales -CH=O del compuesto (L) que es



45 El derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) anterior se hace reaccionar preferiblemente en la etapa c) con un agente biológicamente activo BA seleccionado del grupo que consiste en IFN alfa, G-CSF, EPO, factor IX y A1AT, en particular IFN-alfa, en la que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar con IFN alfa en la etapa c) en condiciones para aminación reductora, en particular en presencia de un agente reductor adecuado, tal como $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, compuestos de

complejo de borano orgánicos tales como un 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, preferiblemente se añade NaCNBH_3 o NaBH_4 .

- 5 Se ha encontrado sorprendentemente que cuando se realiza el método descrito anteriormente, en particular en las condiciones preferidas para la etapa c) tal como se describió anteriormente, el producto de reacción del derivado de hidroxialquilalmidón tal como se obtiene en la etapa b) con un agente biológicamente activo BA puede obtenerse en un alto rendimiento tal como rendimiento de hasta el 80%, como en el intervalo de desde el 70 hasta el 80%.

V. Composición farmacéutica y uso

- 10 La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante el método descrito anteriormente, en particular cuando comprende las etapas a) a la etapa c), preferiblemente, en el que el agente biológicamente activo BA se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en IFN-alfa, G-CSF, EPO, en particular IFN-alfa. La composición farmacéutica puede contener excipientes farmacéuticos habituales.

- 15 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un estado y régimen de administración dados.

En lo que se refiere a las composiciones farmacéuticas según la presente invención que comprenden el derivado de HAS que comprende BA', tal como se describió anteriormente, los derivados de HAS pueden usarse en combinación con un excipiente farmacéutico. Generalmente, el derivado de HAS estará en una forma sólida que puede combinarse con un excipiente farmacéutico adecuado que puede estar en forma o bien sólida o bien líquida. Como excipientes, pueden mencionarse hidratos de carbono, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos. Un hidrato de carbono tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar puede estar presente como excipiente. Los excipientes de hidrato de carbono específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol y similares. El excipiente también puede incluir una sal inorgánica o tampón tal como ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica según la presente invención puede comprender también un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano, tal como, por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol fenilético, nitrato fenilmercurio, timerosal y combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica según la presente invención puede comprender también un antioxidante, tal como, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, sulfoxilato formaldehído de sodio, metabisulfito de sodio y combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica según la presente invención puede comprender también un tensioactivo tal como, por ejemplo, polisorbato, o ésteres de sorbitano plurónicos; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, ésteres grasos y ácidos de fosfatidiletanolaminas; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA o zinc. La composición farmacéutica según la presente invención puede comprender también ácidos o bases tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos, y/o hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio y combinaciones de los mismos. Generalmente, el excipiente estará presente en la composición farmacéutica según la presente invención en una cantidad del 0,001 al 99,999% en peso, preferiblemente del 0,01 al 99,99% en peso, más preferiblemente del 0,1 al 99,9% en peso, en cada caso basándose en el peso total de la composición farmacéutica.

La composición de la invención se usa preferiblemente en una formulación adecuada para inyección subcutánea o intravenosa o parenteral. Para esto, excipientes y portadores adecuados son por ejemplo dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, cloruro de sodio, glutamato de sodio, manitol, sorbitol, polisorbato 80, HSA y agua para inyección. La composición puede administrarse tres veces a la semana, preferiblemente dos veces a la semana, más preferiblemente una vez a la semana y lo más preferiblemente cada dos semanas.

Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 6 mg/kg de peso corporal del paciente, preferiblemente de 0,01 - 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente, más preferiblemente de 0,1 - 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en particular de 0,1 - 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o 0,2 - 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, lo más preferiblemente de 0,3 - 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y lo más preferido de 0,4 - 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal.

En general, se administra preferiblemente entre 10 μg y 6 mg , preferiblemente 10 μg y 200 μg , preferiblemente entre 15 μg y 100 μg por dosis.

La invención se refiere además a un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente, en particular que comprende las etapas a) a c) como agente terapéutico o profiláctico.

5 La invención se refiere además al uso de un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente, en particular cuando comprende las etapas a) a c) y cuando en la etapa c) el agente biológicamente activo BA es IFN-alfa, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, tal como leucemia de células pilosas, melanoma maligno, linfoma folicular y/o sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, condiloma acuminado, hepatitis B crónica y hepatitis C crónica, preferiblemente hepatitis B crónica y hepatitis C.

10 La invención se refiere además al uso de un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente, en particular cuando comprende las etapas a) a c) y cuando en la etapa c) el agente biológicamente activo BA es G-CSF, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos en pacientes seleccionados del grupo que consiste en pacientes con cáncer, tales como pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora, pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia de inducción o consolidación y/o pacientes con cáncer que reciben trasplante de médula ósea, pacientes que se someten a recogida y terapia con células progenitoras de sangre periférica, y pacientes con neutropenia crónica grave.

15 La invención se refiere además al uso de un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente, en particular cuando comprende las etapas a) a c) y cuando en la etapa c) el agente biológicamente activo BA es EPO, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de anemia, tal como de pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes infectados por VIH tratados con zidovudina, pacientes con cáncer en quimioterapia, o para la reducción de la transfusión de sangre alogénica en pacientes de cirugía .

20 La invención se refiere además al uso de un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente, en particular cuando comprende las etapas a) a c) y cuando en la etapa c) el agente biológicamente activo BA es prolactina o un mutante de la misma, para la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de cáncer, en particular cáncer de mama.

25 La invención se refiere además a un método para el tratamiento de trastornos en pacientes seleccionados del grupo que consiste en pacientes con cáncer, tales como pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora, pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia de inducción o consolidación y/o pacientes con cáncer que reciben trasplante de médula ósea, pacientes que se someten a recogida y terapia con células progenitoras de sangre periférica, y pacientes con neutropenia crónica grave; anemia, tal como de pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes infectados por VIH tratados con zidovudina, pacientes con cáncer en quimioterapia, o para la reducción de la transfusión de sangre alogénica en pacientes de cirugía; y cáncer, en particular cáncer de mama, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de hidroxialquilalmidón tal como puede obtenerse según el método tal como se describió anteriormente.

30 La invención se describe además en más detalle con los siguientes ejemplos no limitativos:

Descripción de las figuras:

35 La figura 1 muestra un análisis de los conjugados de proteína-HES 60/1.0 brutos mediante electroforesis en gel de SDS.

Carril X: Marcador de peso molecular Mark12 MW Standard (Invitrogen, Karlsruhe, D) desde la parte superior a la inferior en kDa: 200, 116, 97, 66, 55, 37, 31, 22, 14, 6, 3,5, 2,5.

Carril A: 3,7 µg de IFNα

Carril B: Síntesis de Q⁴

40 Carril C: Síntesis de Q5.

Carril Y: Marcador de peso molecular Roti®-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) desde la parte superior hasta la inferior: 200 kDa, 119 kDa, 66 kDa, 43 kDa, 29 kDa, 20 kDa, 14,3 kDa.

Carril D: Síntesis de Q8.

Carril E: Síntesis de Q9.

50 Carril F: 10 µg de IFNα.

Carril G: 5 µg de IFNα.

Carril H: 2,5 µg de IFN α .

Carril I: 1 µg de IFN α .

La figura 2 muestra un análisis de los conjugados de proteína-HES 100/1.0 brutos mediante electroforesis en gel de SDS.

- 5 Carril X: Marcador de peso molecular Roti®-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) desde la parte superior a la inferior: 200 kDa, 119 kDa, 66 kDa, 43 kDa, 29 kDa, 20 kDa, 14,3 kDa.

Carril A: Síntesis de R83.

Carril B: Síntesis de R84.

Carril C: Síntesis de R85.

- 10 La figura 3 muestra un gráfico de la actividad proliferativa de Intron A frente al patrón de NIH según el ejemplo 6.1.

La figura 4 muestra un gráfico de la actividad *in vitro* de HES-IFN-alfa según el ejemplo 6.2.

La figura 5 muestra un gráfico de la semivida de HES-IFN-alfa según el ejemplo 7.2.

La figura 6 muestra un análisis de las reacciones de conjugación de HES-G-CSF según el ejemplo 8 mediante electroforesis en gel de SDS.

- 15 Carril M: Marcador de peso molecular Mark12 MW Standard (Invitrogen, Karlsruhe, D) desde la parte superior hasta la inferior en kDa: 200, 116, 97, 66, 55, 37, 31, 22, 14, 6, 3,5, 2,5.

Carril 1: 10 µg de mezcla de reacción HES60/0.7-G-CSF

Carril 2: 10 µg de mezcla de reacción HES60/1.0-G-CSF

Carril 3: 10 µg de mezcla de reacción HES100/1.0-G-CSF

- 20 Carril 4: 10 µg de mezcla de reacción HES100/1.3-G-CSF

Carril 5: 5 µg de rh-metG-CSF

La figura 7 muestra un análisis de los conjugados de proteína-HES 60/1.3 brutos obtenidos según el ejemplo 9 mediante electroforesis en gel de SDS.

- 25 Carril X: Marcador de peso molecular Roti®-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) desde la parte superior a la inferior en kDa: 245, 123, 77, 42, 30, 25,4, 17.

Carril A: 10 µg de mezcla de reacción HES60/1.3-EPO

Parte experimental:

Especificaciones de derivados de HES y HES:

M_w: Peso molecular promedio en peso

- 30 M_n: Peso molecular promedio en número

Se determinan M_w y M_n mediante cromatografía de permeación en gel en combinación con un detector de dispersión de luz

MS = Sustitución molar: Número promedio de sustituyentes de hidroxietilo por residuo de glucosa anhidra de HES

- 35 Se determina MS mediante cromatografía de gases tras la hidrólisis total de la molécula de HES. No se determinaron experimentalmente los valores de MS para aldehído-HES. Se facilitan en su lugar valores de MS del material de partida de HES respectivo. Se supone que el valor de MS no se ve afectado durante el procedimiento de derivatización.

HES 60/1.0:

HES 60/1.0 (Supramol Parenteral Products GmbH, Rosbach)

M_w: 62 kDa

M_n: 35 kDa

MS: 1,01

Aldehído-HES- 60/1.0 (Sintetizado tal como se describe en el ejemplo 1.2b)

M_w: 63 kDa

M_n: 35 kDa

MS: 1,01

HES100/1.0:

5 HES 100/1.0 (Supramol Parenteral Products GmbH, Rosbach)

M_w: 93 kDa

M_n: 41 kDa

MS: 1,01

Aldehído-HES 100/1.0 (Sintetizado tal como se describe en el ejemplo 1.2a)

M_w: 92 kDa

M_n: 41 kDa

MS: 1,01

Especificación de IFN α :

Interferón Alfa-2b, que se describe en la Farmacopea Europea:

Disolución concentrada de interferón alfa-2b, Ph.Eur. 01/2002:1110

10 **Ejemplo 1 Síntesis de derivados de aldehído-HES 60/1.0 y 100/1.0**

Ejemplo 1.1 Preparación de hidroxilamino-HES 60/1.0 y 100/1.0 a partir de HES 60/1.0 y 100/1.0

15 Se disolvió HES A (B g, MW = C kDa, lote D, proveedor Supramol Parenteral Products GmbH, Rosbach, D) en tampón de reacción (F ml, acetato de sodio 0,1 M, pH 5,2), preparado a partir de agua Ampuva (Fresenius-Kabi, Bad Homburg, D), y se añadió O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina (G g, preparada tal como se describe en Boturyn *et al.* Tetrahedron 53 (1997) p. 5485-5492 en 2 etapas a partir de materiales de partida disponibles comercialmente). Tras agitar a temperatura ambiente durante H h, se añadió la mezcla de reacción a 2-propanol (I ml). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C. Se disolvió el producto bruto en agua (J ml), se dializó durante 50 h frente agua Milli-Q (tubos de diálisis SnakeSkin, 10 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del L%.

20

Ejemplo	A	B [g]	C [kDa]	D	F [ml]	G [g]	H [h]	I [ml]	J [ml]	L [%]
1.1a	100/1.0	15,46	93	538	155	2,12 4	21,5	1085	155	96
1.1b	100/1.0	10,13	93	538	100	1,42 1	23	700	100	94
1.1c	60/1.0	20,02	62	539	200	4.56 7	23	1400	200	93

Ejemplo 1.2 Preparación de aldehído-HES 60/1.0 y 100/1.0 a partir de hidroxilamino-HES 60/1.0 y 100/1.0

Se disolvió hidroxilamino-HES A (B g, MW = C kDa, preparado tal como se describe en el ejemplo D) en E ml de DMF (calidad para síntesis de péptidos, Biosolve, Valkenswaard, NL) y se añadió tereftalaldehído (F g, Lancaster

Synthesis, Frankfurt/ Main, D). Tras agitar durante G h a temperatura ambiente, se añadió lentamente la mezcla de reacción a una mezcla 1:1 de acetona y etanol (H ml, v/v). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se redisolvió en DMF (E ml) y se precipitó con una mezcla de acetona y etanol (H ml, v/v) tal como se describió anteriormente. Tras la centrifugación, se disolvió el precipitado en agua (E ml, Milli-Q), se dializó durante I h frente a agua Milli-Q (tubos de diálisis SnakeSkin, 10 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. El rendimiento del producto aislado fue del M%.

Tabla 2: Síntesis de derivados de aldehído-HES

Ejemplo	A	B [g]	C [kDa]	D	E [ml]	F [g]	G [h]	H [ml]	I [ml]	M [%]
1.2a	100/1.0	21,97	99,0	1.1a, 1.1b	220	2,987	21,5	1540	47	100
1.2b	60/1.0	17,30	59,6	1.1c	170	3,891	21,5	1200	47	96

Ejemplo 2 Síntesis de conjugados de HES (60/1.0)-IFN α

10 Ejemplo 2.1 Síntesis de conjugado de HES (60/1.0)-IFN α (lote: Q4)

Intercambio de tampón

Se centrifugó la disolución de IFN α (5,32 ml, 10 mg, 1,88 mg/ml) a 20°C durante 20 min. a 7.500 x g en un concentrador Amicon Ultra-4 (Millipore, 5 kDa MWCO). Se repitió el procedimiento de lavado tres veces mediante dilución de la disolución residual con tampón de reacción (acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0) a 5 ml y centrifugación durante 16 min. tal como se describe. Se ajustó el volumen final a 1,15 ml (concentración calculada de 8,7 mg/ml) con tampón de reacción. No se comprobó experimentalmente la concentración de proteína.

Conjugación

Se disolvió aldehído-HES 60/1,0 (623 mg, preparado tal como se describe en el ejemplo 1.2b, 20 equiv.) en disolución de proteína (1,15 ml, 8,7 mg/ml, preparada tal como se describió anteriormente) y se mezcló la mezcla concienzudamente con una pipeta. Tras la incubación durante 15 min. sobre hielo, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio enfriada previamente (40 μ l, 1,24 M en tampón de reacción, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se incubó la mezcla de reacción durante 6 h a 0°C. Se observó precipitación con la adición de cianoborohidruro de sodio. Se extinguió la reacción añadiendo 3 ml de tampón de reacción y 2,97 ml de una disolución de acetato de sodio 0,1 M que contenía lisina 350 mM (Merck, Darmstadt, D). Se diluyó la mezcla hasta 10 ml con tampón de reacción y se almacenó sobre hielo durante la noche antes de la purificación. Se analizó la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE (véase la figura 1).

Ejemplo 2.2 Síntesis de conjugado de HES (60/1.0)-IFN α (lote: Q5)

Intercambio de tampón

Se centrifugó la disolución de IFN α (5,32 ml, 10 mg, 1,88 mg/ml) a 20°C durante 20 min. a 7.500 x g en un concentrador Amicon Ultra-4 (Millipore, 5 kDa MWCO). Se repitió el procedimiento de lavado tres veces mediante dilución de la disolución residual con tampón de reacción (acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0) a 5 ml y centrifugación durante 16 min. tal como se describe. Se ajustó el volumen final a 0,926 ml (concentración calculada de 10,8 mg/ml) con tampón de reacción. No se comprobó experimentalmente la concentración de proteína.

Conjugación

Se disolvió aldehído-HES 60/1.0 (309 mg, preparado tal como se describe en el ejemplo 1.2b, 10 equiv.) en disolución de proteína (0,926 ml, 10,8 mg/ml, preparado tal como se describió anteriormente) y se mezcló la mezcla concienzudamente con una pipeta. Se añadió disolución de cianoborohidruro de sodio enfriada previamente (20,3 μ l, 1,24 M en tampón de reacción, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se incubó la mezcla de reacción durante 2 h a 21°C. Se extinguió la reacción añadiendo 3 ml de tampón de reacción y 1,5 ml de una disolución de acetato de sodio 0,1 M y que contenía lisina 350 mM (Merck, Darmstadt, D). Se diluyó la mezcla hasta 10 ml con tampón de reacción y se almacenó durante la noche sobre hielo antes de la purificación. Se analizó la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE (véase la figura 1).

Ejemplo 2.3 Síntesis de conjugado de HES (60/1.0)-IFN α (lote: Q8)

Intercambio de tampón

Se centrifugó la disolución de IFN α (5,32 ml, 10 mg, 1,88 mg/ml) a 20°C durante 45 min. a 3,939 x g en un concentrador de 6 ml Vivaspín (Viva Science, 5 kDa MWCO, Hannover, D). Se repitió el procedimiento de lavado

tres veces mediante dilución de la disolución residual con tampón de reacción (acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0) a 6 ml y centrifugación durante 40 min. tal como se describe. Se ajustó el volumen final a 1,0 ml (concentración calculada de 10 mg/ml) con tampón de reacción. No se comprobó experimentalmente la concentración de proteína.

Conjugación

- 5 Se disolvió aldehído-HES 60/1.0 (232 mg, preparado tal como se describe en el ejemplo 1.2b, 7,5 equiv.) en disolución de proteína (1,0 ml, 10 mg/ml, preparada tal como se describió anteriormente) y se mezcló la mezcla concienzudamente con una pipeta. Tras la incubación durante 15 min. sobre hielo, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio enfriada previamente (100 μ l, 200 mM en tampón de reacción, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se incubó la mezcla de reacción durante 7 h a 10°C. Se extinguió la reacción con 100 equiv. de lisina (1,95 ml, clorhidrato de lisina 0,2 M (Fluka Biochemica, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) en tampón de reacción, pH 4,0) y metionina 10 mM (650 μ l, metionina 0,1 M (Fluka Biochemica, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) en tampón de reacción, pH 4,1). Se diluyó la mezcla hasta 6,5 ml con tampón de reacción y se almacenó durante la noche sobre hielo antes de la purificación. Se analizó la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE (véase la figura 1).

15 **Ejemplo 2.4** Síntesis de conjugado de HES (60/1.0)-IFN α (lote Q9)

Intercambio de tampón

Se intercambió el tampón de la disolución de IFN α (5,32 ml, 10 mg, 1,88 mg/ml) con un concentrador de 6 ml Vivaspin por acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0 tal como se describe en el ejemplo 2.3 y se incubó la disolución en el concentrador durante 15 min. a 0°C.

20 Conjugación

- Se añadió una disolución de aldehído-HES (155 mg, preparado tal como se describe en el ejemplo 1.2b, 5 equiv. en 5 ml de tampón de reacción (acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0), enfriado previamente sobre hielo) y se centrifugó la mezcla durante 2,5 h a 3,939 x g y 10°C. Se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio enfriada previamente (5 ml, 20 mM en tampón de reacción, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) al volumen restante de aproximadamente 700 μ l de mezcla de reacción. Se centrifugó la disolución durante 18 h a 3939 x g y 10°C y se almacenó sobre hielo antes de la purificación. Se analizó la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE (véase la figura 1).

Ejemplo 3 Síntesis de conjugados de HES (100/1.0)-IFN- α

Ejemplo 3.1 Síntesis de conjugado de HES (100/1.0)-IFN α (lote R83)

- 30 Se dividió en partes iguales la disolución madre de IFN α (19,68 ml, 37 mg, 1,88 mg/ml) en dos concentradores Vivaspin 15R (Viva Science, 5 kDa MWCO, Hannover, D), se diluyó con tampón de reacción (tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0, preparado con agua Ampuwa (Fresenius-Kabi, Bad Homburg, D)) hasta 18 ml cada una y se centrifugaron a 21°C durante 36 min. a 3939 x g. Se repitió el procedimiento de lavado tres veces mediante dilución de las disoluciones residuales con el tampón de reacción a 18 ml y centrifugación durante 35 min. tal como se describe. Se ajustó el volumen combinado de las soluciones de proteína a 3,47 ml con tampón de reacción (concentración de proteína calculada de 10,8 mg/ml). No se comprobó experimentalmente la concentración de proteína.

- 40 Se disolvió aldehído-HES 100/1.0 (1,156 g, preparado tal como se describe en el ejemplo 1.2a, 12 equiv.) en tampón de reacción (1,628 ml) y se añadió la disolución de proteína (1,736 ml, 10,8 mg/ml, preparada tal como se describió anteriormente). Tras la incubación durante 30 min. a 0°C, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio enfriada previamente (100 μ l, 58,2 mg/ml en tampón de reacción, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se mezcló la mezcla concienzudamente. Se formaron pequeñas cantidades de un precipitado fino con la adición de NaCNBH₃. La disolución se clarificó durante el mezclado, se ajustó su volumen hasta 4,6 ml con tampón de reacción y se incubó la mezcla durante 18 h a 0°C. Se analizó la mezcla de reacción mediante SDS PAGE (véase la figura 2).

Ejemplo 3.2 Síntesis de conjugado de HES (100/1.0)-IFN α (lote R84)

- 50 Se disolvió HES-aldehído 100/1.0 (462 mg, preparado tal como se describe en el ejemplo 1.2a, 4,8 equiv.) en la disolución de proteína (1,736 ml, 10,8 mg/ml, preparada tal como se describe en el ejemplo 3.1). Tras la incubación durante 30 min. a 0°C, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio enfriada previamente (50 μ l, 58,2 mg/ml en tampón de reacción, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se mezcló la mezcla concienzudamente. Se formaron pequeñas cantidades de un precipitado fino con la adición de NaCNBH₃. La disolución se clarificó durante el mezclado, se ajustó su volumen hasta 2,3 ml con tampón de reacción y se incubó la mezcla durante 17,5 h a 5°C. Se analizó la mezcla de reacción mediante SDS PAGE (véase la figura 2).

Ejemplo 3.3 Síntesis de conjugado de HES (100/1.0)-IFN- α (lote R85)

- 5 Se diluyó la disolución madre de IFN α (10,63 ml, 20 mg, 1,88 mg/ml) con tampón de reacción (tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0, preparado con agua Ampuwa (Fresenius-Kabi, Bad Homburg, D) hasta 18 ml y se centrifugó a 21°C durante 40 min. a 3939 x g en un concentrador Vivaspin 15R (Viva Science, 5 kDa MWCO, Hannover, D). Se repitió el procedimiento de lavado tres veces mediante dilución de la disolución residual con el tampón de reacción hasta 18 ml y centrifugación durante 35 min. tal como se describe. Se ajustó el volumen de la disolución de proteína a 1,85 ml con tampón de reacción (concentración de proteína calculada de 10,8 mg/ml), se diluyeron 40 μ l hasta 1 ml con tampón de reacción y se midieron a 279 nm frente a tampón de reacción como control. Se calculó la cantidad de proteína con un coeficiente de extinción molar de 18000 y la DO₂₇₉ (0,382) a 18,9 mg dando como resultado una recuperación de proteínas del 95%.
- 10 Se disolvió HES-aldehído 100/1.0 (616 mg, preparado tal como se describe en el ejemplo 1.2a, 6 equiv.) en la disolución de proteína (1,85 ml, 10,8 mg/ml, preparada tal como se describió anteriormente). Se añadió cianoborohidruro de sodio (3,2 mg, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y se mezcló la mezcla concienzudamente. Se formaron pequeñas cantidades de un precipitado fino con la adición de NaCNBH₃. La disolución se clarificó durante el mezclado y se incubó la mezcla durante 2 h a 21°C. Se analizó la mezcla de
- 15 reacción mediante SDS PAGE (véase la figura 2).

Ejemplo 4 Análisis por SDS PAGE de conjugados de HES-IFN- α

- 20 Se investigaron muestras que contenían 10 μ g de proteína (se determinó el volumen correspondiente a partir de la concentración de proteína calculada en cada mezcla de reacción) de las mezclas de reacción obtenidas a partir del ejemplo 2 y 3. Se emplearon un instrumento XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y una fuente de energía Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B) para electroforesis en gel de SDS. Se usaron un gel de Bis-Tris al 4-12% junto con un tampón de ejecución MOPS SDS en condiciones reductoras (ambos de Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5 Purificación de los conjugados de IFN-alfa-HES

5.1 Purificación de HES-IFN- α

- 25 Se realizó la purificación de todas las muestras a temperatura ambiente usando un equipo AKTA explorer 10. Se trató la columna que contenía 10 ml de Q-Sepharose Fast Flow un día antes de su uso con NaOH 1 M y a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se regeneró y después de eso se equilibró con tampón A (Tris/HCl 20 mM, pH 8,0). Se diluyeron las muestras 1:8 con tampón A en condiciones estériles y se aplicaron usando la bomba de muestras a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. Tras el lavado de la bomba de muestras con 25 ml de tampón A, se lavó
- 30 adicionalmente la columna con 30 ml de tampón A a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. Se realizó la elución usando un gradiente lineal del 0-100% de tampón B (NaCl 0,3 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0) sobre 60 ml y una ejecución isocrática con 20 ml de tampón B a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. Se regeneró la columna usando 30 ml de tampón C (NaCl 1,5 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0) seguido por 10 ml de tampón B a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. Se realizó el reequilibrado para la siguiente ejecución usando 50 ml de tampón A y una velocidad de
- 35 flujo de 1,5 ml/min.

5.2 Materiales y métodos

Equipo: ÄKTA explorer 10 (Amersham Pharmacia Biotech), con:

- Bomba P-903
- Mezcladora M-925, con cámara de 0,6 ml
- 40 Monitor UV-900, con célula de flujo de 10 mm
- Monitor pH/C-900
- Bomba P-950 (bomba de muestras)
- Software Unicorn Versión 3.21

Columna: Amersham Biosciences XK 16/20

- 45 Material de columna: Q-Sepharose Fast Flow, código n.º 17-0510-01, lote n.º 307552

Volumen de columna: 10 ml

5.2.1 Método

Tampón A: Tris/HCl 20 mM, pH 8,0

ES 2 389 323 T3

Tampón B: NaCl 0,3 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0

Tampón C: NaCl 1,5 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0

Volumen	Etapa	Tampón	Velocidad de flujo
25 ml	Equilibrado	100% de tampón A	1,5 ml/min.
	Carga de muestras		2-3 ml/min.
25 ml	Lavado de la bomba de muestras	100% de tampón A	3,0 ml/min.
30 ml	Eliminación por lavado de muestra no unida	100% de tampón A	1,5 ml/min.
	Inicio del fraccionamiento		
60 ml	Elución, gradiente lineal	0-100% de tampón B	1,2 ml/min.
20 ml	Elución, isocrática	100% de tampón B	1,2 ml/min.
30 ml	Regeneración	100% de tampón C	1,2 ml/min.
10 ml	Regeneración	100% de tampón B	1,2 ml/min.
	Detención del fraccionamiento		
50 ml	Reequilibrado	100% de tampón A	1,5 ml/min.
Detección:	280 nm, 260 nm, 220 nm		
	Conductividad		
Fraccionamiento:	Fracciones de 1,5 ml		

5.2.2 Método

Tampón A: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0

Tampón B: NaCl 0,3 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0

Tampón C: NaCl 1,5 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0

Volumen	Etapa	Tampón	Velocidad de flujo
25 ml	Equilibrado	100% de tampón A	1,5 ml/min.
	Carga de muestras		2,0 ml/min.
15 ml	Lavado de la bomba de muestras	100% de tampón A	3,0 ml/min.
30 ml	Eliminación por lavado de muestra no unida	100% de tampón A	1,5 ml/min.
	Inicio del fraccionamiento		
60 ml	Elución, gradiente lineal	0-100% de tampón B	1,2 ml/min.
20 ml	Elución, isocrática	100% de tampón B	1,2 ml/min.
30 ml	Regeneración	100% de tampón C	1,2 ml/min.
10 ml	Regeneración	100% de tampón B	1,2 ml/min.
	Detención del fraccionamiento		

50 ml Reequilibrado 100% de tampón A 1,5 ml/min.
 Detección: 280 nm, 260 nm, 220 nm
 Conductividad
 Fraccionamiento: Fracciones de 1,5 ml

5.3 Resultados

5.3.1 Muestra según el ejemplo 2.1

Purificación según el método 5.2.1

Volumen de partida: 10 ml, diluido 1:8 en tampón A = 80 ml
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS 172 Q04

- 5 Como resultado de la alta concentración de lisina en la composición de la muestra, la parte principal del conjugado de proteína no pudo unirse a la columna. Por tanto, se realizó una etapa de purificación adicional.

5.3.2 Muestra según el ejemplo 2.1

Composición de la muestra: 220 ml de fracción no retenida del ejemplo 5.3.1. Purificación según el método 5.2.1

Volumen de partida: 220 ml, diluido 1:2 en tampón A = 440 ml
 Velocidad de flujo: 3,5 ml/min. (muestra de carga)
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS174 Q04

5.3.3 Muestra según el ejemplo 2.2

- 10 Purificación según el método 5.2.1

Volumen de partida: 10 ml, diluido 1:8 en tampón A = 80 ml
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS 173 Q05

Como resultado de la alta concentración de lisina y metionina en la composición de la muestra, la parte principal del conjugado de proteína no pudo unirse a la columna. Por tanto, se realizó una etapa de purificación adicional.

5.3.4 Muestra según el ejemplo 2,2

Composición de la muestra: 220 ml de fracción no retenida del ejemplo 5.3.3. Purificación según el método 5.2.1

Volumen de partida: 220 ml, diluido 1:2 en tampón A = 440 ml
 Velocidad de flujo: 3,5 ml/min. (muestra de carga)
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS177 Q05

- 15 **5.3.5 Muestra según el ejemplo 2.3**

Purificación según el método 5.2.1

Volumen de partida: 6,5 ml, diluido 1:3 en tampón A = 20 ml
 Ejecución n.º QS 176 Q08

5.3.6 Muestra según el ejemplo 2.4

Purificación según el método 5.2.1

Volumen de partida: 0,8 ml, diluido 1:25 en tampón A = 20 ml
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS 175 Q09

5.3.7 Muestra según el ejemplo 3.1

Purificación según el método 5.2.2

Volumen de partida: 4,6 ml, diluido 1:17 en tampón A = 80 ml, ajustado con 48 µl de disolución de amoníaco al 12,5% a pH 8-8,5
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS183 R83

5 **5.3.8** Muestra según el ejemplo 3.2

Purificación según el método 5.2.2

Volumen de partida: 2,3 ml, diluido 1:17 en tampón A = 40 ml, ajustado con 48 µl de disolución de amoníaco al 12,5% a pH 8-8,5
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS1184 R84

5.3.9 Muestra según el ejemplo 3.3

Purificación según el método 5.2.2

Volumen de partida: 2,5 ml, diluido 1:17 en tampón A = 80 ml, ajustado con 48 µl de disolución de amoníaco al 12,5% a pH 8-8,5
 fracciones: 80/1,5 ml
 Ejecución n.º: QS177 R85

5.4 Comparación de los resultados

- 10 Se determinaron las concentraciones de proteína a partir de fracciones reunidas del ejemplo 5.3 Fracciones: Q4 8-24; Q5 8-23; Q8 9-24; Q9 7-16; R83 9-20; R84 9-20; R85 9-20 Se determinó la concentración de proteína en RP-HPLC a 280 nm y 221 nm. Se realizó la cuantificación con un patrón de IFN-α externo con una función de calibración. Se realizó el cálculo de la concentración determinada fotométricamente usando el coeficiente de extinción $\epsilon = 0,9054 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- 15 Como patrón, se usó interferón α CRS-IFN- α -2b, que tenía una concentración de proteína de 1,724 mg/ml. Se usaron para la calibración concentraciones de 10 µg, 20 µg y 40 µg. Se calculó la calibración a partir del área media de dos inyecciones de los patrones de calibración. Para calcular la concentración de proteína de las muestras, se realizaron dos inyecciones y se calculó el área media.

Código de muestra	Conc. (fotómetro) (280 nm)			Conc. (HPLC) (280 nm)			Conc. (HPLC) (221 nm)			Rendimiento (%) (HPLC 221 nm)
		total			total			total		
	[mg/ml]	[mg]	[ml]	[mg/ml]	[mg]	[ml]	[mg/ml]	[mg]	[ml]	

Q4	2,18	6,5	3	1,74	5,2	3	1,02	3,1	3	36
Q5	2,14	8,6	4	1,88	7,5	4	1,06	4,2	4	49
Q8	2,29	13,7	6	1,88	11,3	6	1,09	6,5	6	73
Q9	2,62	15,7	6	2,08	12,5	6	1,14	6,8	6	76
R83	-	-	-	2,14	21,4	10	1,23	12,3	10	72
R84	-	-	-	2,09	20,9	10	1,22	12,2	10	71
R85	-	-	-	2,19	21,9	10	1,28	12,8	10	70

Para todas las investigaciones adicionales, la concentración de proteína se refiere al valor de HPLC (221 nm).

Ejemplo 6: Descripción del bioensayo de actividad antiviral de IFN alfa

Descripción del procedimiento de prueba: Actividad antiviral de interferón-alfa

5 Tras diluir previamente las muestras de prueba en medio de cultivo celular, se prepararon diluciones en serie de dos veces. En placas de microtitulación de 96 pocillos, se añadió interferón diluido (en cuatro veces por dilución) a células MDBK recién tripsinizadas (40.000 células por pocillo). Se incubaron los ensayos durante 24 horas a 37°C (volumen total por pocillo: 175 µl).

10 Posteriormente, se añadieron 50 µl de disolución madre de VSV diluida a cada pocillo (excepto para los pocillos control positivo) dando como resultado una multiplicidad de infección de 0,1.

Se incluyeron los siguientes controles en cada ensayo: 12 pocillos que recibieron virus más medio de cultivo celular en lugar de interferón (control negativo) y 12 pocillos que recibieron medio de cultivo celular en lugar de interferón y virus (control positivo).

Se incubaron los ensayos durante 42 horas a 37°C.

15 Al final del periodo de incubación, se reemplazó el sobrenadante de cultivo celular de cada pocillo por 50 µl de una disolución de MTT (al menos 2 mg/ml en medio de cultivo celular). Se incubaron las células durante tres horas. Se solubilizó el colorante de formazán púrpura formado por las células en proliferación añadiendo 100 µl de disolución de isopropanol/HCl (isopropanol con HCl 40 mM) a cada pocillo. Posteriormente, se midieron los valores de absorbancia de las disoluciones a 570/630 nm en un lector de placas de microtitulación.

20 Se calculó la actividad proliferativa de células MDBK hechas crecer en presencia de interferón y VSV para cada dilución de interferón tal como sigue:

$$\frac{((\text{Absorbancia media de cuatro pocillos tratados con interferón}) - (\text{absorbancia media del control negativo})) * 100}{(\text{Absorbancia media del control positivo}) - (\text{absorbancia media del control negativo})}$$

25 Se determinó la actividad antiviral de interferón-alfa en cuatro ensayos separados para cada una de las muestras de prueba.

Ejemplo 6.1: Actividad antiviral de Intron A en relación con el patrón de NIH

30 En todos los experimentos, se usó Intron A (IFN-alfa 2b, Schering-Plough), calibrado frente al patrón de NIH rhIFN-alfa 2a (NIAID, NIH, Bethesda, EE.UU., Gxa01-901-535) como referencia de laboratorio interna. El patrón de NIH tenía una actividad específica de 9.000 UI/ml. La referencia de laboratorio interna Intron A tenía una actividad específica de 8.487.000 UI/ml en la prueba.

La actividad proliferativa de Intron A en comparación con el patrón de NIH rhIFN-alfa 2a se muestra en la figura 3

Ejemplo 6.2: Actividad antiviral de conjugados de IFN-alfa-HES en relación con Intron A

35 En el sistema de ensayo descrito en el ejemplo 6, se sometieron a prueba los conjugados (Q4; Q5; Q8; Q9; R83; R84; R85) en comparación con material de partida de IFN-alfa no modificado, Intron A y Pegasys (Roche). Se calculó la concentración CPE50 de los materiales. Todos los conjugados de IFN-alfa-HES conservaban una

actividad antiviral que era sustancialmente superior a la de Pegasys.

La actividad *in vitro* relativa de conjugados de IFN-alfa-HES en comparación con material de partida de IFN-alfa no modificado e Intron A se muestra en la figura 4.

Ejemplo 7: Bioactividad *in vivo* de conjugados de IFN-alfa-HES (estudio PK en ratones)

5 Ejemplo 7.1: Influencia del suero de ratón sobre el sistema de ensayo

Se prepararon diluciones de interferón-alfa en medio de cultivo celular (control) y en suero de ratón (dilución 1:40 y dilución 1:80). Se realizó el ensayo tal como se describe en el ejemplo 6.

10 Se determinó la actividad antiviral de interferón-alfa en dos ensayos separados para el control, para suero de ratón diluido 1:40 así como para suero de ratón diluido 1:80. Los resultados indican que el suero de ratón a una dilución de 1:40 y 1:80 no afectan al bioensayo para la actividad antiviral de interferón-alfa.

Ejemplo 7.2: Estudio *in vivo* en ratones

Se sometió a prueba la actividad antiviral de suero reunido en el ensayo antiviral. Se recogió suero de dos ratones (ratones BALB/c hembra, de 8 semanas de edad) a cada tiempo, que se sacrificaron 2 h, 4 h, 12 h y 24 h tras la inyección i.v. de 30 µg/kg (basándose en el contenido en proteína) de IFN-alfa o el conjugado de IFN-alfa-HES.

15 Se descongelaron las muestras de suero y se homogeneizaron concienzudamente mediante agitación con vórtex (y se diluyeron). Se prepararon diluciones en serie de dos veces en medio de cultivo celular. Se descongeló un vial de Intron A (diluido) y se homogeneizó concienzudamente mediante agitación con vórtex. Se prepararon diluciones de dos veces en medio de cultivo celular. Se determinaron las diluciones de CE50 en el ensayo de CPE a partir de curvas de respuesta a la dosis de una serie de dilución 1:2 tal como se describe en el ejemplo 6.

20 Se determinó la semivida de los materiales en comparación con material de partida no modificado y Pegasys. Se calculó la semivida a partir de un gráfico semilogarítmico de la dilución de CE50 frente al tiempo tras la inyección. Se detectó la actividad antiviral para HES-IFN-α: Q4; Q5; Q8; Q9; R83; R84; R85 hasta 24 h. Tal como puede observarse a partir de la figura 5, la semivida se encuentra entre 6 y 8,7 h. Para IFN-alfa no modificado, la actividad antiviral del suero era demasiado baja como para calcular una semivida sérica. En K.R. Reddy *et al.* Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002) 571-586 se determinó una semivida sérica de IFN-alfa en ratas (i.v.) de 2 h.

Ejemplo 8: Síntesis de conjugados de HES-G-CSF

30 Para la reacción de acoplamiento (para las condiciones de reacción véase la tabla a continuación) se llenó con la disolución de rh-metG-CSF (por ejemplo Neupogen® o una preparación bioequivalente) formulada en un tampón acetato (10 mM, pH 4-5) un tubo Falcon de 50 ml equipado con una barra agitadora magnética. Se disolvió el derivado de aldehído-HES (al-HES) (preparado en analogía al ejemplo 1) en tampón de reacción (acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0) y se añadió lentamente gota a gota a la proteína con agitación (~200 rpm) produciendo una razón de derivado de HES/G-CSF de 30:1. Se continuó el mezclado hasta que la muestra parecía homogénea. Se inició la reacción mediante la adición de una disolución de NaCNBH₃ concentrada 25 veces (0,5 M; concentración final 20 mM) de nuevo con mezclado con un agitador. Se incubó el tubo Falcon durante la noche (16 h) sin agitación
35 adicional en un refrigerador fijado a 10°C.

Condiciones de acoplamiento para la preparación de conjugados de HES-G-CSF

al-HES (Mw/Ms)	Masa de rhG-CSF	Volumen de rh-G-CSF	Masa de al-HES	Volumen de NaCNBH ₃ 0,5 M	Volumen de tampón de reacción	Conc. de rh-G-CSF resultante.	Conc. de al-HES en % p/v
60/0,7	30 mg	16 ml	3,34 g	0,9 ml	2,0 ml	1,4 g/l	15
60/1,0	29 mg	6 ml	2,55 g	0,5 ml	3,7 ml	2,2 g/l	20
100/1,0	30 mg	16 ml	5,98 g	1,2 ml	6,7 ml	1,0 g/l	20
100/1,3	33 mg	10 ml	7,52 g	1,5 ml	18,6 ml	0,9 g/l	20

Se demostró la conjugación satisfactoria de G-CSF a HES mediante análisis por SDS-PAGE (véase la figura 6).

Ejemplo 9: Síntesis de conjugados de HES-EPO

40 Intercambio de tampón

Se centrifugó la disolución de EPO (17,5 ml, 35 mg, 2 mg/ml, por ejemplo Epocrit® o una preparación bioequivalente) a 20°C durante 30 min. a 3939 x g en un concentrador Vivaspin 15R (Viva Science, 10 kDa MWCO, Hannover, D). Se repitió el procedimiento de lavado dos veces mediante dilución de la disolución residual con el tampón de reacción (acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0) hasta 18 ml y centrifugación durante 35 min. tal como se describe.

Conjugación

Se disolvió el derivado de aldehído-HES 60/1.3 (preparado en analogía al ejemplo 1, 2,893 g, 40 equiv.) en la disolución de proteína y tampón de reacción hasta un volumen final de 6,0 ml. Se mezcló concienzudamente la mezcla con una pipeta y se incubó a 0°C. Se añadió disolución de cianoborohidruro de sodio (430 µl, 300 mM en tampón de reacción, enfriado previamente hasta 0°C, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) dando una concentración de proteína calculada final de 5,4 mg/ml y una concentración de HES final del 45% [p/v] tras mezclar con una pipeta y centrifugación. Se incubó la mezcla de reacción durante 19 h sobre hielo. Se analizó una muestra de la mezcla de reacción (10 µg) mediante electroforesis en gel de SDS. Se emplearon un instrumento XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y una fuente de energía Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B) para la electroforesis en gel de SDS. Se usaron un gel de Bis/Tris al 4-12% junto con un tampón de ejecución MOPS en condiciones reductoras (ambos de Invitrogen, Karlsruhe, D) según las instrucciones del fabricante.

Se demostró la conjugación satisfactoria de EPO a HES mediante análisis por SDS-PAGE (véase la figura 7).

Lista de referencias

- 20 - Sommermeyer *et al.*, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278
- Weidler *et al.*, 1991, *Arzneimittelforschung/Drug Res.*, 41, 494-498
- Documento DE 26 16 086
- Spivak y Hogans, 1989, *Blood* 73, 90
- McMahon *et al.*, 1990, *Blood* 76, 1718
- 25 - Documento WO 94/28024
- Documento WO 02/080979
- Documento WO 03/074087
- Documento WO 03/074088
- Documento WO 2005/014024
- 30 - Documento WO 2005/092390
- Documento WO 2004/024777
- Documento WO 2004/024776
- Documento DE 30 29 307 A1
- Documento WO 2005/092928
- 35 - Documento US 2006/0194940 A1
- Documento US 7.157.546 B2
- Documento EP 1 591 467 A1
- Documento WO 2004/022630 A2
- Documento US 6.916.962 B2
- 40 - Documento US 6.956.135 B2
- Documento WO 03/049699 A2
- Documento US 5.990.237
- Documento Klemm D. *et al*, *Comprehensive Cellulose Chemistry* vol. 2, 1998, Wiley-VCH, Weinheim, Nueva York,

especialmente el capítulo 4.4, Esterificación de celulosa (ISBN 3-527-29489-9)

- Documento WO 00/66633 A

- Documento WO 00/18893 A

- Documento US 4.454.161

5 - Documento EP 0 418 945 A

- Documento JP 2001294601 A

- Documento US 2002/065410 A

- K.R. Reddy *et al.* *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) págs. 571-586

REIVINDICACIONES

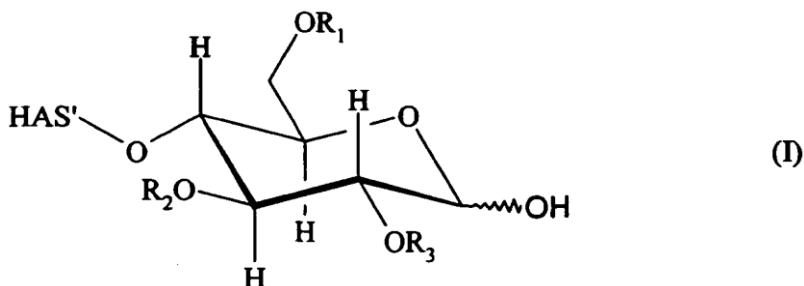
1. Método para producir un derivado de hidroxialquilalmidón (HAS), que comprende
- a) hacer reaccionar hidroxialquilalmidón opcionalmente oxidado con un compuesto (D) que comprende al menos dos grupos funcionales $-O-NH_2$ o una sal del mismo, y
- 5 b) hacer reaccionar el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) con un compuesto (L) que comprende al menos dos grupos funcionales W_1 y W_2 seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo ceto y un grupo ceto adecuadamente protegido,

en el que el compuesto (L) usado en la etapa b) tiene la estructura según fórmula (III)



en la que R_9 se selecciona de un enlace químico, preferiblemente un enlace sencillo, un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho hidroxialquilalmidón tiene la estructura según fórmula (I)

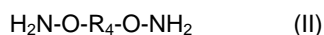


20 en la que HAS' es el resto de la molécula de hidroxialquilalmidón y R_1 , R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado.

3. Método según la reivindicación 2, en el que R_1 , R_2 y R_3 son independientemente un grupo $(CH_2CH_2O)_n-H$, en el que n es un número entero, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el hidroxialquilalmidón no se oxida antes de la reacción con el compuesto (D) o una sal del mismo en la etapa a).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto (L) comprende al menos dos grupos funcionales W_1 y W_2 seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo hemiacetal, $-CH(OH)_2$, un grupo acetal, un grupo ceto y un grupo cetal, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en un grupo hemiacetal, $-CH(OH)_2$, un grupo acetal, un grupo cetal y el grupo $-C(O)-R$, en el que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido, en el que, en el caso de que el grupo $-C(O)-R$ sea un grupo ceto, el residuo R se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y arilo C_6-C_{14} , incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n -propilo, isopropilo, n -butilo, isobutilo y $tert$ -butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el hidroxialquilalmidón se hace reaccionar con el compuesto (D) o una sal del mismo en un extremo reductor del hidroxialquilalmidón, que no se oxida antes de la reacción en la etapa a).
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto (D) o una sal del mismo se hace reaccionar mediante al menos uno de los al menos dos grupos funcionales $-O-NH_2$ con un grupo aldehído y/o hemiacetal del hidroxialquilalmidón en la etapa a).
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto (D) o una sal del mismo

se hace reaccionar mediante al menos uno de los al menos dos grupos funcionales -O-NH₂ con un extremo reductor del hidroxialquilalmidón y en el que el hidroxialquilalmidón no se oxida antes de la reacción en la etapa a).

- 5 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa a) comprende adicionalmente que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido se reduzca antes de la etapa b).
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto (L) se hace reaccionar mediante al menos uno de los al menos dos grupos funcionales W₁ y W₂ con al menos uno de los grupos funcionales H₂N-O- del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa a) o una sal del mismo.
- 10 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto (D) usado en la etapa a) tiene la estructura según fórmula (II)



15 o una sal del mismo en el que R₄ se selecciona de un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido.

13. Método según la reivindicación 12, en el que R₄ se selecciona del grupo que consiste en alquileo C₁-C₁₂, arileno C₆-C₁₄ y -[(CR₅R₆)_mO]_n[CR₇R₈]_o⁻, en el que
- 20 R₅, R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo,

m es de 2 a 4;

n es de 0 a 20; y

o es de 0 a 20, en el en el caso de que n sea 0, o no es 0.

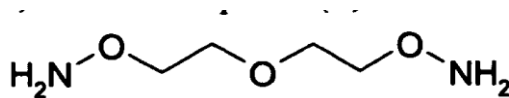
- 25 14. Método según la reivindicación 13, en el que R₄ en el compuesto (D) es -[(CR₅R₆)_mO]_n[CR₇R₈]_o⁻, en el que R₅, R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y arilo C₆-C₁₄,

m es 2;

n es 1; y

o es 2.

- 30 15. Método según la reivindicación 14, en el que el compuesto (D) usado en la etapa a) es

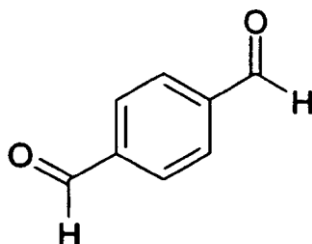


o una sal del mismo.

- 35 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que R₉ es un arileno sustituido o no sustituido o alquileo sustituido o no sustituido, en particular en el que R₉ es un arileno C₆-C₁₄ no sustituido o -(CH₂)_n-, siendo n preferiblemente 1 - 6, preferiblemente fenileno.

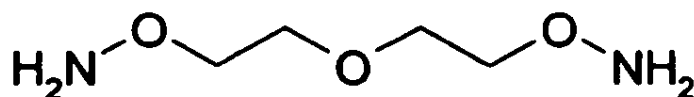
17. Método según la reivindicación 16, en el que R₉ es un arileno C₆-C₁₄ no sustituido.

18. Método según la reivindicación 17, en el que el compuesto (L) usado en la etapa b) es



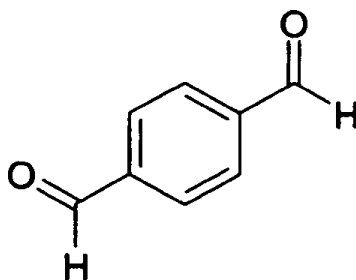
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) comprende adicionalmente que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido se reduzca.
- 5 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b)
- c) se hace reaccionar con al menos un agente biológicamente activo.
21. Método según la reivindicación 20, en el que el al menos un agente biológicamente activo usado en la etapa c) comprende al menos un grupo funcional NH₂.
- 10 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21, en el que el al menos un agente biológicamente activo usado en la etapa c) se selecciona del grupo que consiste en un péptido, polipéptido, una proteína y un derivado, fragmento o mimético funcional del polipéptido o la proteína.
- 15 23. Método según la reivindicación 22, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina (EPO), tal como EPO humana recombinante (rhEPO) o un mimético de EPO, factores estimulantes de colonias (CSF), tales como G-CSF como G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), interferón alfa (IFN alfa), interferón beta (IFN beta) o interferón gamma (IFN gamma), tal como IFN alfa e IFN beta como IFN alfa o IFN beta humano recombinante (rhIFN alfa o rhIFN beta), interleucinas, por ejemplo IL-1 a IL-18 tal como IL-2 o IL-3 como IL-2 o IL-3 humana recombinante (rhIL-2 o rhIL-3), proteínas séricas tales como factores de coagulación II-XIII como factor VIII, factor VII, factor IX, factor II, factor III, factor IV, factor V, factor VI, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, alfa-1-antitripsina (A1AT), proteína C activada (APC), activadores del plasminógeno tales como activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), tal como activador del plasminógeno tisular humano (hTPA), AT III tal como AT III humano recombinante (rhAT III), mioglobina, albúmina tal como albúmina sérica bovina (BSA), factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de trombocitos (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de células B (BCGF), factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factores de crecimiento transformante tales como TGF alfa o TGF beta, BMP (proteínas morfogénicas óseas), hormonas del crecimiento tales como hormona del crecimiento humana, factores de necrosis tumoral tales como TNF alfa o TNF beta, somatostatina, somatotropina, somatomedinas, hemoglobina, hormonas o prohormonas tales como insulina, gonadotropina, hormona estimulante de melanocitos (alfa-MSH), triptorelina, hormonas hipotalámicas tales como hormonas antidiuréticas (ADH y oxitocina así como hormonas liberadoras y hormonas inhibitoras de la liberación, hormona paratiroidea, hormonas tiroideas tales como tiroxina, tirotropina, tiroliberina, calcitonina, glucagón, péptidos similares a glucagón (GLP-1, GLP-2 etc.), exendinas tales como exendina-4, leptina, vasopresina, gastrina, secretina, integrinas, hormonas glicoproteicas (por ejemplo LH, FSH etc.), hormonas estimulantes de melanocitos, lipoproteínas y apo-lipoproteínas tales como apo-B, apo-E, apo-L_a, inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de las mismas, hirudina, inhibidor de la ruta tisular, proteínas vegetales tales como lectina o ricina, veneno de abejas, veneno de serpiente, inmunotoxinas, antígeno E, inhibidor de alfa-proteinasa, alérgeno de ambrosía, melanina, proteínas de oligolisina, proteínas RGD o receptores opcionalmente correspondientes para una de estas proteínas; prolactina o un mutante de la misma, tal como G129R, en el que el aminoácido de tipo natural en la posición 129, glicina, se reemplaza por arginina y un fragmento o derivado funcional de cualquiera de estas proteínas o receptores.
- 20 24. Método según la reivindicación 23, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina (EPO), tal como EPO humana recombinante (rhEPO), factores estimulantes de colonias (CSF), tales como G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), interferón alfa (IFN alfa), interferón beta (IFN beta), interferón gamma (IFN gamma), tal como IFN alfa o IFN beta humano recombinante (rhIFN alfa o rhIFN beta), A1AT y factor IX.
- 25 25. Método según la reivindicación 24, en el que el polipéptido es IFN alfa.
- 30 26. Método según la reivindicación 24, en el que el polipéptido es G-CSF.
- 35 40 45

27. Método según la reivindicación 24, en el que el polipéptido es EPO.
28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, en el que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar en la etapa c) con el al menos un agente biológicamente activo mediante al menos uno de los grupos funcionales W_1 y W_2 introducidos en el derivado de hidroxialquilalmidón a través del compuesto (L) en la etapa b).
29. Método según la reivindicación 28, en el que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar en la etapa c) mediante el al menos un grupo funcional $-NH_2$ del agente biológicamente activo con al menos uno de los grupos funcionales W_1 y W_2 introducidos en el derivado de hidroxialquilalmidón a través del compuesto (L) en la etapa b).
30. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 21 a 29, en el que el al menos un grupo funcional NH_2 comprendido en el al menos un agente biológicamente activo usado en la etapa c) es el grupo funcional N-terminal $-NH_2$ de un polipéptido o una proteína.
31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 30, en el que la etapa c) se realiza en condiciones de reacción para una aminación reductora.
32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 31, en el que la etapa c) se realiza con un agente reductor, preferiblemente con un borano, en particular con $NaCNBH_3$.
33. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 20 a 32, en el que en la etapa c) la razón molar de derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) con respecto a agente biológicamente activo es de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 100:1 equivalentes, basándose en el peso molecular promedio en peso (M_w) del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b).
34. Método según la reivindicación 33, en el que la razón es de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 20:1.
35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, en el que la concentración del derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) usado en la etapa c) es superior a aproximadamente el 10% m/v.
36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 35, en el que la temperatura en la etapa c) es de desde aproximadamente $0^\circ C$ hasta aproximadamente $25^\circ C$.
37. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa a) el hidroxialquilalmidón que no se oxida se hace reaccionar en un extremo reductor del hidroxialquilalmidón con el compuesto (D) que es



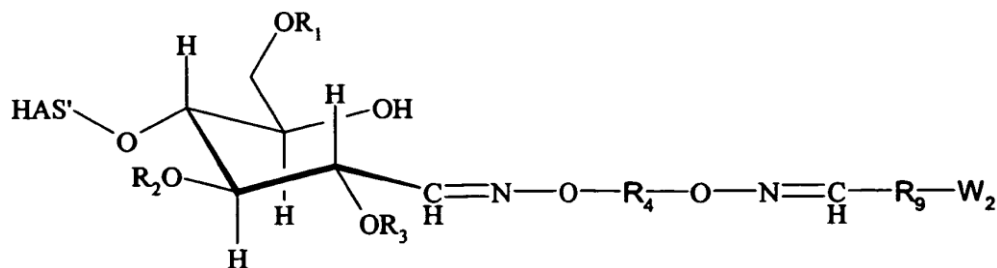
mediante uno de los grupos funcionales $-O-NH_2$, y

en la etapa b) el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar mediante el grupo funcional $-O-NH_2$ con uno de los grupos funcionales $-CH=O$ del compuesto (L) que es

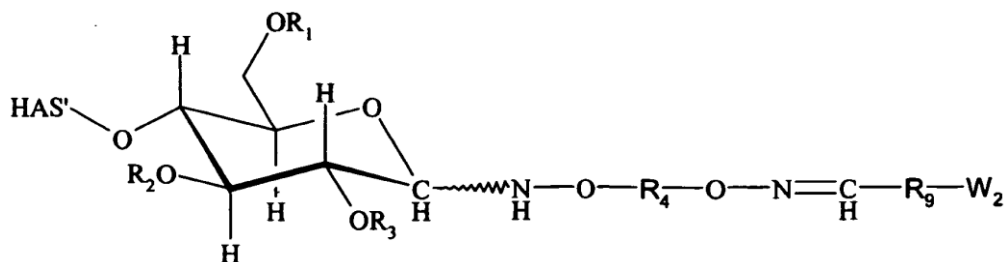


38. Método según la reivindicación 37, en el que el derivado de hidroxialquilalmidón obtenido en la etapa b) se hace reaccionar con IFN alfa en la etapa c) en condiciones para la aminación reductora, en particular en presencia de $NaCNBH_3$.
39. Derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38.

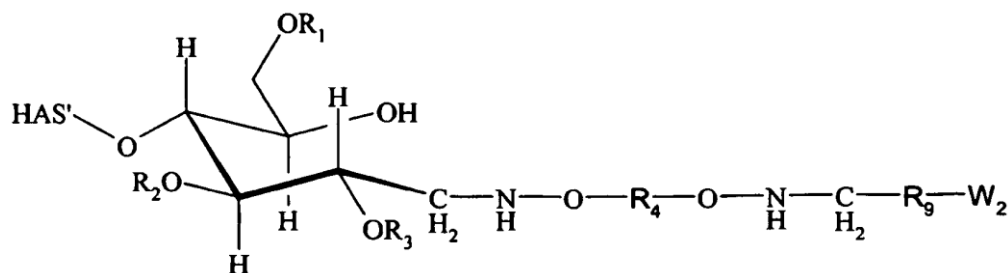
40. Derivado de HAS, preferiblemente derivado de HES, según la estructura



y/o la estructura de anillo correspondiente



5 y/o



10 en el que, más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución C₂ : C₆ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12; en el que HAS' es el resto de la molécula de hidroxialquilamidón y R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno, un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado o el grupo



20 en el que R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo, preferiblemente hidrógeno y grupo metilo,

m es de 2 a 4, en el que los residuos R¹ y R² pueden ser iguales o diferentes en los m grupos CR¹R²;

n es de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 4;

o es de 2 a 20, preferiblemente de 2 a 4, en el que los residuos R³ y R⁴ pueden ser iguales o diferentes en los o grupos CR³R⁴;

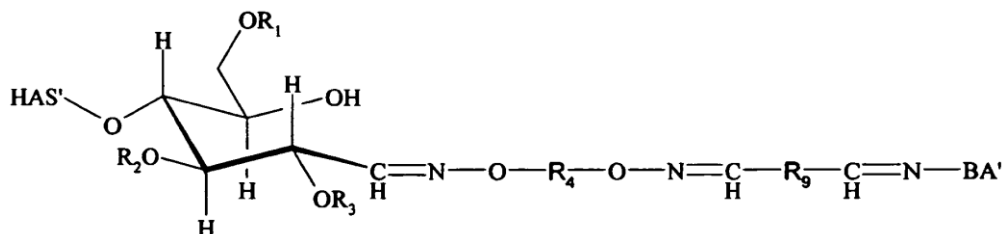
25 en el que R₄ se selecciona de un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido;

en el que R_9 se selecciona de un enlace químico, preferiblemente un enlace sencillo, un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido; y

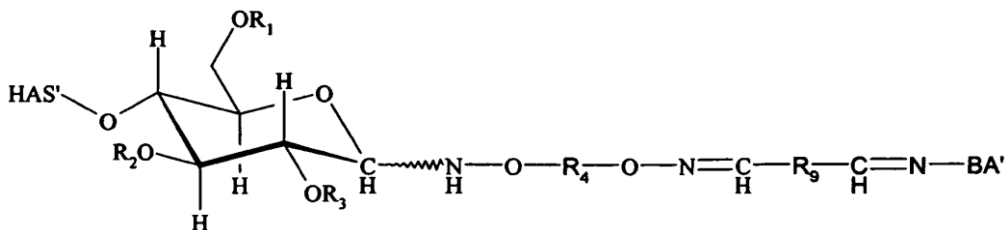
en el que W_2 se selecciona del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído adecuadamente protegido, un grupo ceto y un grupo ceto adecuadamente protegido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo hemiacetal, $-\text{CH}(\text{OH})_2$, un grupo acetal, un grupo ceto y un grupo cetal,

preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un grupo hemiacetal, $-\text{CH}(\text{OH})_2$, un grupo acetal, un grupo cetal y el grupo $-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, en el que R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado y un grupo arilo sustituido o no sustituido, en el que, en el caso de que el grupo $-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ sea un grupo ceto, el residuo R se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y arilo C_6-C_{14} , incluso más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo opcionalmente sustituido, preferiblemente no sustituido.

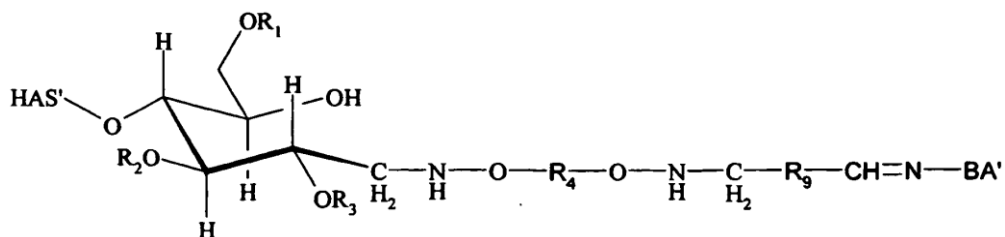
41. Derivado de HAS, preferiblemente derivado de HES, según la estructura



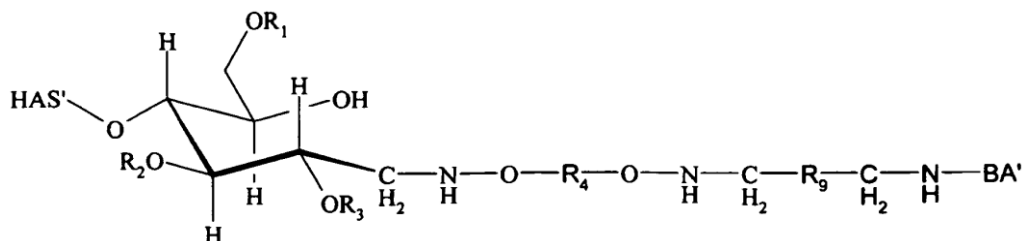
y/o la estructura de anillo correspondiente



y/o

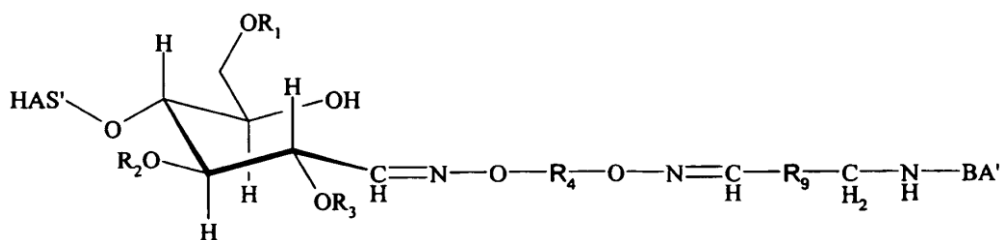


y/o

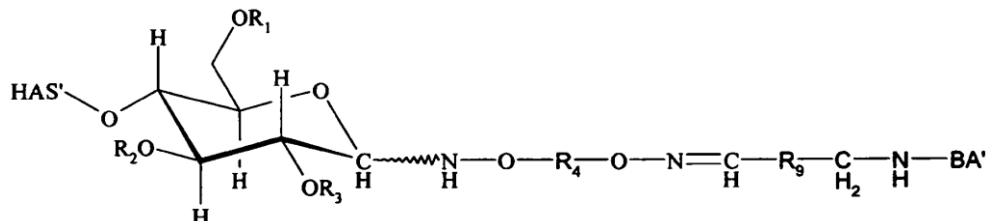


25

y/o



y/o la estructura de anillo correspondiente



5 en el que, más preferiblemente, HES tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 800 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 400 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 kDa, en particular desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 kDa, una sustitución molar de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 ó 1,3, y una razón de sustitución C₂ : C₆ de preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20, más preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 15 e incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 3 hasta 12; en el que HAS' es el resto de la molécula de hidroxialquilalmidón y R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno, un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado o el grupo



en el que R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo, preferiblemente hidrógeno y grupo metilo,

m es de 2 a 4, en el que los residuos R¹ y R² pueden ser iguales o diferentes en los m grupos CR¹R²;

n es de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 4;

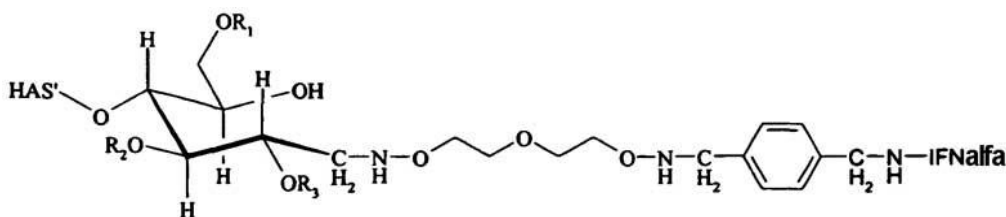
20 o es de 2 a 20, preferiblemente de 2 a 4, en el que los residuos R³ y R⁴ pueden ser iguales o diferentes en los o grupos CR³R⁴;

25 en el que R₄ se selecciona de un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido;

30 en el que R₉ se selecciona de un enlace químico, preferiblemente un enlace sencillo, un alquileo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o lineal, saturado o insaturado, que contiene posiblemente heteroátomos en la cadena de alquileo, un arileno sustituido o no sustituido y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un aralquileo sustituido o no sustituido, un alcarileno sustituido o no sustituido, y un heteroarileno sustituido o no sustituido, un heteroaralquileo sustituido o no sustituido, y un alkheteroarileno sustituido o no sustituido;

35 y en el que BA es un agente biológicamente activo, comprendiendo BA al menos un grupo funcional -NH₂, representándose BA como H₂N-BA', en el que BA' es el resto de BA, seleccionándose BA preferiblemente del grupo que consiste en eritropoyetina (EPO), tal como EPO humana recombinante (rhEPO), factores estimulantes de colonias (CSF), tal como G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), interferón alfa (IFN alfa), interferón beta (IFN beta), interferón gamma (IFN gamma), tal como IFN alfa o IFN beta humano recombinante (rhIFN alfa o rhIFN beta), A1AT y factor IX,

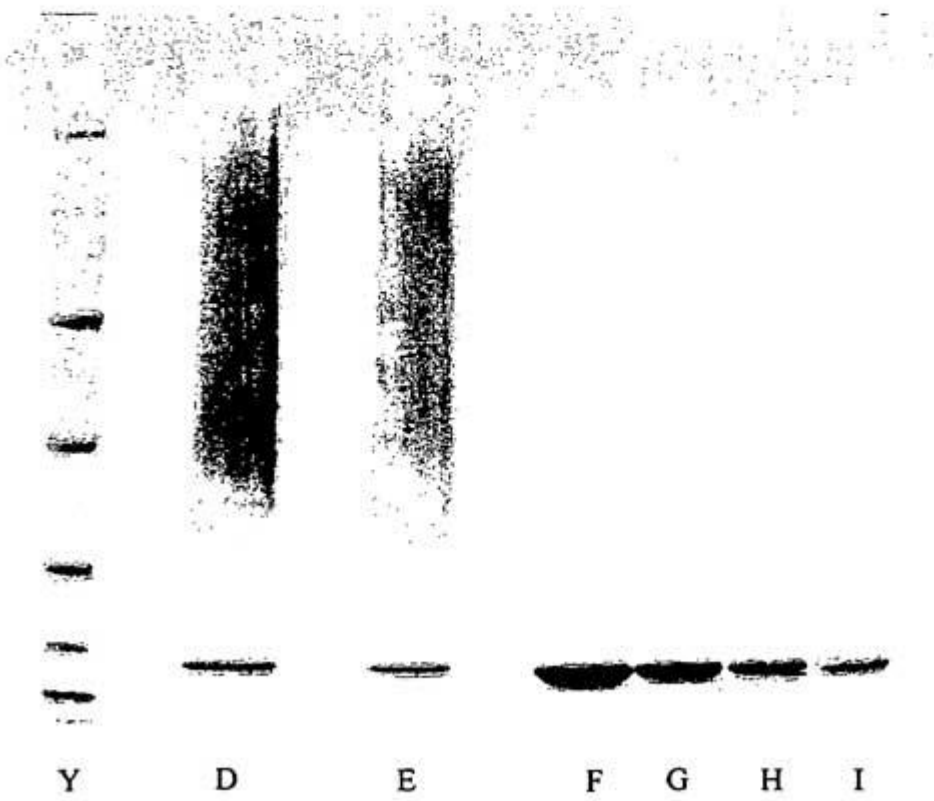
de manera especialmente preferible



42. Composición farmacéutica que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, un derivado de hidroxialquilamidón que puede obtenerse mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 38 o un derivado de hidroxialquilamidón según la reivindicación 41.
- 5 43. Composición farmacéutica según la reivindicación 42, en la que el derivado de hidroxialquilamidón puede obtenerse mediante un método según la reivindicación 25.
44. Derivado de hidroxialquilamidón que puede obtenerse mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 38, o derivado de hidroxialquilamidón según la reivindicación 41, como agente terapéutico o profiláctico.
- 10 45. Uso de un derivado de hidroxialquilamidón que puede obtenerse mediante un método según la reivindicación 25, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, tal como leucemia de células pilosas, melanoma maligno, linfoma folicular y/o sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, condiloma acuminado, hepatitis B crónica y hepatitis C crónica, preferiblemente hepatitis B crónica y hepatitis C.
- 15 46. Uso de un derivado de hidroxialquilamidón que puede obtenerse mediante un método según la reivindicación 26, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos en pacientes seleccionados del grupo que consiste en pacientes con cáncer, tales como pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora, pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia de inducción o consolidación y/o pacientes con cáncer que reciben trasplante de médula ósea, pacientes que se someten a recogida y terapia con células progenitoras de sangre periférica, y pacientes con neutropenia crónica grave.
- 20 47. Uno de un derivado de hidroxialquilamidón que puede obtenerse mediante un método según la reivindicación 27, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de anemia, tal como de pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes infectados por VIH tratados con zidovudina, pacientes con cáncer en quimioterapia o para la reducción de la transfusión de sangre alogénica en pacientes de cirugía.
- 25 48. Derivado de hidroxialquilamidón que puede obtenerse según el método según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, para el tratamiento de trastornos en pacientes seleccionados del grupo que consiste en pacientes con cáncer, tales como pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora, pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia de inducción o consolidación y/o pacientes con cáncer que reciben trasplante de médula ósea, pacientes que se someten a recogida y terapia con células progenitoras de sangre periférica y pacientes con neutropenia crónica grave; anemia, tal como de pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes infectados por VIH tratados con zidovudina, pacientes con cáncer en quimioterapia, o para la reducción de la transfusión de sangre alogénica en pacientes de cirugía.
- 30
- 35



X A B C



Y D E F G H I

Fig. 1

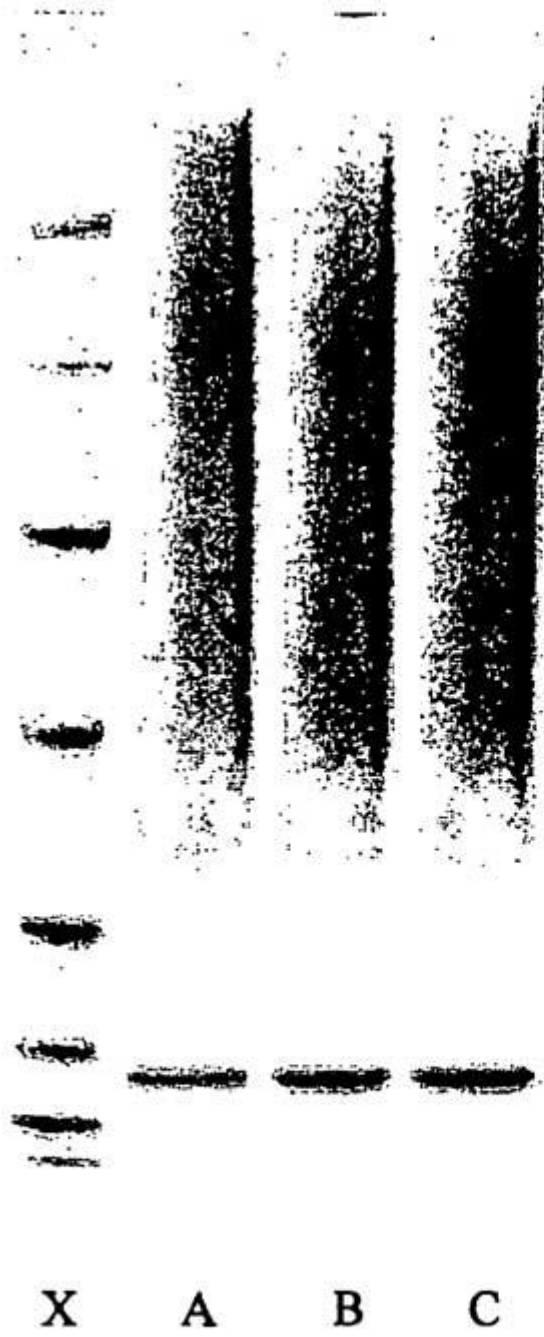


Fig. 2

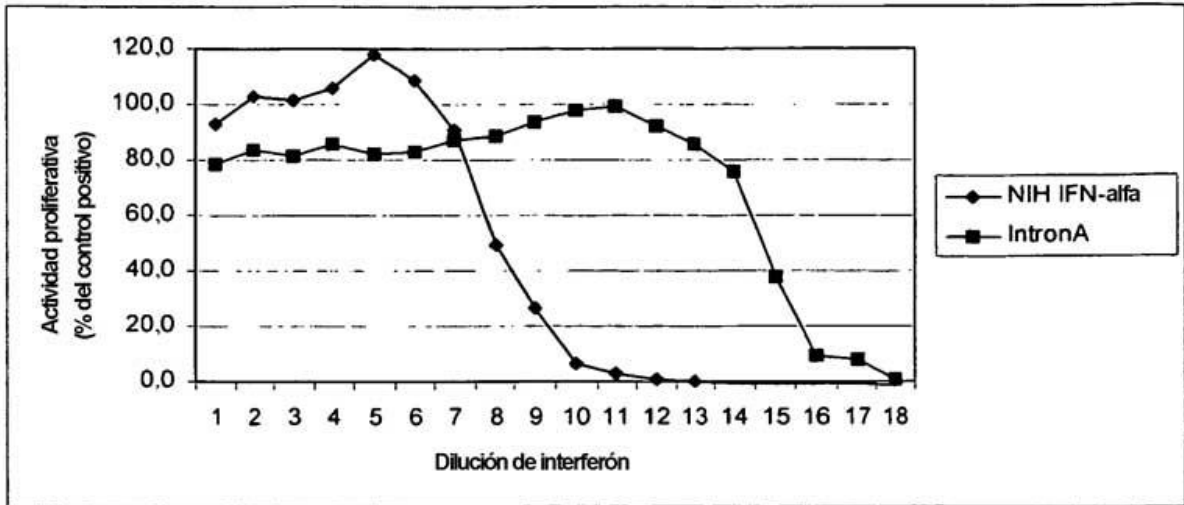


Fig. 3

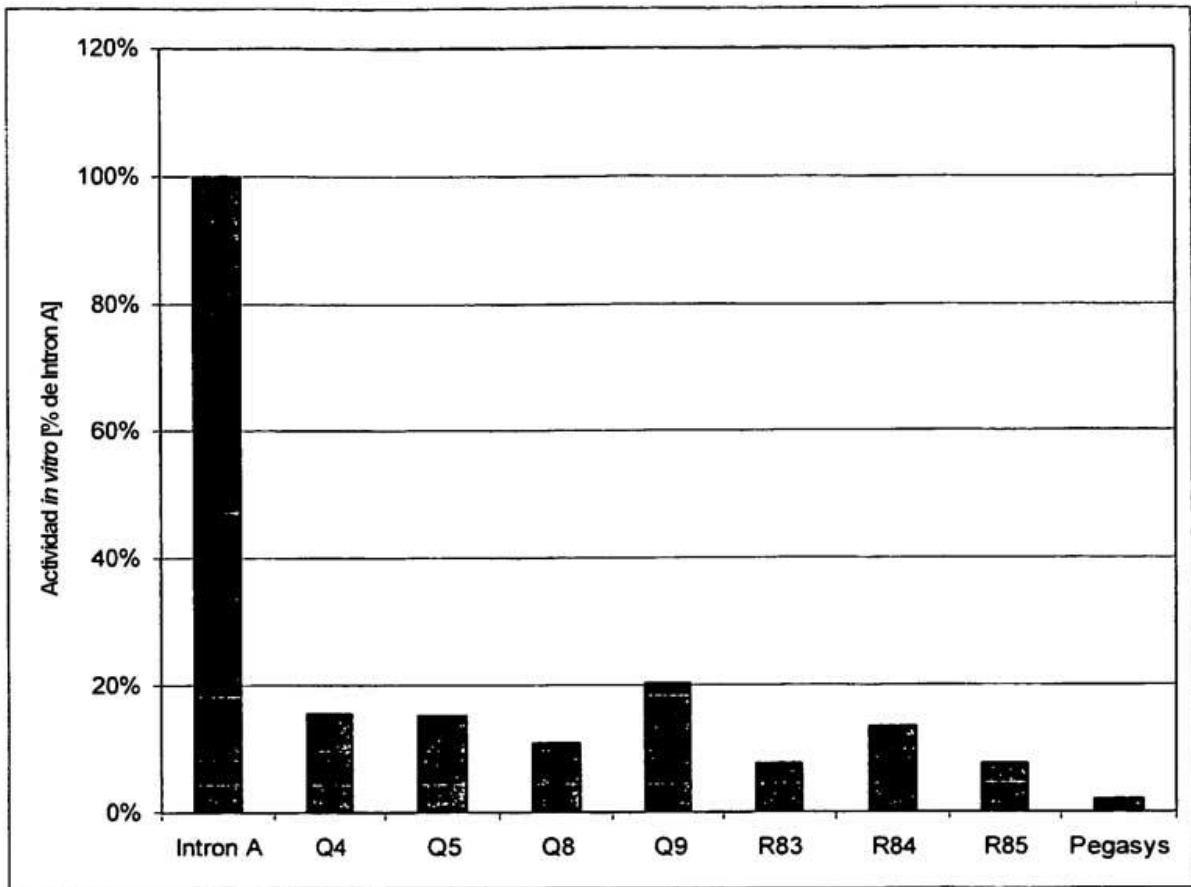


Fig. 4

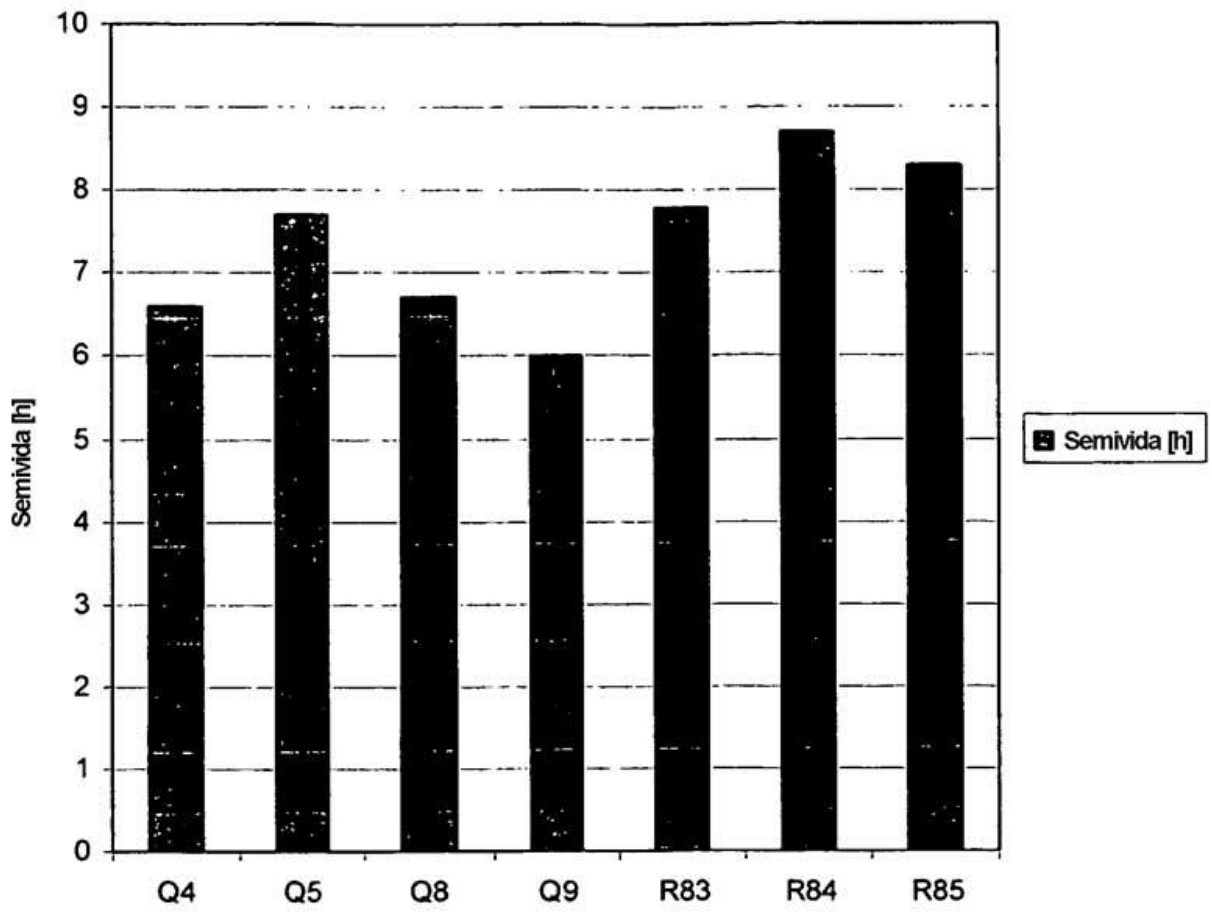


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7