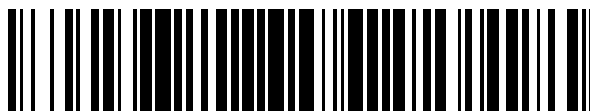


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 885**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05729248 .4**
96 Fecha de presentación: **11.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1732609**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Conjugados de hidroxialquilalmidón y una proteína**

30 Prioridad:
11.03.2004 EP 04005875
11.03.2004 US 552069 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.11.2012

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

72 Inventor/es:
ZANDER, NORBERT y
FRANK, RONALD

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

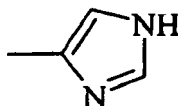
ES 2 390 885 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de hidroxialquilalmidón y una proteína

- 5 La presente invención se refiere a conjugados de un principio activo e hidroxialquilalmidón, preferiblemente hidroxietilalmidón, preparándose los conjugados mediante ligación química nativa uniendo covalentemente el hidroxialquilalmidón y el principio activo haciendo reaccionar un grupo tioéster con un grupo alfa-X-beta-amino, en el que X se selecciona del grupo que consiste en -SH y



10

La presente invención también se refiere al método de producción de estos conjugados y al uso de los conjugados.

- 15 La ligación química nativa es un método altamente eficaz para preparar péptidos grandes y proteínas pequeñas en el que se acopla un tioéster de péptido con un péptido que lleva un residuo de cisteína N-terminal para proporcionar un producto que contiene un enlace amida en el sitio de la ligación.

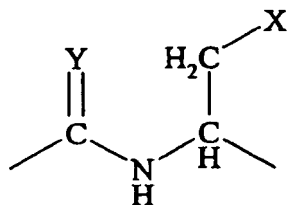
- 20 El documento WO 03/031581 A2 da a conocer un método de conjugación de un derivado de polímero con un polipéptido que tiene un residuo de cisteína o histidina en el extremo N-terminal, comprendiendo dicho método proporcionar un polipéptido que tiene un residuo de cisteína o histidina en el extremo N-terminal, proporcionar un polímero terminado en tioéster, comprendiendo el polímero una estructura principal de polímero soluble en agua y no peptídica, preferiblemente un polímero de polietilenglicol, y hacer reaccionar el derivado de polímero y el polipéptido. Como polímeros, polialquilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), polivinilpirrolidona, poli(alfa-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilormorfina), poliacrilato, poliacrilamidas, polisacáridos, y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. Todos los polímeros dados a conocer explícitamente son polímeros de polietilenglicol.

- 25 El documento WO 02/20033 describe la ligación química nativa de fragmentos peptídicos modificados con polímero. A pesar del avance de los métodos de acoplamiento y el uso de moléculas de PEG monofuncionales, una desventaja general de los fármacos pegilados es que no se conoce en detalle la ruta de metabolización de PEG como polímero no natural.

- 30 Por tanto, un objeto de la presente invención era proporcionar conjugados novedosos de un principio activo y un polímero formados mediante ligación química en los que no se usa ningún polialquilenglicol, especialmente ningún polietilenglicol como polímero.

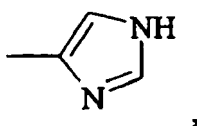
Por consiguiente, otro objeto de la presente invención era proporcionar un método para preparar esos conjugados.

- 40 Por tanto, la presente invención se refiere a un conjugado de un principio activo e hidroxialquilalmidón, en el que el principio activo y el hidroxialquilalmidón están unidos mediante un resto químico, que tiene una estructura según la fórmula (IV)

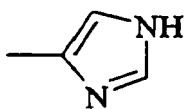


(IV)

- 45 en la que Y es un heteroátomo, seleccionado del grupo que consiste en O y S, y X se selecciona del grupo que consiste en SH y

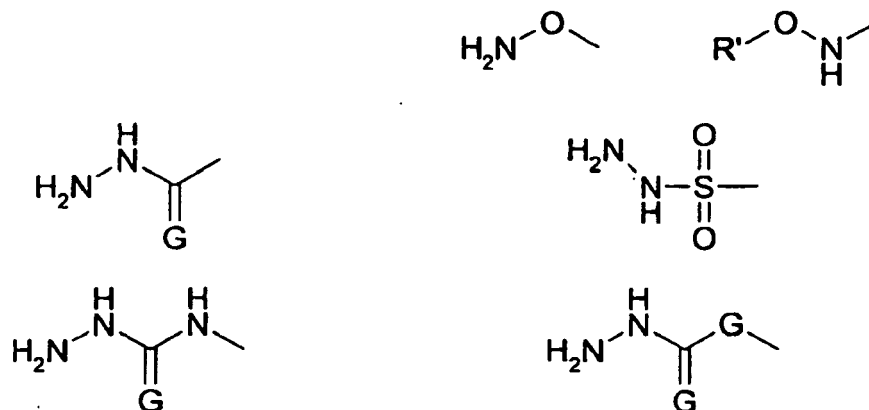


- 50 teniendo dicho conjugado una estructura según la fórmula (II)



y en la que el grupo $-(C=Y)$ se deriva del grupo tioéster $-(C=Y)-S-R'$ y el grupo $HN-CH-CH_2-X$ se deriva del grupo alfa-X-beta-amino, y en el que el grupo funcional M se selecciona del grupo que consiste en

5



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

10 Por tanto, el término "grupo alfa-X-beta-amino" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a un grupo etileno en el que X está unido a un átomo de carbono y un grupo amino primario está unido al átomo de carbono vecino.

15 En el resto químico según la fórmula (I) anterior, el grupo $-(C=Y)$ se deriva del grupo tioéster $-(C=Y)-S-R'$ y el grupo $HN-CH-CH_2-X$ se deriva del grupo alfa-X-beta-amino.

El término "principio activo" 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 activo" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a una sustancia prevista para el diagnóstico, cura, alivio, tratamiento o prevención de una enfermedad en seres humanos o animales, o para potenciar de otro modo el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, colorantes, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Los ejemplos de proteínas incluyen eritropoyetina (EPO) tal como EPO recombinante humana (rhEPO), factores estimulantes de colonias (CSF), tales como G-CSF como G-CSF recombinante humano (rhG-CSF), alfa-interferón (IFN alfa), beta-interferón (IFN beta) o gamma-interferón (IFN gamma), tales como IFN alfa e IFN beta como IFN alfa o IFN beta recombinantes humanos (rhIFN alfa o rhIFN beta), interleucinas, por ejemplo IL-1 a IL-18 tales como IL-2 o IL-3 como IL-2 o IL-3 recombinantes humanas (rhIL-2 o rhIL-3), proteínas séricas tales como factores de coagulación II-XIII como el factor VIII, alfa-1-antitripsina (A1AT), proteína C activada (APC), activadores de plasminógeno tales como activador de plasminógeno de tipo tisular (TPA), tal como activador de plasminógeno de tipo tisular humano (hTPA), AT III tal como AT III recombinante humana (rhAT III), mioglobina, albúmina tal como albúmina de suero bovino (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 transformantes tales como TGF alfa o TGF beta, BMP (proteínas morfogenéticas 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 inhibidoras de la liberación, hormona paratiroidea, hormonas tiroideas tales como tiroxina, tirotropina, tiroiberina, prolactina, calcitonina, glucagón, péptidos de tipo glucagón (GLP-1, GLP-2 etc.), exendinas tales como exendina-4, leptina, vasopresina, gastrina, secretina, integrinas, hormonas de glicoproteína (por ejemplo LH, FSH etc.), hormonas estimulantes de melanósido, lipoproteínas y apolipoproteínas 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 abeja, veneno de serpiente, inmunotoxinas, antígeno E, inhibidor de alfa-proteinasa, alérgeno de ambrosía, melanina, proteínas de oligolisina, proteínas RGD u opcionalmente receptores correspondientes para una de esas proteínas; o un derivado o fragmento funcional de cualquiera de esas proteínas o receptores. Los ejemplos de enzimas incluyen,

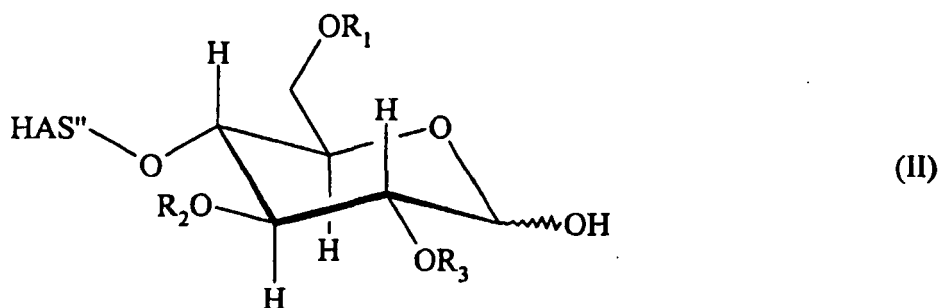
45

enzimas específicas de hidratos de carbono, enzimas proteolíticas, oxidasas, oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, cinasas y ligasas. Ejemplos específicos son asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, glutaminasa, glutaminasa-asparaginasa, fenilalanina, triptofanasa, tirosinasa, superóxido dismutasa (SOD), endotoxinasa, catalasa, peroxidasa, calicreína, tripsina, quimotripsina, elastasa, termolisina, lipasa, uricasa, adenosina difosfatasa, purina nucleósido fosforilasa, bilirrubina oxidasa, glucosa oxidasa, glucodasa, gluconato oxidasa, galactosidasa, glucocerebrosidasa, glucuronidasa, hialuronidasa, factor tisular, estreptocinasa, urocinasa, MAP-cinasas, ADNasas, ARNasas, lactoferrina y derivados o fragmentos funcionales de las mismas.

Según una alternativa de la presente invención, el principio activo es un fármaco de molécula pequeña, un péptido, y/o una proteína.

Entre otras, deben mencionarse explícitamente las siguientes proteínas: eritropoyetina (EPO) tal como EPO recombinante humana (rhEPO), factores estimulantes de colonias (CSF), tales como G-CSF como G-CSF recombinante humano (rhG-CSF), proteínas séricas tales como factores de coagulación II-XIII como factor VII, factor VIII o factor IX, alfa-1-antitripsina (A1AT), proteína C activada (APC), activadores de plasminógeno tales como activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA), tal como activador de plasminógeno de tipo tisular humano (hTPA), AT III tal como AT III recombinante humana (rhAT III).

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 (II)



en la que 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 acetal que, dependiendo por ejemplo del disolvente, puede estar en equilibrio con la forma de aldehído. 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.

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 (II), sino que también se refiere a compuestos en los que está presente al menos un grupo hidroxialquilo en cualquier lugar, o bien en el resto de hidrato de carbono terminal y/o bien en la parte restante de la molécula de almidón, HAS'', está sustituida con un grupo hidroxialquilo R₁, R₂, o R₃.

También son posibles hidroxialquilalmidones que comprenden dos o más grupos hidroxialquilo diferentes.

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

El término "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 vez de alquilo, también pueden usarse grupos alqueno lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos.

Hidroxialquilalmidón es un derivado de éter de almidón. Además de dichos derivados de éter, también pueden usarse otros derivados de 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 ácidos mono o dicarboxílicos no sustituidos con 2-12 átomos de carbono o de derivados sustituidos de los mismos. Son especialmente útiles 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.

5 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.

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

10 En la técnica se conocen 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, Esterification of Cellulose (ISBN 3-527-29489-9).

15 Según una realización preferida de la presente invención, se emplea hidroxialquilalmidón según la fórmula (II) mencionada anteriormente. Las otras estructuras de anillo de sacárido comprendidas en "HAS" pueden ser las mismas que, o diferentes de, el anillo de sacárido descrito explícitamente.

20 En cuanto a los residuos R_1 , R_2 y R_3 según la fórmula (II), no hay limitaciones específicas. Según una realización preferida, R_1 , R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, un grupo hidroxiarilo, un grupo hidroxialarquilo o un grupo hidroxialcarilo que tienen desde 2 hasta 10 átomos de carbono en el residuo alquilo respectivo o un grupo $(CH_2CH_2O)_n-H$, en el que n es un número entero, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Se prefieren hidrógeno y grupos hidroxialquilo que tienen desde 2 hasta 10. 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 4 átomos de carbono. Por tanto, "hidroxialquilalmidón" comprende preferiblemente hidroxietilalmidón, hidroxipropilalmidón e hidroxibutilalmidón, en el que se prefieren particularmente hidroxietilalmidón e hidroxipropilalmidón y lo que más se prefiere es hidroxietilalmidón.

25 Los grupos alquilo, arilo, aralquilo y/o alcarilo pueden ser lineales o ramificados y estar sustituidos de manera adecuada.

30 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y un conjugado tal como se describió anteriormente en el que R_1 , R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado con desde 2 hasta 6 átomos de carbono.

35 Por tanto, R_1 , R_2 y R_3 pueden ser preferiblemente hidroxihexilo, hidroxipentilo, hidroxibutilo, hidroxipropilo tal como 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 2-hidroxisopropilo, hidroxietilo tal como 2-hidroxietilo, hidrógeno y prefiriéndose especialmente el grupo 2-hidroxietilo.

40 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y un conjugado tal como se describió anteriormente en el que R_1 , R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo, prefiriéndose especialmente una realización en la que al menos un residuo R_1 , R_2 y R_3 es 2-hidroxietilo.

Hidroxietilalmidón (HES) es lo más preferido para todas las realizaciones de la presente invención.

45 Por tanto, la presente invención se refiere al método y al conjugado tal como se describió anteriormente, en el que el polímero es hidroxietilalmidón y el derivado de polímero es un derivado de hidroxietilalmidón.

50 El hidroxietilalmidón (HES) es un derivado de amilopectina que se produce de manera natural y se degrada mediante alfa-amilasa en el organismo. HES es un derivado sustituido del polímero de hidrato de carbono amilopectina, que está presente en el almidón de maíz a una concentración de hasta el 95% en peso. HES muestra propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de reposición de la volemia y en terapia de hemodilución en los hospitales (Sommermeyer *et al.*, 1987, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278; y Weidler *et al.*, 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498).

55 La amilopectina consiste en restos de glucosa, en los que en la cadena principal están presentes enlaces alfa-1,4-glicosídicos y en los sitios de ramificación se encuentran enlaces alfa-1,6-glicosídicos. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula se determinan principalmente por el tipo de enlaces glicosídicos. Debido al enlace alfa-1,4-glicosídico cortado, se producen estructuras helicoidales con aproximadamente seis monómeros de glucosa por giro. Las propiedades fisicoquímicas así como biológicas del polímero pueden modificarse mediante sustitución. La introducción de un grupo hidroxietilo puede lograrse mediante hidroxietilación alcalina. Adaptando las condiciones de reacción es posible aprovechar la diferente reactividad del grupo hidroxilo respectivo en el monómero de glucosa no sustituido con respecto a una hidroxietilación. Debido a este hecho, el experto puede influir sobre el patrón de sustitución hasta un grado limitado.

60 HES se caracteriza principalmente por la distribución de peso molecular y el grado de sustitución. Hay dos posibilidades para describir el grado de sustitución:

1. El grado de sustitución puede describirse con respecto a la parte de monómeros de glucosa sustituidos con respecto a todos los restos de glucosa.

5 2. El grado de sustitución puede describirse como la sustitución molar, en la que se describe el número de grupos hidroxietilo por resto de glucosa.

En el contexto de la presente invención, el grado de sustitución, indicado como DS, se refiere a la sustitución molar, tal como se describió anteriormente (véase también Sommermeyer *et al.*, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278, mencionado anteriormente, en particular pág. 273).

Las disoluciones de HES están presentes como composiciones polidispersadas, en las que cada molécula se diferencia de la otra con respecto al grado de polimerización, el número y el patrón de sitios de ramificación, y el patrón de sustitución. Por tanto, HES es una mezcla de compuestos con diferente peso molecular. Por consiguiente, una disolución de HES particular se determina por el peso molecular promedio con la ayuda de medios estadísticos. En este contexto, M_n se calcula como la media aritmética sobre el número de moléculas. Alternativamente, M_w (o M_{PM}), el peso molecular promedio en peso, representa una unidad que depende de la masa del HES.

En el contexto de la presente invención, el hidroxietilalmidón puede tener preferiblemente un peso molecular medio (peso molecular promedio en peso) de desde 1 hasta 300 kD. El hidroxietilalmidón puede mostrar además un grado de sustitución molar preferido de desde 0,1 hasta 0,8 y una razón preferida entre sustitución $C_2:C_6$ en el intervalo de desde 2 hasta 20 con respecto a los grupos hidroxietilo.

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 de LALLS-(dispersión de luz láser a ángulo bajo)-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 kD e inferiores, además, se llevó a cabo la calibración con un patrón que se había calificado previamente mediante LALLS-GPC.

Según una realización preferida de la presente invención, el peso molecular medio de hidroxietilalmidón empleado es de desde 1 hasta 300 kD, más preferiblemente desde 2 hasta 200 kD, más preferiblemente de desde 4 hasta 130 kD, más preferiblemente desde 4 hasta 100 kD y todavía más preferiblemente de desde 4 hasta 70 kD.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y a conjugados tal como se describió anteriormente en los que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón que tiene un peso molecular medio de desde 4 hasta 70 kD.

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

Según realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, el peso molecular medio del hidroxietilalmidón empleado está en el intervalo de entre más de 4 kD y menos de 70 kD, tal como de aproximadamente 10 kD, o en el intervalo de desde 9 hasta 10 kD o desde 10 hasta 11 kD o desde 9 hasta 11 kD, o aproximadamente 12 kD, o en el intervalo de desde 11 hasta 12 kD o desde 12 hasta 13 kD o desde 11 hasta 13 kD, o aproximadamente 18 kD, o en el intervalo de desde 17 hasta 18 kD o desde 18 hasta 19 kD o desde 17 hasta 19 kD, o aproximadamente 50 kD, o en el intervalo de desde 49 hasta 50 kD o desde 50 hasta 51 kD o desde 49 hasta 51 kD.

Como límite superior del grado de sustitución molar (DS), también son posibles valores de hasta 2,0 tales como 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 ó 2,0, prefiriéndose valores inferiores a 2,0, prefiriéndose más valores inferiores a 1,5, prefiriéndose todavía más valores inferiores a 1,0 tales como 0,7, 0,8 ó 0,9.

Por tanto, intervalos preferidos del grado de sustitución molar son desde 0,1 hasta 2 o desde 0,1 hasta 1,5 o desde 0,1 hasta 1,0 o desde 0,1 hasta 0,9 o desde 0,1 hasta 0,8. Intervalos más preferidos del grado de sustitución molar son desde 0,2 hasta 2 o desde 0,2 hasta 1,5 o desde 0,2 hasta 1,0 o desde 0,2 hasta 0,9 o desde 0,2 hasta 0,8. Intervalos todavía más preferidos del grado de sustitución molar son desde 0,3 hasta 2 o desde 0,3 hasta 1,5 o desde 0,3 hasta 1,0 o desde 0,3 hasta 0,9 o desde 0,3 hasta 0,8. Intervalos incluso más preferidos del grado de sustitución molar son desde 0,4 hasta 2 o desde 0,4 hasta 1,5 o desde 0,4 hasta 1,0 o desde 0,4 hasta 0,9 o desde 0,4 hasta 0,8.

En cuanto al grado de sustitución (DS), DS es preferiblemente de al menos 0,1, más preferiblemente al menos 0,2, más preferiblemente al menos 0,3 y más preferiblemente al menos 0,4. Intervalos preferidos de DS son desde 0,1 hasta 0,8, más preferiblemente desde 0,2 hasta 0,8, más preferiblemente desde 0,3 hasta 0,8 e incluso más preferiblemente desde 0,4 hasta 0,8, todavía más preferiblemente desde 0,1 hasta 0,7, más preferiblemente desde 0,2 hasta 0,7, más preferiblemente desde 0,3 hasta 0,7 y más preferiblemente desde 0,4 hasta 0,7. Valores particularmente preferidos de DS son, por ejemplo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ó 0,8, prefiriéndose más 0,2, 0,3,

0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ó 0,8, prefiriéndose incluso más 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ó 0,8, prefiriéndose todavía más 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ó 0,8 y, prefiriéndose particularmente por ejemplo 0,4 y 0,7.

5 En el contexto de la presente invención, un valor dado del grado de sustitución molar tal como 0,8 puede ser el valor exacto o puede entenderse que está en un intervalo de desde 0,75 hasta 0,84. Por tanto, por ejemplo, un valor dado de 0,1 puede ser el valor exacto de 0,1 o estar en el intervalo de desde 0,05 hasta 0,14, un valor dado de 0,4 puede ser el valor exacto de 0,4 o en el intervalo de desde 0,35 hasta 0,44, o un valor dado de 0,7 puede ser el valor exacto de 0,7 o estar en el intervalo de desde 0,65 hasta 0,74.

10 Combinaciones particularmente preferidas de peso molecular del hidroxialquilalmidón, preferiblemente hidroxietilalmidón, y su grado de sustitución DS son, por ejemplo, 10 kD y 0,4 ó 10 kD y 0,7 ó 12 kD y 0,4 ó 12 kD y 0,7 ó 18 kD y 0,4 ó 18 kD y 0,7 ó 50 kD y 0,4 ó 50 kD y 0,7 ó 100 kD y 0,7.

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

20 Un ejemplo para HES con un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es Voluven® de Fresenius. Voluven® es un coloide artificial, empleado, por ejemplo, para reposición de la volemia usada en la indicación terapéutica para la terapia y la profilaxis de la hipovolemia. Las características de Voluven® son un peso molecular medio de 130.000 +/- 20.000 D, una sustitución molar de 0,4 y una razón de C₂:C₆ de aproximadamente 9:1.

25 En cuanto a la razón de sustitución de C₂:C₆, 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.

30 Según una realización adicional de la presente invención, también pueden emplearse mezclas de hidroxietilalmidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y/o diferentes grados de sustitución y/o diferentes razones de sustitución de C₂:C₆. Por tanto, pueden emplearse mezclas de hidroxietilalmidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y diferentes razones de sustitución de C₂:C₆, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y la misma o aproximadamente la misma razón de sustitución de C₂:C₆, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y diferentes razones de sustitución de C₂:C₆, o que tienen el mismo o aproximadamente el mismo peso molecular medio y diferentes grados de sustitución y diferentes razones de sustitución de C₂:C₆, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y la misma o aproximadamente la misma razón de sustitución de C₂:C₆, o que tienen los mismos o aproximadamente los mismos pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y la misma o aproximadamente la misma razón de sustitución de C₂:C₆, o que tienen el mismo o aproximadamente el mismo peso molecular medio y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y diferentes razones de sustitución de C₂:C₆, o que tienen aproximadamente el mismo peso molecular medio y aproximadamente el mismo grado de sustitución y aproximadamente la misma razón de sustitución de C₂:C₆.

45 En diferentes conjugados y/o diferentes métodos según la presente invención, pueden emplearse diferentes hidroxialquilalmidones, preferiblemente diferentes hidroxietilalmidones y/o diferentes mezclas de hidroxialquilalmidones, preferiblemente diferentes mezclas de hidroxietilalmidones.

50 En el contexto de la presente invención, el término "grupo carboxilo reactivo" se refiere a un éster reactivo, pueden mencionarse un anhídrido de ácido carboxílico, isotiocianatos o isocianato. Ésteres reactivos preferidos se derivan de N-hidroxi-succinimidas tales como N-hidroxi-succinimida o sulfo-N-hidroxi-succinimida, fenoles sustituidos de manera adecuada tales como p-nitrofenol, o,p-dinitrofenol, o,o'-dinitrofenol, triclorofenol tal como 2,4,6-triclorofenol o 2,4,5-triclorofenol, trifluorofenol tal como 2,4,6-trifluorofenol o 2,4,5-trifluorofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, o hidroxiazoles tales como hidroxibenzotriazol. Se prefieren especialmente N-hidroxi-succinimidas, prefiriéndose especialmente N-hidroxi-succinimida y sulfo-N-hidroxi-succinimida. Todos los alcoholes pueden emplearse solos o como combinación adecuada de dos o más de los mismos. Como éster reactivo, se prefieren especialmente éster pentafluorofenílico y éster de N-hidroxi-succinimida.

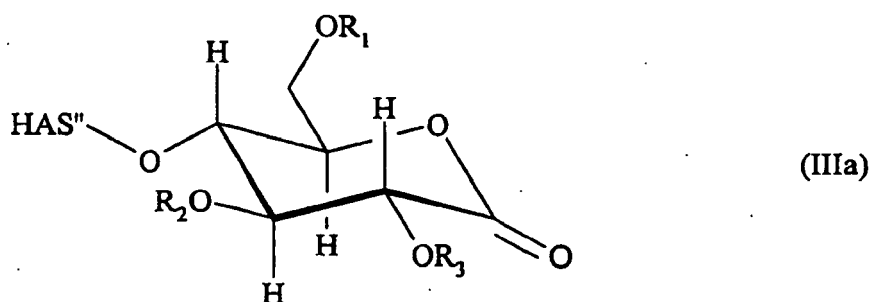
60 En cuanto al grupo R' del grupo tioéster -(C=Y)-S-R', preferiblemente -(C=O)-S-R', no existen limitaciones específicas dado que el grupo -S-R' forma un grupo saliente electrófilo que es adecuado para un desplazamiento cuando se hace reaccionar con el grupo alfa-X-beta-amino. Los residuos SR' preferidos incluyen sustituyentes que se derivan de tiofenol sustituido o no sustituido, tiopiridina, bencil-mercaptano, etanotiol, metanotiol, ácido 2-mercaptoetanosulfónico, ácido 2-mercaptoacético, éster metílico o etílico del ácido 2-mercaptoacético, ácido 3-mercaptopropiónico, éster metílico o etílico del ácido 3-mercaptopropiónico, ácido 4-mercaptobutírico, éster metílico o etílico del ácido 4-mercaptobutírico.

65 Según la presente invención, el grupo tioéster está comprendido en el hidroxialquilalmidón y el grupo alfa-X-beta-amino está comprendido en el principio activo.

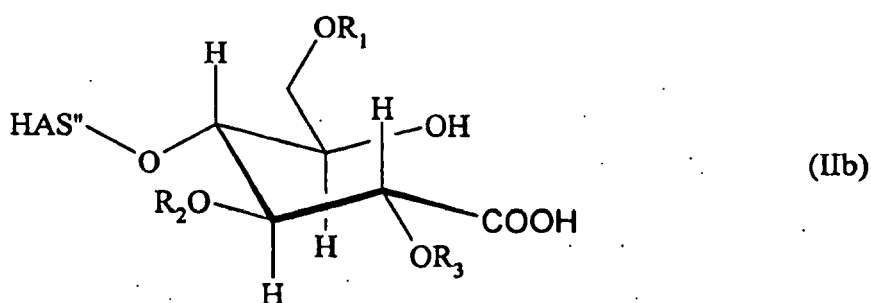
Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que se hace reaccionar un hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster con un grupo alfa-X-beta-amino del principio activo.

El hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster, preferiblemente hidroxietilalmidón, se proporciona haciendo reaccionar un hidroxialquilalmidón con un compuesto al menos bifuncional que comprende un grupo funcional M que se hace reaccionar con el hidroxialquilalmidón por medio del extremo reductor no oxidado, y un grupo funcional Q que es un grupo tioéster o un grupo funcional que se modifica adicionalmente para dar un grupo tioéster.

Se describe además un método que comprende oxidar selectivamente hidroxialquilalmidón en su extremo reductor para dar hidroxialquilalmidón según la fórmula (IIIa)



y/o según la fórmula (IIIb)



y hacer reaccionar hidroxialquilalmidón selectivamente oxidado en su extremo reductor con al menos un compuesto adecuado para dar un hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster.

La oxidación del hidroxialquilalmidón, preferiblemente hidroxietilalmidón, puede llevarse a cabo según cada método o combinación de métodos que dan como resultado compuestos que tienen las estructuras (IIIa) y/o (IIIb) mencionadas anteriormente. Aunque la oxidación puede llevarse a cabo según cualquier método o métodos adecuados que dan como resultado el extremo reductor oxidado de hidroxialquilalmidón, se lleva a cabo preferiblemente usando una disolución de yodo alcalina tal como se describe, por ejemplo, en el documento DE 196 28 705 A1 cuyo contenido respectivo (ejemplo A, columna 9, líneas 6 a 24) se incorpora en el presente documento como referencia.

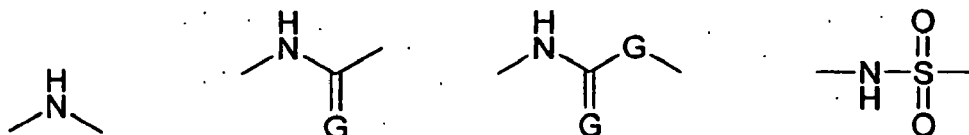
Según la presente invención, se hace reaccionar el hidroxialquilalmidón con un compuesto al menos bifuncional que comprende un grupo funcional M que se hace reaccionar con el hidroxialquilalmidón y un grupo funcional Q que es un grupo tioéster o un grupo funcional que puede modificarse para dar un grupo tioéster.

Como grupo funcional M del compuesto al menos bifuncional que se hace reaccionar con el hidroxialquilalmidón, se describe un grupo que tiene la estructura R'-NH- en la que R' es hidrógeno o un residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo en el que el residuo cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo puede estar unido directamente al grupo NH o, según otra realización, puede estar unido mediante un puente de oxígeno al grupo NH grupo. Los residuos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo pueden estar sustituidos de manera adecuada. Como sustituyentes preferidos, pueden mencionarse halógenos tales como F, Cl o Br. Residuos R' especialmente preferidos son grupos hidrógeno, alquilo y alcoxilo, y se prefieren incluso más hidrógeno y grupos alquilo y alcoxilo no sustituidos.

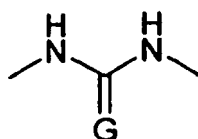
Entre los grupos alquilo y alcoxilo, se prefieren grupos con 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de C. Se prefieren más grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxilo, etoxilo, propoxi e isopropoxilo. Se prefieren especialmente metilo, etilo, metoxilo, etoxilo y se da particular preferencia a metilo o metoxilo.

Además, se describe un grupo funcional M que tiene la estructura R'-NH-R'', en la que R'' comprende preferiblemente la unidad estructural -NH- y/o la unidad estructural -(C=G)- en la que G es O o S, y/o la unidad estructural -SO₂-. Ejemplos específicos para el grupo funcional R'' son

5



y

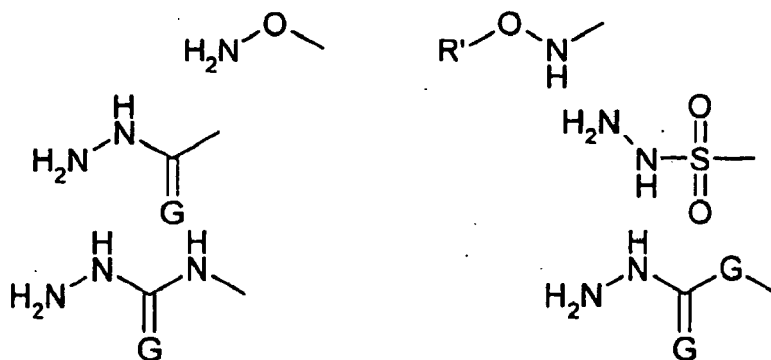


10

en los que, si G está presente dos veces, es independientemente O o S.

Según la invención, el grupo funcional M se selecciona del grupo que consiste en

15



20 en los que G es O o S y, si está presente dos veces, independientemente O o S, y R' es metilo.

Según el grupo Q que es un grupo tioéster o un grupo funcional que puede modificarse químicamente para dar un grupo tioéster, deben mencionarse los siguientes grupos funcionales, entre otros:

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

- el grupo tio o los grupos hidroxilo;

30 - hidrazida de ácido alquilsulfónico, hidrazida de ácido arilsulfónico;

- 1,2-dioles;

- 1,2-amino-tioalcoholes;

35 - azidas;

- 1,2-aminoalcoholes;

40 - el grupo amino -NH₂ o derivados de los grupos amino que comprenden la unidad estructural -NH- tales como grupos aminoalquilo, grupo aminoarilo, grupos aminoaralquilo o grupo alcarilamino;

- el grupo hidroxilamino -O-NH₂, o derivados del grupo hidroxilamino que comprenden la unidad estructural -O-NH-, tales como grupos hidroxilalquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino o grupos hidroxilalcarilamino;

45 - grupos alcoxi-amino, grupos ariloxi-amino, grupos aralquiloxi-amino o grupos alcariloxi-amino, que comprenden cada uno la unidad estructural -NH-O-;

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

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

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

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

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

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

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

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

-- $-NO_2$;

- el grupo nitrilo;

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

- el grupo carboxilo;

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

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

-- $-C\equiv C-H$;

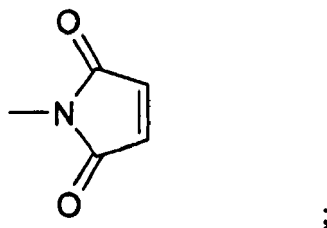
35 -- $-(C=NH_2Cl)-O$ -alquilo

- grupos $-(C=O)-CH_2-Hal$ en los que Hal es Cl, Br, o I;

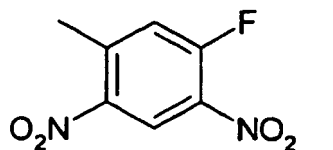
40 -- $-CH=CH-SO_2-$;

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

- el grupo



- el grupo



Según una primera alternativa, el grupo funcional Q es un grupo tioéster.

Según una segunda alternativa, el grupo funcional Q es un grupo que se modifica adicionalmente para dar un grupo tioéster. Según esta realización, el derivado de hidroxialquilalmidón resultante de la reacción de hidroxialquilalmidón,

preferiblemente oxidado de manera selectiva en su extremo reductor, con el compuesto al menos bifuncional, se hace reaccionar con un compuesto al menos bifuncional adicional que comprende un grupo funcional que se hace reaccionar con el grupo funcional Q del derivado de hidroxialquilalmidón y un grupo tioéster.

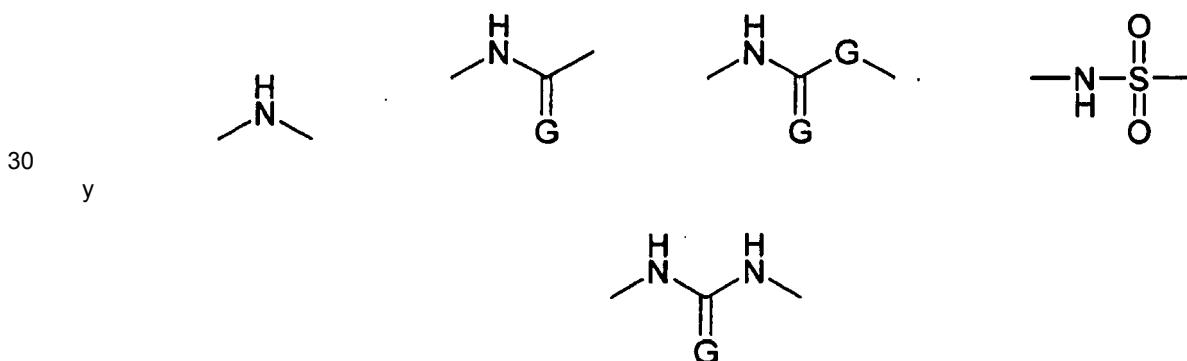
- 5 Como grupo funcional del compuesto adicional que se hace reaccionar con el grupo funcional Q, deben mencionarse todos los grupos funcionales adecuados de la lista de grupos funcionales descrita anteriormente para Q funcional dado que puede hacerse reaccionar con Q.

Según una realización de la presente invención, el grupo funcional Q comprende la estructura química -NH-.

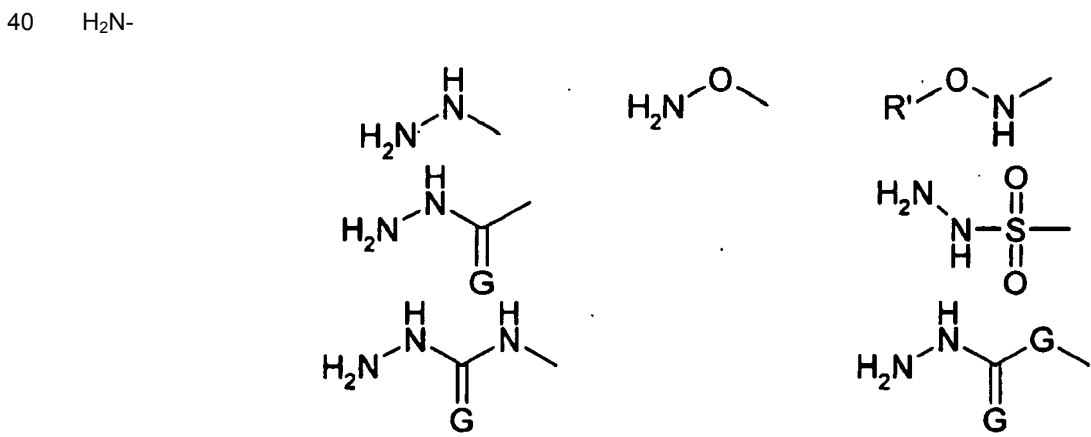
- 10 Según una realización preferida de la presente invención, el grupo funcional Q es un grupo que tiene la estructura R'-NH- en la que R' es hidrógeno o un residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo en la que el residuo cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo puede estar unido directamente al grupo NH o, según otra realización, puede estar unido mediante un puente de oxígeno al grupo NH. Los residuos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo pueden estar sustituidos de manera adecuada. Como sustituyentes preferidos, pueden mencionarse halógenos tales como F, Cl o Br. Residuos R' especialmente preferidos son grupos hidrógeno, alquilo y alcoxilo, y se prefieren incluso más hidrógeno y grupos alquilo y alcoxilo no sustituidos.

- 20 Entre los grupos alquilo y alcoxilo, se prefieren grupos con 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de C. Se prefieren más grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxilo, etoxilo, propoxilo e isopropoxilo. Se prefieren especialmente metilo, etilo, metoxilo, etoxilo, y se da particular preferencia a metilo o metoxilo.

- 25 Según otra realización de la presente invención, el grupo funcional Q tiene la estructura R'-NH-R''- en la que R'' comprende preferiblemente la unidad estructural -NH- y/o la unidad estructural -(C=G)- en la que G es O o S, y/o la unidad estructural -SO₂-. Según realizaciones más preferidas, el grupo funcional R'' se selecciona del grupo que consiste en



- 35 en los que, si G está presente dos veces, es independientemente O o S.
 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y un conjugado tal como se mencionó anteriormente en el que el grupo funcional Q se selecciona del grupo que consiste en

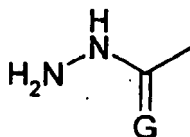


- 45 en los que G es O o S y, si está presente dos veces, independientemente O o S, y R' es metilo.

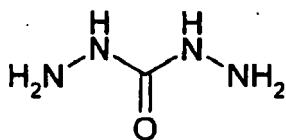
Según una realización particularmente preferida de la presente invención, el grupo funcional Q es un grupo amino $-NH_2$.

5 Según una realización de la presente invención, tanto M como Q comprenden un grupo amino $-NH-$. Además, se describe una realización en la que tanto M como Q son un grupo amino $-NH_2$.

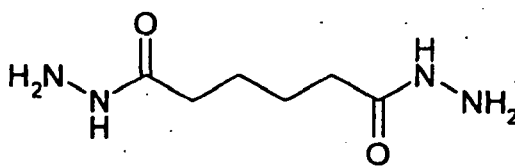
10 Según una realización preferida de la presente invención, el compuesto que comprende M y Q es un compuesto homobifuncional, más preferiblemente un compuesto homobifuncional que comprende, como grupos funcionales M y Q, lo más preferiblemente el grupo amino $-NH_2$, o según otras realizaciones, el grupo hidroxilamino $-O-NH_2$ o el grupo



15 siendo G preferiblemente O. Ejemplos específicos de estos compuestos que comprenden M y Q son

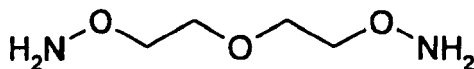


o



20

o



25

En el caso descrito en el que tanto M como Q son un grupo amino $-NH_2$, M y Q pueden estar separados por cualquier espaciador adecuado. Entre otros, el espaciador puede ser un residuo de hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico, opcionalmente sustituido. Generalmente, el residuo de hidrocarburo tiene desde 1 hasta 60, preferiblemente desde 1 hasta 40, más preferiblemente desde 1 hasta 20, más preferiblemente desde 2 hasta 10, más preferiblemente desde 2 hasta 6 y de manera especialmente preferida desde 2 hasta 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo de separación comprende generalmente desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 8 y de manera especialmente preferida desde 1 hasta 4 heteroátomos. El residuo de hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, desde 5 hasta 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte de alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. Según una realización incluso más preferida, el residuo de hidrocarburo es una cadena de alquilo de desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 2 hasta 10, más preferiblemente desde 2 hasta 6, y de manera especialmente preferida desde 2 hasta 4 átomos de carbono.

Por tanto, se describen un método y un conjugado tal como se describió anteriormente en los que el hidroxialquilalmidón se hace reaccionar con 1,4-diaminobutano, 1,3-diaminopropano o 1,2-diaminoetano para dar un derivado de hidroxialquilalmidón.

Según la presente invención, el hidroxialquilalmidón se emplea con el extremo reductor no oxidado. Según la presente invención, se hace reaccionar el hidroxialquilalmidón con un grupo funcional M por medio del extremo reductor no oxidado. El hidroxialquilalmidón puede hacerse reaccionar con un grupo funcional M en el extremo reductor no oxidado y al menos un resto químico adicional de la molécula de HAS.

La expresión "el hidroxialquilalmidón se hace reaccionar por medio del extremo reductor" o "el hidroxialquilalmidón se hace reaccionar por medio del extremo reductor selectivamente oxidado" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a un procedimiento según el cual el hidroxialquilalmidón se hace reaccionar principalmente por medio de su extremo reductor (selectivamente oxidado).

Este término “predominantemente por medio de su extremo reductor (selectivamente oxidado)” 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%, 96%, 97%, 98%, o 99% de las moléculas de hidroxialquilalmidón empleadas para una reacción dada se hace reaccionar por medio de al menos un extremo reductor (selectivamente oxidado) por molécula de hidroxialquilalmidón, en los que al menos una molécula de hidroxialquilalmidón dada que se hace reaccionar por medio de al menos un extremo reductor puede hacerse reaccionar en la misma reacción dada por medio de al menos un grupo funcional adecuado adicional que está comprendido en dicha molécula de hidroxialquilalmidón y que no es un extremo reductor. Si se hacen reaccionar una o más moléculas de hidroxialquilalmidón por medio de al menos un extremo reductor y simultáneamente por medio de al menos un grupo funcional adecuado adicional que está comprendido en esas moléculas de hidroxialquilalmidón 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%, 96%, 97%, 98% o 99% de todos los grupos funcionales que se hacen reaccionar de esas moléculas de hidroxialquilalmidón, incluyendo dichos grupos funcionales los extremos reductores, son extremos reductores.

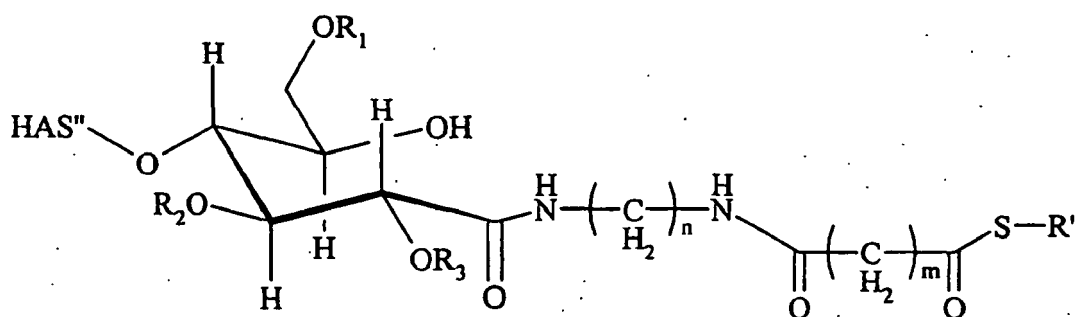
El término “extremo reductor” tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere al grupo aldehído terminal de una molécula de hidroxialquilalmidón que puede estar presente como grupo aldehído y/o como forma acetal correspondiente. En caso de que el extremo reductor esté oxidado, el grupo aldehído o acetal está en forma de un grupo carboxilo y/o de la lactona correspondiente.

Tal como se describió anteriormente, el derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con amino se hace reaccionar preferiblemente de manera adicional con un compuesto al menos bifuncional que comprende un grupo funcional que se hace reaccionar con el grupo amino del derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con amino, y un grupo tioéster.

Como compuestos preferidos para hacer reaccionar con el derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con amino, deben mencionarse compuestos que comprenden un grupo carboxilo reactivo que se hace reaccionar con el grupo amino, y un grupo tioéster. Como grupo carboxilo reactivo, pueden mencionarse un éster reactivo, isotiocianatos o isocianato. Ésteres reactivos preferidos se derivan de N-hidroxi-succinimidas tales como N-hidroxi-succinimida o sulfo-N-hidroxi-succinimida, fenoles sustituidos de manera adecuada tales como p-nitrofenol, o,p-dinitrofenol, o,o'-dinitrofenol, triclorofenol tal como 2,4,6-triclorofenol o 2,4,5-triclorofenol, trifluorofenol tal como 2,4,6-trifluorofenol o 2,4,5-trifluorofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, o hidroxiazoles tales como hidroxibenzotriazol.

El grupo carboxilo reactivo y el tioéster pueden estar separados por cualquier espaciador adecuado. Entre otros, el espaciador puede ser un residuo de hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico, opcionalmente sustituido. Generalmente, el residuo de hidrocarburo tiene desde 1 hasta 60, preferiblemente desde 1 hasta 40, más preferiblemente desde 1 hasta 20, más preferiblemente desde 2 hasta 10, más preferiblemente desde 2 hasta 6 y de manera especialmente preferida desde 2 hasta 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo de separación comprende generalmente desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 8 y de manera especialmente preferida desde 1 hasta 4 heteroátomos. El residuo de hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, desde 5 hasta 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte de alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. Según una realización de la presente invención, el grupo carboxilo reactivo y el grupo tioéster están separados por un residuo alquilo con 2, 3 ó 4 átomos de carbono tales como un grupo etileno, grupo propileno o grupo butileno.

Como ejemplo, en el caso en el que se hace reaccionar hidroxialquilalmidón, preferiblemente hidroxietilalmidón, con su extremo reductor oxidado con un diaminoalcano tal como 1,4-diaminobutano, 1,3-diaminopropano o 1,2-diaminoetano, y se hace reaccionar adicionalmente el derivado de hidroxialquilalmidón resultante con un compuesto que comprende un grupo tioéster -S-R' y un grupo carboxilo reactivo en el que el grupo tioéster y el grupo carboxilo reactivo están separados por un grupo etileno, grupo propileno o grupo butileno, puede obtenerse como resultado un hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster según



en el que n, m son independientemente 2, 3, 4.

5 Por tanto, también se describen un método y un conjugado tal como se describió anteriormente, comprendiendo dicho método oxidar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor, hacer reaccionar el extremo reductor oxidado con un compuesto al menos bifuncional que comprende dos grupos amino para dar un derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con amino, y hacer reaccionar el grupo amino del derivado con un compuesto al menos bifuncional que comprende al menos un grupo funcional que se hace reaccionar con el grupo amino del derivado, preferiblemente un grupo carboxilo reactivo, y que comprende al menos un grupo tioéster, preferiblemente un grupo tioéster -SR'.

Se describe adicionalmente un hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster que se prepara oxidando selectivamente hidroxialquilalmidón en su extremo reductor, tal como se describió anteriormente, y

15 - convirtiendo el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón en una imidazolidina de un ácido carboxílico, preparada, por ejemplo, mediante reacción del ácido carboxílico correspondiente con, por ejemplo, N,N-carbonildiimidazol con un tiol comparativamente ácido (Masamune, S., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 98 (1976) 7874), o

20 - convirtiendo el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón usando un disulfuro y trifenilfosfina en el tioéster correspondiente (Mukaiyama, T., *et al.*, Bull. Chem. Soc. Jpn. 43 (1970) 1271), o

- haciendo reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón con tioisocianatos de arilo (Grieco, P., *et al.*, Tetrahedron Lett. 43 (1979) 1283), o

25 - haciendo reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón con cloroformiato de tiopiridilo (Corey, E.J., *et al.*, Tetrahedron Lett. (1979), 2875), o

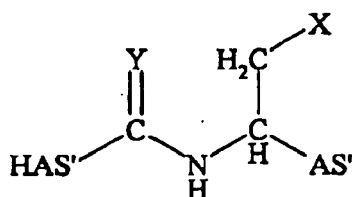
30 - haciendo reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón con tosilato de 2-fluoro-N-metilpiridinio y tioles (Watanabe, Y., *et al.*, Chem. Lett. (1976) 741), o

35 - haciendo reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón con una carbodiimida tal como diisopropilcarbodiimida (DIC), dicitclohexilcarbodiimidias (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), EDC inmovilizada sobre un soporte sólido y un tiol. (C.E-Lin *et al.* Tetrahedron Lett. 43 (2002) 4531-34; M. Adamczyk, Tetrahedron Lett. 37 (1996) 4305-8, J. Hovinen, Nucleosides Nucleotides 18 (1999) 1263-4).

40 Por tanto, también se describen un método y un conjugado tal como se describió anteriormente, comprendiendo dicho método oxidar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor y hacer reaccionar el extremo reductor oxidado con carbodiimida tal como diisopropilcarbodiimida (DIC), dicitclohexilcarbodiimidias (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), prefiriéndose 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y un tiol para dar el hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster.

Entonces se hace reaccionar el derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster tal como se describió anteriormente con el grupo alfa-X-beta-amino del principio activo.

45 Por tanto, la presente invención también se refiere a un conjugado tal como se describió anteriormente según la fórmula (IV)



(IV)

en la que HAS' es el residuo del hidroxialquilalmidón o derivado del mismo que se unió al grupo tioéster, y en la que AS' es el residuo del principio activo o un derivado del mismo que se unió al grupo alfa-X-beta-amino.

5 Según una realización preferida de la presente invención, el grupo alfa-X-beta-amino está comprendido en un residuo de cisteína o un residuo de histidina del principio activo, preferiblemente del fármaco de molécula pequeña, péptido o proteína.

10 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y un conjugado tal como se describió anteriormente, en el que el grupo alfa-X-beta-amino está comprendido en un residuo de cisteína o un residuo de histidina del principio activo.

15 Más preferiblemente, el residuo de cisteína o histidina del principio activo es una cisteína o histidina N-terminal de un péptido o una proteína. El residuo de cisteína o histidina N-terminal puede ser un residuo de cisteína o histidina N-terminal que se produce de manera natural o puede introducirse en el extremo N-terminal en el péptido o la proteína mediante una modificación adecuada de la secuencia del péptido o la proteína. En péptidos, los aminoácidos mencionados pueden introducirse durante la síntesis. En la técnica se conoce la síntesis de péptidos. (W. Chang, P. D. White; Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach; Oxford University Press, Oxford, 2000, ISBN 0199637245).

20 Pueden obtenerse polipéptidos recombinantes mediante técnicas de biología molecular convencionales tal como se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Eds. Sambrook *et al.*, CSHL Press 2001. En resumen, pueden expresarse polipéptidos a partir de vectores de expresión recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica para el polipéptido deseado, ácido nucleico que está operativamente
25 unido a al menos una secuencia reguladora que permite la expresión del polipéptido deseado. Por ejemplo, puede aislarse una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido deseado y clonarse en un vector de expresión y entonces puede transformarse el vector en una célula huésped adecuada para la expresión del polipéptido deseado. Un vector de este tipo puede ser un plásmido, un fagémido o un cósmido. Por ejemplo, puede clonarse una molécula de ácido nucleico de una manera adecuada en vectores de expresión procariotas o
30 eucariotas (Molecular Cloning, véase anteriormente). Tales vectores de expresión comprenden al menos un promotor y también pueden comprender una señal para el inicio de la traducción y, en el caso de vectores de expresión procariotas, una señal para la terminación de la traducción, mientras que en el caso de vectores de expresión eucariotas comprenden preferiblemente señales de expresión para la terminación de la transcripción y para la poliadenilación. Ejemplos de vectores de expresión procariotas son, para la expresión en *Escherichia coli* por
35 ejemplo vectores de expresión basados en promotores reconocidos por ARN polimerasa de T7 tal como se describe en el documento US 4.952.496, para vectores de expresión eucariotas para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo los vectores G426/Met25 o P526/Gall (Mumberg *et al.*, (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767-5768), para la expresión en células de insectos, por ejemplo vectores de baculovirus, tal como se describe por
40 ejemplo en los documentos EP-B1-0127839 o EP-B1- 0549721 o por Ciccarone *et al.* ("Generation of recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* using baculovirus shuttle vector" (1997) volumen 13, U. Reisch, ed. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.) y para la expresión en células de mamíferos, por ejemplo los vectores Rc/CMW y Rc/ASW y SW40, que se conocen comúnmente y están comercialmente disponibles, o el sistema de EBNA descrito en el ejemplo 4, pCytTS basado en el replicón de Sindbis (Boorsma *et al.* (2002) Biotechnol. Bioeng. 79(6): 602-609), el sistema de
45 expresión de virus Sindbis (Schlesinger (1993) Trends Biotechnol. 11(1):18-22) o un sistema de expresión de adenovirus (He *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2509-2514). El experto conoce bien los métodos de biología molecular para la producción de estos vectores de expresión así como los métodos para transfectar células huésped y cultivar tales células huésped transfectadas así como las condiciones para producir y obtener los polipéptidos de la invención a partir de dichas células huésped transformadas.

50 Pueden generarse polipéptidos con el residuo de Cys o His N-terminal deseado a partir de los polipéptidos expresados y purificados tal como se describió anteriormente mediante clonación del polipéptido de interés detrás de una secuencia líder N-terminal que puede retirarse para proporcionar los polipéptidos con el residuo de Cys o His N-terminal deseado.

55 Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante escisión proteolítica del polipéptido expresado y purificado tal como se describió anteriormente. En tal caso, se clonó, se expresó y se purificó un polipéptido de fusión en el que un residuo de His o Cys sigue directamente a un sitio de escisión con proteasa altamente selectivo, por ejemplo un residuo de His o Cys que sigue inmediatamente al sitio de escisión de factor Xa: Ile (Glu/Asp) Gly Arg | (Cys/His), o un residuo de His o Cys que sigue inmediatamente al sitio de escisión de enterocinasa: Asp Asp Asp Asp Lys | (Cys/His), en los
60 que | indica el sitio de escisión por la proteasa.

Esto puede lograrse además, por ejemplo, mediante escisión del polipéptido durante la expresión, por ejemplo escisión en la fase de translocación de ER mediante la señal peptidasa. En tal caso, se clonó y se expresó un polipéptido de fusión en el que un residuo de Cys o His sigue directamente al péptido señal que dirige el polipéptido recombinante a la ruta secretora (para una revisión, véase Rapoport *et al.*, Annu Rev Biochem. 1996;65: 271-303).

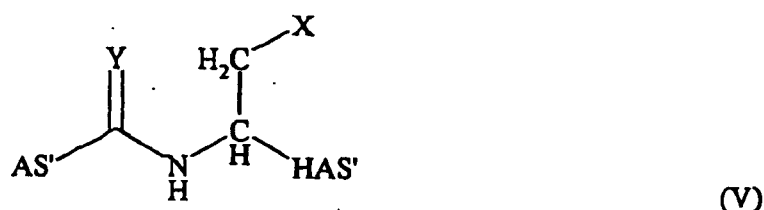
65

Los métodos de biología molecular para manipular la secuencia codificante de un polipéptido recombinante de modo que se genera una secuencia codificante para un polipéptido con el residuo de Cys o His deseado en la posición deseada se conocen bien en la técnica (Sambrook, anteriormente).

5 Según la reacción de ligación química nativa según la presente invención, el producto intermedio de la reacción del hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster y el principio activo funcionalizado con alfa-X-beta-amino, preferiblemente un péptido o una proteína con un residuo de cisteína o histidina, preferiblemente un residuo de cisteína o histidina N-terminal, es un tioéster que se convierte de manera irreversible mediante una trans-acetilación intramolecular en el conjugado de la invención que comprende el derivado de hidroxialquilalmidón unido mediante un enlace amida al principio activo.

Además, se describe un método tal como se describió anteriormente, en el que se hace reaccionar un principio activo funcionalizado con tioéster con un grupo alfa-X-beta-amino de un derivado de hidroxialquilalmidón.

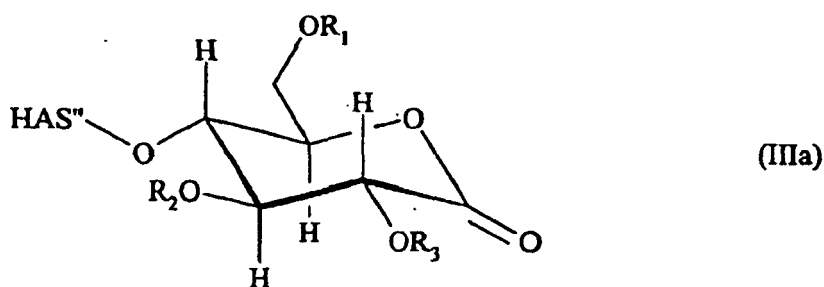
15 Por consiguiente, también se describe un conjugado tal como se describió anteriormente, que tiene una estructura según la fórmula (V)



20 en la que HAS' es el residuo del hidroxialquilalmidón o derivado del mismo que se unió al grupo alfa-X-beta-amino, y en la que AS' es el residuo del principio activo o un derivado del mismo que se unió al grupo tioéster.

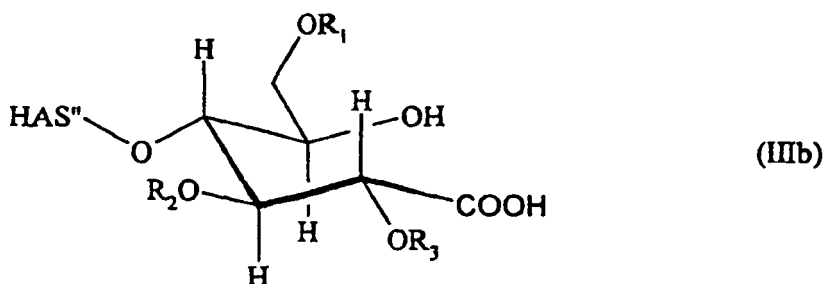
El hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino puede prepararse mediante cualquier método adecuado. Según una realización el hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino se prepara mediante un método que comprende oxidar selectivamente el hidroxialquilalmidón en su extremo reductor y modificar químicamente de manera adecuada el extremo reductor oxidado para dar un derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino.

30 Por tanto, según una realización se describe un método que comprende oxidar selectivamente hidroxialquilalmidón en su extremo reductor para dar hidroxialquilalmidón según la fórmula (IIIa)



y/o según la fórmula (IIIb)

35



y hacer reaccionar de manera adecuada hidroxialquilalmidón selectivamente oxidado en su extremo reductor para dar un hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster.

40

La oxidación del hidroxialquilalmidón, preferiblemente hidroxietilalmidón, puede llevarse a cabo según cada método

o combinación de métodos que da como resultado compuestos que tienen las estructuras (IIIa) y/o (IIIb) mencionadas anteriormente. Aunque la oxidación puede llevarse a cabo según cualquier método o métodos adecuados que dan como resultado el extremo reductor oxidado de hidroxialquilalmidón, se lleva a cabo preferiblemente usando una disolución de yodo alcalina tal como se describe, por ejemplo, en el documento DE 196 28 705 A1 cuyo contenido respectivo (ejemplo A, columna 9, líneas 6 a 24) se incorpora en el presente documento como referencia.

Según una realización el hidroxialquilalmidón selectivamente oxidado en su extremo reductor se hace reaccionar con un compuesto al menos bifuncional que comprende un grupo funcional Z que se hace reaccionar con el extremo reductor oxidado y un grupo funcional W que se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto que comprende un grupo funcional V que se hace reaccionar con W y que comprende un grupo alfa-X-beta-amino.

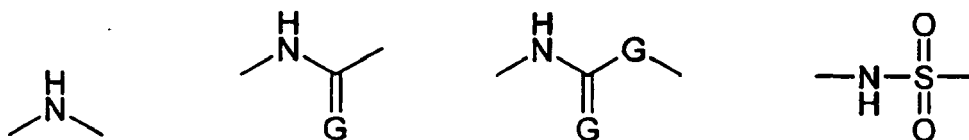
Por tanto, también se describe un método tal como se describió anteriormente, comprendiendo dicho método oxidar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor, hacer reaccionar el extremo reductor oxidado con un grupo funcional Z de un compuesto que comprende, además de Z, un grupo funcional adicional W, para dar un primer derivado de hidroxialquilalmidón, y hacer reaccionar el grupo funcional W del primer derivado de hidroxialquilalmidón con un grupo funcional V de un compuesto que comprende, además de V, un grupo alfa-X-beta-amino, para dar el derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino.

Según una realización descrita, tanto Z como W comprenden la estructura química -NH-.

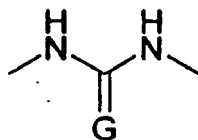
Según una realización descrita, los grupos funcionales Z y W son un grupo que tiene la estructura R'-NH- en la que R' es hidrógeno o un residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo en el que el residuo cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo puede estar unido directamente al grupo NH grupo o, según otra realización, puede estar unido mediante un puente de oxígeno al grupo NH. Los residuos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo pueden estar sustituidos de manera adecuada. Como sustituyentes preferidos, pueden mencionarse halógenos tales como F, Cl o Br. Residuos R' especialmente preferidos son grupos hidrógeno, alquilo y alcoxilo, y se prefieren incluso más hidrógeno y grupos alquilo y alcoxilo no sustituidos.

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

Según otra realización descrita, los grupos funcionales Z y W tienen la estructura R'-NH-R''- en la que R'' comprende preferiblemente la unidad estructural -NH- y/o la unidad estructural -(C=G)- en la que G es O o S, y/o la unidad estructural -SO₂-. Según más realizaciones preferidas, el grupo funcional R'' se selecciona del grupo que consiste en



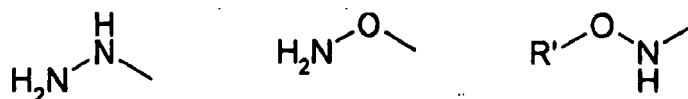
y



en los que, si G está presente dos veces, es independientemente O o S.

Por tanto, también se describen un método y un conjugado tal como se mencionó anteriormente en el que los grupos funcionales Z y W se seleccionan independientemente del grupo que consiste en

H₂N-

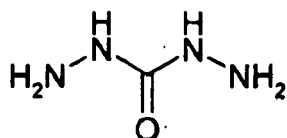




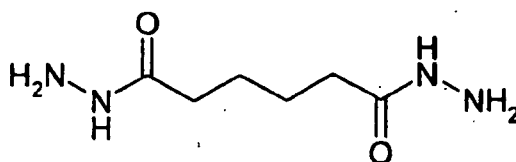
en los que G es O o S y, si está presente dos veces, independientemente O o S, y R' es metilo.

5

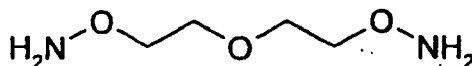
Ejemplos específicos de estos compuestos que comprenden Z y W son



10 o



15 o



Según una realización descrita adicional, ambos grupos funcionales Z y W son un grupo amino -NH₂.

20 Por tanto, también se describe un método tal como se describió anteriormente, en el que el compuesto que comprende Z y W es un compuesto funcionalizado con diamino.

En el caso en el que tanto Z como W son un grupo amino -NH₂, Z y W pueden estar separados por cualquier espaciador adecuado. Entre otros, el espaciador puede ser un residuo de hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico, opcionalmente sustituido. Generalmente, el residuo de hidrocarburo tiene desde 1 hasta 60, preferiblemente desde 1 hasta 40, más preferiblemente desde 1 hasta 20, más preferiblemente desde 2 hasta 10, más preferiblemente desde 2 hasta 6 y de manera especialmente preferida desde 2 hasta 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo de separación comprende generalmente desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 8 y de manera especialmente preferida desde 1 hasta 4 heteroátomos. El residuo de hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, desde 5 hasta 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte de alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. Según una realización incluso más preferida, el residuo de hidrocarburo es una cadena de alquilo de desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 2 hasta 10, más preferiblemente desde 2 hasta 6, y de manera especialmente preferida desde 2 hasta 4 átomos de carbono.

35 Por tanto, también se describen un método y un conjugado tal como se describió anteriormente en el que se hace reaccionar el hidroxialquilalmidón, preferiblemente en su extremo reductor oxidado, con 1,4-diaminobutano, 1,3-diaminopropano o 1,2-diaminoetano para dar un derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con amino.

40 Por tanto, según una primera alternativa, se hace reaccionar el grupo funcional Z que es un grupo amino NH₂ con el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón dando como resultado un grupo amido que une el hidroxialquilalmidón y el compuesto que comprende Z y W.

45 Según una segunda alternativa, se hace reaccionar el grupo funcional Z que es un grupo amino NH₂ con el extremo reductor no oxidado del hidroxialquilalmidón por medio de aminación reductora dando como resultado un grupo imino que preferiblemente se hidrogena posteriormente para dar un grupo amino, uniendo el grupo imino y el grupo amino, respectivamente, el hidroxialquilalmidón y el compuesto que comprende Z y el grupo amino W. En este caso se prefiere que el compuesto que comprende Z y W sea una amina primaria que contiene, como grupo funcional,

sólo un grupo amino. En este caso específico, aunque el compuesto sólo contiene un grupo funcional, se considera como compuesto bifuncional que comprende Z y W en el que Z es el grupo amino contenido en el compuesto sometido a la aminación reductora con el extremo reductor del polímero, y en el que W es el grupo amino secundario resultante de la aminación reductora y posterior hidrogenación.

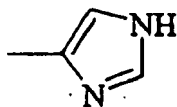
5 Según una tercera alternativa, se hace reaccionar el extremo reductor no oxidado del polímero con amoniaco por medio de aminación reductora dando como resultado un grupo imino terminal del polímero que preferiblemente se hidrogena posteriormente para dar un grupo amino terminal del polímero y por tanto un grupo amino primario terminal. En este caso específico, el amoniaco se considera compuesto bifuncional que comprende Z y W en el que Z es NH₂ comprendido en el amoniaco empleado, y en el que W es el grupo amino primario resultante de la aminación reductora y posterior hidrogenación.

10 El derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con amino preferido se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto que comprende un grupo funcional V que se hace reaccionar con W y que comprende un grupo alfa-X-beta-amino.

15 Según una realización descrita preferida, el compuesto que comprende un grupo funcional V que se hace reaccionar con W y un grupo alfa-X-beta-amino es un derivado de cisteína o histidina.

20 Según una realización adicional preferida, el derivado de cisteína o el derivado de histidina se activa previamente mediante un agente de activación adecuado. Agentes de activación adecuados son, entre otros, carbodiimidas tales como diisopropilo carbodiimida (DIC), dicitclohexilcarbodiimidas (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), prefiriéndose especialmente diisopropilcarbodiimida (DIC).

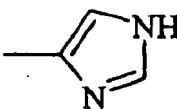
25 El grupo SH y el grupo amino del derivado de cisteína deben protegerse adecuadamente cuando se hace reaccionar el derivado de cisteína con el grupo amino del derivado de hidroxialquilalmidón. En cuanto a los grupos protectores respectivos, pueden emplearse todos los compuestos adecuados conocidos en la técnica. Por consiguiente, si es necesario, debe protegerse adecuadamente el grupo.



30 Como grupo protector para el grupo SH, se prefieren acetamidometilo (Acm), terc-butiltio (StBu), 4-metoxibencilo (4-MeOBzl), 4-metoxiltritilo (Mmt), tritilo (Trt) y 4-metiltritilo (Mtt), prefiriéndose especialmente StBu.

35 Como grupo protector para el grupo amino, se prefieren terc-butiloxicarbonilo (Boc), fluoreniloxicarbonilo (Fmoc), 4-metoxiltritilo (Mmt), tritilo (Trt) y 4-metiltritilo (Mtt), prefiriéndose especialmente Fmoc.

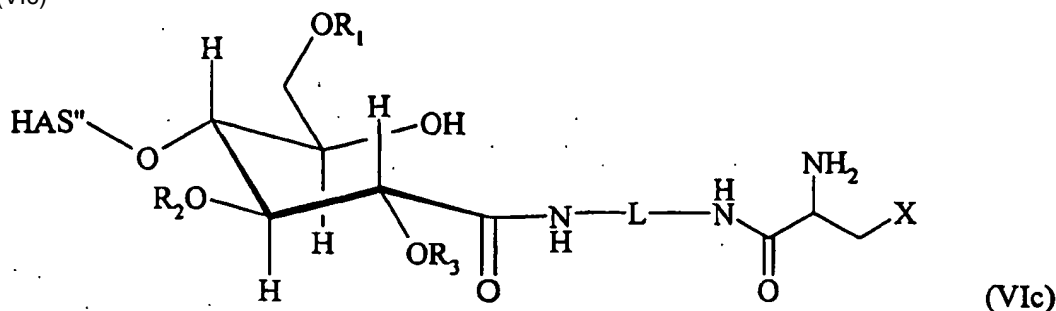
Como grupo protector para el grupo



40 se prefieren terc-butiloxicarbonilo (Boc), benciloximetilo (Bom), dinitrofenilo (Dnp), 4-metiltritilo (Mtt), tosilo (Tos) y tritilo (Trt), prefiriéndose especialmente 4-metiltritilo (Mtt) y tritilo (Trt).

45 Por tanto, también se describe un método tal como se describió anteriormente, en el que el compuesto que comprende V y alfa-X-beta-amino es cisteína o histidina o un derivado de las mismas, siendo V el grupo carboxilo.

Por tanto, también se describe un derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino según la fórmula (VIc)



50

en el que L es un residuo alquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo o heteroaralquilo lineal, cíclico y/o ramificado, opcionalmente sustituido de manera adecuada, con de 2 a 10 átomos de carbono en el respectivo residuo alquilo, en el que HAS" se refiere a la molécula de HAS sin la unidad terminal de sacárido en el extremo reductor, y en el que R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, preferiblemente un grupo hidroxietilo.

Según otra realización, también se describe un método tal como se describió anteriormente, en el que se oxida de manera selectiva el hidroxialquilalmidón en su extremo reductor, preferiblemente según el método tal como se describió anteriormente, y el hidroxialquilalmidón resultante se hace reaccionar con un grupo funcional Z de un compuesto que comprende, además de Z, un grupo alfa-X-beta-amino.

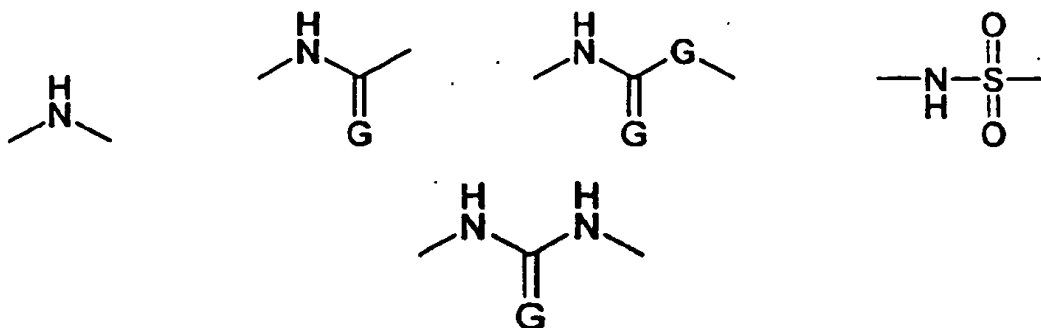
Por tanto, también se describe un método tal como se describió anteriormente, comprendiendo dicho método oxidar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor y hacer reaccionar el extremo reductor oxidado con un grupo funcional Z de un compuesto que comprende, además de Z, un grupo alfa-X-beta-amino.

Según una realización descrita, Z comprende la estructura química -NH-.

Según una realización descrita, el grupo funcional Z es un grupo que tiene la estructura R'-NH- en la que R' es hidrógeno o un residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo en el que el residuo cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo puede unirse directamente al grupo NH o, según otra realización, puede unirse mediante un puente oxígeno al grupo NH. Los residuos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo pueden estar sustituidos de manera adecuada. Como sustituyentes preferidos, pueden mencionarse halógenos tales como F, Cl o Br. Los residuos R' especialmente preferidos son grupos hidrógeno, alquilo y alcoxilo, e incluso más preferidos son hidrógeno y alquilo no sustituido y grupos alcoxilo.

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

Según otra realización descrita, el grupo funcional Z tiene la estructura R'-NH-R"- en la que R" preferiblemente comprende la unidad estructural -NH- y/o la unidad estructural -(C=G)- en la que G es O o S, y/o la unidad estructural -SO₂-. Según realizaciones más preferidas, el grupo funcional R" se selecciona del grupo que consiste en

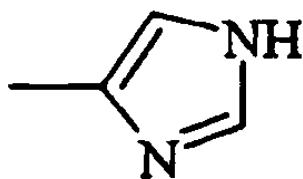


en el que, si G está presente dos veces, es independientemente O o S.

Según una realización descrita particularmente preferida el grupo funcional Z es un grupo amino -NH₂.

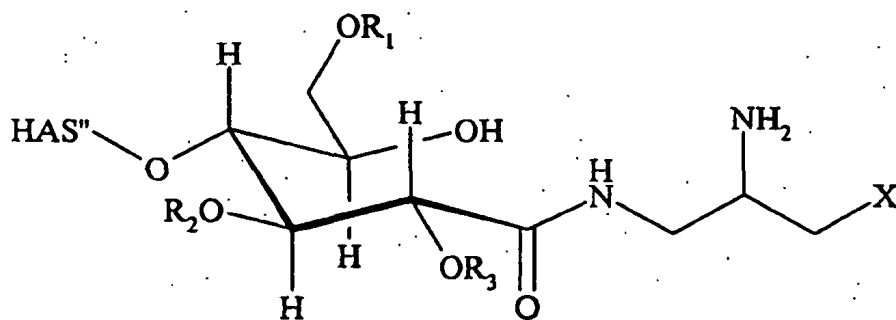
El grupo amino Z y el grupo alfa-tiol beta-amino puede separarse mediante cualquier espaciador adecuado. Entre otros, el espaciador puede ser un residuo de hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico, opcionalmente sustituido. Generalmente, el residuo de hidrocarburo tiene desde 1 hasta 60, preferiblemente desde 1 hasta 40, más preferiblemente desde 1 hasta 20, más preferiblemente desde 1 hasta 10, más preferiblemente desde 1 hasta 6 y de manera especialmente preferida desde 1 hasta 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo de separación comprende generalmente desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 8 y de manera especialmente preferida desde 1 hasta 4 heteroátomos. El residuo de hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, desde 5 hasta 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte de alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. Según una realización incluso más preferida, el residuo de hidrocarburo es una cadena de alquilo de desde 1 hasta 4 tal como un residuo de metileno, etileno, propileno o butileno. Se prefiere particularmente el residuo de metileno.

Por tanto, también se describe un método tal como se describió anteriormente, en el que el compuesto que comprende Z y el grupo alfa-X-beta-amino es 1,3-diamino-2-tiolpropano o 2,3-diamino-1-tiolpropano, en el que el grupo tiol puede sustituirse con el grupo



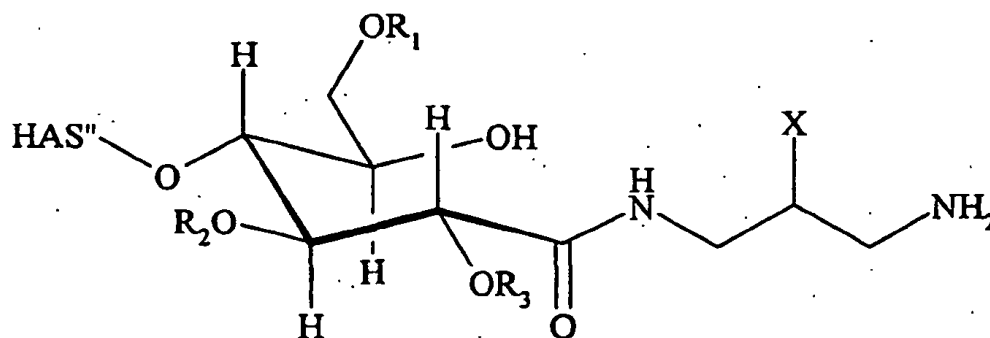
Por consiguiente, también se describe un derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-tiol beta-amino según la fórmula (VIa)

5



(VIa)

o según la fórmula (VIb)



(VIb)

10 en la que HAS'' se refiere a la molécula de HAS sin la unidad terminal de sacárido en el extremo reductor, y

en la que R₁, R₂ y R₃ son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo, preferiblemente un grupo hidroxietilo.

15 Entonces se hace reaccionar el derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino con el principio activo funcionalizado con tioéster.

20 Según la reacción de la ligación química nativa descrita, el producto intermedio de la reacción del principio activo funcionalizado con tioéster y el hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino, es un tioéster que se convierte de manera irreversible mediante trans-acetilación intramolecular en el conjugado descrito que comprende el principio activo unido a través de un enlace de amida al derivado de hidroxialquilalmidón.

25 La reacción del compuesto funcionalizado de tioéster, es decir el principio activo funcionalizado con tioéster o el hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster o derivado de los mismos, con el compuesto funcionalizado con alfa-X-beta-amino. Es decir, el hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-X-beta-amino o derivados del mismo o el principio activo funcionalizado con alfa-X-beta-amino; puede llevarse a cabo en cualquier disolvente adecuado o mezcla de al menos dos disolventes y a un pH adecuado y a una temperatura de reacción adecuada.

30 La temperatura de reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 0 hasta 40°C, más preferiblemente o desde 10 hasta 30°C tal como aproximadamente de 20 a 25°C, como 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C o 25°C.

El pH de la reacción se lleva a cabo a preferiblemente en el intervalo de desde 5 hasta 9, preferiblemente de desde 6 hasta 8 y más preferiblemente de desde 6,5 hasta 7,5.

35 Como medio de tampón, pueden mencionarse tampones acetato tales como tampón acetato de sodio, por ejemplo que tiene una concentración de aproximadamente 0,1 M, tampones bicarbonato tales como tampón bicarbonato de amonio, por ejemplo que tiene una concentración de aproximadamente 0,5 M, y/o tampones fosfato tales como

tampón fosfato de sodio, por ejemplo que tiene una concentración de aproximadamente 0,1 M.

El tiempo de reacción está preferiblemente en el intervalo de hasta 48 h, más preferiblemente de desde 1 hasta 48 h, más preferiblemente de desde 8 hasta 32 h y más preferiblemente de desde 20 hasta 24 h.

5 La reacción puede llevarse a cabo en cualquier disolvente adecuado. Un disolvente preferido es agua. A la disolución del compuesto funcionalizado de tioéster y/o el compuesto funcionalizado con alfa-X-beta-amino, puede añadirse al menos un catalizador adecuado y/o al menos un adyuvante.

10 Los catalizadores preferidos son, entre otros, tiofenol en una concentración de aproximadamente, por ejemplo, desde el 2 hasta el 6% v/v, preferiblemente de desde el 3 hasta el 5% v/v, o bencilmercaptano, o MESNA en una concentración de aproximadamente, por ejemplo, desde 0,4 hasta 0,6 M tal como aproximadamente 0,5 M, y/o tris(carboxietil)fosfina o una mezcla de dos o más de los mismos.

15 Los adyuvantes preferidos son, entre otros, urea en una concentración de aproximadamente 1 a 8 M, preferiblemente de desde 1 hasta 7 M, más preferiblemente de desde 1 hasta 6 M, más preferiblemente de desde 1 hasta 5 M, más preferiblemente de desde 1 hasta 4 M, más preferiblemente de desde 1 hasta 3 M tal como aproximadamente 2 M, o clorhidrato de guanidina en una concentración de aproximadamente 4 a 8 M, preferiblemente de desde 5 hasta 7 M tal como aproximadamente 6 M, un disolvente orgánico adecuado tal como
20 DMF o acetonitrilo en una concentración de aproximadamente del 20 al 40% v/v, preferiblemente aproximadamente del 25 al 35% v/v; o sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) en una concentración de aproximadamente desde el 2 hasta el 8% v/v, preferiblemente de desde el 3 hasta el 7% v/v, más preferiblemente de desde el 4 hasta el 6% v/v tal como aproximadamente el 5% v/v, o cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente desde 0,1 hasta 0,5 M, preferiblemente de desde 0,2 hasta 0,4 M tal como aproximadamente 0,3
25 M.

La concentración del compuesto funcionalizado de tioéster y el compuesto funcionalizado con alfa-X-beta-amino, respectivamente, en la disolución de reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 0,001 hasta 0,5 M, más
30 preferiblemente de desde 0,02 hasta 0,4 M, más preferiblemente de desde 0,05 M hasta 0,3 M, más preferiblemente de desde 0,1 hasta 0,2 M.

Según una realización descrita en el presente documento, el principio activo es un fármaco de molécula pequeña que comprende un grupo carboxilo. En este caso, el grupo carboxilo del principio activo se convierte de manera adecuada en un grupo tioéster -S-R', por ejemplo mediante
35

- convertir de manera adecuada el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón en un cloruro de ácido y hacer reaccionar el cloruro de ácido con un mercaptano R'-SH a través de deshalogenación de alquiltio (J. March, Advanced Organic Chemistry, 4ª edición, John Wiley and Sons, Nueva York (1992) 409, u otros métodos citados en ese documento (párrafo 0-37), o
40

- convertir el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón en un cloruro de ácido mediante reacción con una sal de talio (I) de un tiolato (Spessard, G., *et al.*, Organic Synthesis Collection, vol. 7, 87), o

45 - haciendo reaccionar el hidroxialquilalmidón terminado con ácido carboxílico mediante reacción del ácido con un fosforocloridato de dialquilo o difenilo para formar un anhídrido que entonces puede convertirse en el tioéster correspondiente (Masamune, S., *et al.*, Can. J. Chem. 53 (1975) 3693), o

50 - convertir el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón en una imidazolida de un ácido carboxílico, preparado, por ejemplo, mediante reacción del correspondiente ácido carboxílico con, por ejemplo, N,N-carbonildiimidazol) con un tiol ácido en comparación (Masamune, S., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 98 (1976) 7874), o

- convertir el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón usando un disulfuro y trifeniilfosfina en el tioéster correspondiente (Mukaiyama, T., *et al.*, Bull. Chem. Soc. Jpn. 43 (1970) 1271), o

55 - hacer reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilo con tioisocianatos de arilo (Grieco, P., *et al.*, Tetrahedron Lett. 43 (1979) 1283), o

- hacer reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilo con cloroformiato de tiopiridilo (Corey, E.J., *et al.*, Tetrahedron Lett. (1979), 2875), o

60 - hacer reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilo con tosilato de 2-fluoro-N-metilpiridinio (Watanabe, Y., *et al.*, Chem. Lett (1976) 741), o

65 - hacer reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilo con 1-hidroxibenzotriazol (Pelter, A., *et al.*, J. Chem Soc., Perkin trans I (1977) 1672).

Se prefiere que el grupo carboxilo del principio activo se convierta en un grupo tioéster -S-R' mediante

- convertir de manera adecuada el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón en un cloruro de ácido y hacer reaccionar el cloruro de ácido con un mercaptano R'-SH a través de deshalogenación de alquilitio (J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 4ª edición, John Wiley y Sons, Nueva York (1992) 409, u otros métodos citados en ese documento (párrafo 0-37),

o mediante

- hacer reaccionar el extremo reductor oxidado del hidroxialquilalmidón con una carbodiimida tal como tales como carbodiimida de diisopropilo (DIC), carbodiimidias de dicitlohexilo (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), EDC inmovilizada sobre un soporte sólido y un tiol. (C.E-Lin *et al.* *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 4531-34; M. Adamczyk, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 4305-8, J. Hovinen, *Nucleosides Nucleotides* 18 (1999) 1263-4).

Según otra realización descrita en el presente documento, el principio activo es un péptido producido de manera artificial. Según una alternativa preferida de la presente invención, se prepara el péptido funcionalizado con tioéster usando una resina de síntesis adecuada que tiene en cuenta péptidos funcionalizados con tioéster.

Los péptidos funcionalizados con tioéster pueden sintetizarse usando química de Boc así como química de Fmoc. Tam *et al.* describen la síntesis de péptidos funcionalizados con tioéster usando química de Boc en la resina de Trt-mercapto-propionil-MBHA lábil a ácido (Tam., J.P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 12485). Según una realización especialmente preferida, el grupo Trt se elimina con TFA/DCM. Tras el lavado y la neutralización con DIPEA, la resina puede cargarse con el residuo C-terminal del péptido usando la activación de DIPCDI/HOBt. Se prefiere que los sitios de tiol sin reaccionar se tapen entonces con AcCl/DIPEA en DCM. Después de que la extensión de cadena usando protocolos de Boc convencional, la escisión de HF proporciona el péptido funcionalizado con tioéster desprotegido en la cadena lateral.

Li *et al.* describen la síntesis de péptidos funcionalizados con tioéster usando química de Fmoc (Li, X. *et al.*, (1998) *Tetrahedron Letters* 39(47):8669-8672). En una realización preferida, se usa una mezcla de 1-metilpirrolidina, hexametilenoimina y HOBt como agente desbloqueante para la eliminación de Fmoc, preferiblemente en una mezcla de NMP y DMSO, más preferiblemente en la que la razón molar de NMP y DMSO es de desde 1:10 hasta 10:1, incluso más preferiblemente desde 1:5 hasta 5:1, lo más preferiblemente desde 1:2 hasta 2:1. Las resinas que van a usarse pueden ser, por ejemplo, las resinas citadas en Li *et al.* o citadas en Goldstein y Gelb (2000) *Tetrahedron Letters* 41(16):2797-2800.

Otra posibilidad de producir péptidos funcionalizados con tioéster también se basa en la química de Fmoc y hace uso de un cierre de seguridad de sulfamilbutirilo unido que emplea la escisión tiolítica, por ejemplo a partir de la resina 4-sulfamilbutirilo NovaSyn TG (Shin, Y., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999), 11684; Ingenito, R., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 11369). Las resinas de la síntesis modificadas con los ligadores mencionados están comercialmente disponibles para ambas, la química de Boc y la química de Fmoc (por ejemplo de Novabiochem, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Alemania).

Por tanto, también se describe un método para producir un péptido funcionalizado con tioéster, comprendiendo dicho método la producción del péptido mediante la síntesis de péptido de fase sólida química en una resina de la síntesis que tiene en cuenta que la formación de tioéster C-terminal en la etapa de escisión final forma el soporte sólido tras la desprotección de la cadena lateral.

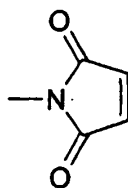
Según una realización adicional de la presente invención, el principio activo es una proteína.

La proteína puede producirse mediante procedimientos sintéticos químicos o puede ser de cualquier ser humano u otra fuente de mamífero y puede obtenerse mediante purificación de fuentes que se producen de manera natural como ser humano o animal. En este caso, es posible la producción de un derivado de la proteína haciendo reaccionar al menos un grupo funcional de la proteína con un compuesto adecuado que comprende al menos un grupo funcional que se hace reaccionar con un grupo funcional de la proteína y al menos un otro grupo funcional que es un grupo tioéster o un grupo G que puede modificarse químicamente para dar un grupo tioéster. Una modificación química de este tipo puede ser una reacción de este grupo funcional G con un compuesto adicional que comprende un grupo funcional que se hace reaccionar con G y otro grupo funcional que es un grupo tioéster -S-R'.

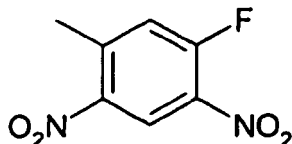
Como grupo funcional de la proteína, pueden mencionarse un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo carboxilo, un grupo ceto, un grupo aldehído o un grupo hemiacetal. El grupo ceto o el grupo aldehído o el grupo hemiacetal puede producirse oxidando química o enzimáticamente una unidad de sacárido de la proteína tal como una unidad de sacárido de una cadena lateral de hidrato de carbono de una proteína glicosilada.

Dependiendo de la naturaleza química del grupo funcional de la proteína, el grupo funcional del compuesto adecuado que se hace reaccionar con el grupo funcional de la proteína es, por ejemplo:

- dobles enlaces C-C o triples enlaces C-C o enlaces C-C aromáticos;
- el grupo tio o los grupos hidroxilo;
- 5 - hidrazida del ácido alquilsulfónico, hidrazida del ácido arilsulfónico;
- 1,2-dioles;
- 10 - 1,2 amino-tioalcoholes;
- azidas;
- 1,2-aminoalcoholes;
- 15 - el grupo amino -NH₂ o derivados de los grupos amino que comprenden la unidad estructural -NH- tal como grupos aminoalquilo, grupo aminoarilo, grupos aminoaralquilo o grupos alcarilamino;
- el grupo hidroxilamino -O-NH₂, o derivados del grupo hidroxilamino que comprende la unidad estructural -O-NH-, tal como grupos hidroxilaralquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino o grupos hidroxilaralcarilamino;
- 20 - grupos alcoxiamino, grupos ariloxiamino, grupos aralquioxiamino o grupos alcariloxiamino, cada uno que comprende la unidad estructural -NH-O-;
- residuos que tienen un grupo carbonilo, -Q-C(=G)-M, en el que G es O o S, y M es, por ejemplo,
- 25 --OH o -SH;
- un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo aralquioxilo o un grupo alcariloxilo;
- 30 -- un grupo alquiltio, un grupo ariltio, un grupo aralquiltio, o un grupo alcariltio;
- un grupo alquilcarboniloxilo, un grupo arilcarboniloxilo, un grupo aralquilcarboniloxilo, un grupo alcarilcarboniloxilo;
- 35 -- ésteres activados tales como ésteres de hidroxilaminas que tienen estructura imid tal como N-hidroxisuccinimida o que tiene una unidad estructural O-N en la que N es parte de un compuesto de heteroarilo o, con G = O y Q ausente, tal como compuestos de ariloxilo con un residuo de arilo sustituido tal como pentafluorofenilo, paranitrofenilo o triclorofenilo;
- 40 en los que Q está ausente o NH o un heteroátomo tal como S u O;
- -NH-NH₂, o -NH-NH-;
- 45 - -NO₂;
- el grupo nitrilo;
- grupos carbonilo tales como el grupo aldehído o el grupo ceto;
- 50 - el grupo carboxilo;
- el grupo -N=C=O o el grupo -N=C=S;
- grupos de haluro de vinilo tales como el grupo yoduro de vinilo o el bromuro de vinilo o triflato;
- 55 - -C≡C-H;
- (C=NH₂Cl)-O-alquilo
- 60 - grupos -(C=O)-CH₂-Hal en los que Hal es Cl, Br, o I;
- CH=CH-SO₂-;
- un grupo disulfuro que comprende la estructura -S-S-;
- 65 - el grupo



- el grupo



5 El grupo funcional del compuesto adecuado y el grupo tioéster o el grupo G pueden separarse mediante cualquier espaciador adecuado. Entre otros, el espaciador puede ser un residuo de hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico, opcionalmente sustituido. Generalmente, el residuo de hidrocarburo tiene desde 1 hasta 60, preferiblemente desde 1 hasta 40, más preferiblemente desde 1 hasta 20, más preferiblemente desde 2 hasta 10, más preferiblemente desde 2 hasta 6 y de manera especialmente preferida desde 2 hasta 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo de separación comprende generalmente desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 8 y de manera especialmente preferida desde 1 hasta 4 heteroátomos. El residuo de hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, desde 5 hasta 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico.

15 En el caso en que el grupo G se modifica químicamente con un compuesto adicional que comprende un grupo funcional que se hace reaccionar con G y otro grupo funcional que es un grupo tioéster -S-R', el grupo funcional que se hace reaccionar con G puede seleccionarse de manera adecuada del grupo de grupos funcionales descritos anteriormente con respecto a Q. El grupo tioéster y el grupo que se hace reaccionar con G pueden separarse mediante cualquier espaciador adecuado. Entre otros, el espaciador puede ser un residuo de hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico, opcionalmente sustituido. Generalmente, el residuo de hidrocarburo tiene desde 1 hasta 60, preferiblemente desde 1 hasta 40, más preferiblemente desde 1 hasta 20, más preferiblemente desde 2 hasta 10, más preferiblemente desde 2 hasta 6 y de manera especialmente preferida desde 2 hasta 4 átomos de carbono. Si están presentes heteroátomos, el grupo de separación comprende generalmente desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 8 y de manera especialmente preferida desde 1 hasta 4 heteroátomos. El residuo de hidrocarburo puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificada o un grupo arilo o un grupo cicloalquilo que tiene, por ejemplo, desde 5 hasta 7 átomos de carbono, o ser un grupo aralquilo, un grupo alcarilo en el que la parte de alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico.

30 Preferiblemente, la proteína se produce de manera recombinante. Esto incluye expresión de huésped procariotas o eucariotas de secuencias de ADN exógeno obtenidas mediante clonación genómica o de ADNc o mediante síntesis de ADN. La producción recombinante de una proteína se conoce en la técnica. En general, esto incluye la transfección de células huésped con un vector de expresión apropiado, el cultivo de las células huésped en condiciones que permiten la producción de la proteína y la purificación de la proteína a partir de las células huésped.

35 Aún según una realización adicional preferida, se usa un vector de expresión que conduce a una proteína funcionalizada con tioéster, preferiblemente un tioéster de polipéptido C-terminal. En una realización, la proteína funcionalizada con tioéster se une a través de un tioéster C-terminal unido a un polipéptido de inteína, preferiblemente a un polipéptido de fusión de cola de afinidad de inteína. Tales proteínas funcionalizadas con tioéster, por ejemplo, pueden obtenerse fusionando la proteína de interés en marco con, preferiblemente un mutante, polipéptido de inteína-CBD, por ejemplo en el contexto de los vectores del sistema IMPACT (TM) - CN comercialmente disponible, como pCYB o pTYB (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Alemania). La proteína funcionalizada con tioéster unida a través de un tioéster unido a la inteína (TFPI) preferiblemente comprende una cola de afinidad fusionada en el extremo C-terminal de la inteína, más preferiblemente la cola de afinidad puede ser un dominio de unión a quitina (CBD), una cola de polihistidina, Strep-tag o GST. En una realización, el TFPI se une adicionalmente a través de una cola de afinidad a una correspondiente resina de afinidad, por ejemplo unida a una perla de quitina a través de un CBD fusionado con la inteína (véase, por ejemplo, Muir *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6705-6710). En una realización preferida, se purifica el TFPI sobre una resina de afinidad en condiciones que conducen al enlace de tioéster intacto (véase Muir *et al.*, anteriormente). La unión de TFPI a la resina de afinidad puede entonces hacerse reaccionar con el HES funcionalizado con alfa-X-beta-amino, preferiblemente con el HES funcionalizado con alfa-X-beta-amino tales como HES funcionalizado con alfa-X-beta-amino con un peso molecular medio de aproximadamente 10 kD.

55 Se prefiere que una proteína funcionalizada con tioéster unida a través de un enlace de tioéster a un residuo alquilo, arilo o aralquilo (TFPA) se genere, por ejemplo haciendo reaccionar el TFPI con un alquiltiol, ariltiol o aralquiltiol. En

una realización preferida, el alquiltiol no es un ditiol y se selecciona de metil, etil, propil o butiltiol; se prefiere particularmente etiltiol. El alquiltiol también puede ser un ácido mercaptoalquilcarbónico o un ácido mercaptoalquilsulfónico. Se prefiere particularmente ácido 2-mercaptoetanosulfónico. En otra realización, el ariltiol no es un ditiol y puede ser, por ejemplo, tiofenol, 1-tio-2-nitrofenol, ácido 2-tio-benzoico, 2-tiopiridina, ácido 4-tio-2-piridincarboxílico o 4-tio-2-nitropiridina. El TFPA puede aislarse, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 2002/0151006A1 en el ejemplo 3 para un Abl-SH3 etil-tioéster, y puede usarse o bien directamente para la reacción con el HES funcionalizado con alfa-X-beta-amino o bien puede incluso purificarse adicionalmente y entonces usarse para la reacción o puede incluso almacenarse y entonces usarse para la reacción posterior. Un ejemplo adicional de un TFPA se muestra en Iakovenko, A., *et al.*, FEBS Letters 468 (2000) 155-158, en el que se generó un Rab7ΔC6 funcionalizado con tioéster en la sección 2.2. (un tioéster con ácido 2-mercaptoetanosulfónico), se purificó y se almacenó antes de usar para una etapa de acoplamiento final.

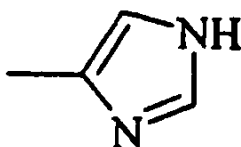
Por tanto, también se describe un método tal como se describió anteriormente, en el que el principio activo es una proteína que se produjo usando un vector de expresión que conduce a una proteína funcionalizada con tioéster.

Según otro aspecto, la presente invención también se refiere a un conjugado que puede obtenerse por un método tal como se describió anteriormente.

Se prevé que el método según la presente invención es un método quimioselectivo, es decir dependiendo de las alternativas descritas anteriormente, el acoplamiento de hidroxialquilalmidón o un derivado del mismo, preferiblemente hidroxietilalmidón o un derivado del mismo, tiene lugar en sitios específicos del principio activo tal como selectivamente en el extremo N-terminal del principio activo en el caso de que el principio activo tenga un residuo de cisteína N-terminal, tal como se describió anteriormente, o selectivamente en el extremo C-terminal del principio activo en el caso de que el principio activo tenga un grupo tioéster C-terminal tal como se describió anteriormente, en el que el principio activo se hace reaccionar con un derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster y con un derivado de hidroxialquilalmidón funcionalizado con alfa-tiol beta-amino, respectivamente.

El término "selectivamente a un extremo terminal" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a un procedimiento según el que 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 moléculas de principio activo se hacen reaccionar exclusivamente a través del respectivo extremo terminal.

La presente invención también comprende una realización en la que el grupo tiol del grupo alfa-tiol beta-amino se sustituye con un grupo según la fórmula



Por tanto, en lugar de una cisteína, puede emplearse una histidina, preferiblemente una cisteína o histidina N-terminal.

En los métodos para preparar un conjugado de la invención, la tasa de conversión en los métodos descritos anteriormente puede ser de al menos el 50%, más preferido al menos el 70%, incluso más preferido al menos el 80% y en particular el 95% o incluso más, tales como al menos el 98% o el 99%.

Aún según otro aspecto, la presente invención también se refiere a un conjugado tal como se describió anteriormente o un conjugado, que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente, para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal.

Los conjugados según la invención pueden ser al menos el 50% puros, incluso más preferido al menos el 70% puros, incluso más preferido al menos el 90%, en particular al menos el 95% o al menos el 99% puros. En la realización más preferida, los conjugados pueden ser el 100% puros, es decir no hay otros subproductos presentes.

Por tanto, según otro aspecto, la presente invención también se refiere a una composición que puede comprender el/los conjugado(s) de la invención, en el/los que la cantidad del/de los conjugado(s) puede ser de al menos el 50% en peso, incluso más preferido al menos el 70% en peso, incluso más preferido al menos el 90% en peso, en particular al menos el 95% en peso o al menos el 99% en peso. En la realización más preferida, la composición puede consistir en el/los conjugado(s), es decir la cantidad del/de los conjugado(s) es del 100% en peso.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado tal como se describió anteriormente o un conjugado, que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente.

- 5 Además, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado tal como se describió anteriormente o un conjugado, que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente, comprendiendo además dicha composición farmacéutica al menos un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un análisis de los conjugados de péptido-tioéster Cys-HES brutos según el ejemplo 2.1 mediante electroforesis en gel. Para la electroforesis en gel se emplearon XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y una fuente de energía Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de ejecución MES SDS en condiciones reductoras (ambos invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) según la instrucción del fabricante:

20 Carril A: Marcador de peso molecular Roti®-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) de arriba abajo: 200 KD, 119 KD, 66 KD, 43 KD, 29 KD, 20 KD, 14,3 KD;

Carril B: Conjugación de péptido-tioéster A con H-Cys(S-tBu)-HES10/0,4 empleando tiofenol como catalizador;

25 Carril C: Conjugación de péptido-tioéster A con H-Cys(S-tBu)-HES10/0,4 empleando bencilmercaptano como catalizador;

Carril D: Roti®-Mark STANDARD;

Carril E: Conjugación de péptido-tioéster A con H-Cys(S-tBu)-HES10/0,4 sin catalizador.

30 La figura 2 muestra un análisis de los conjugados de péptido con Cys-tioéster-HES brutos según el ejemplo 2.2 mediante electroforesis en gel. Para la electroforesis en gel se emplearon XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y una fuente de energía Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 12% junto con un tampón de ejecución MES SDS en condiciones reductoras (ambos invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) según la instrucción del fabricante:

35 Carril A: Marcador de peso molecular Roti®-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) de arriba abajo: 200 KD, 119 KD, 66 KD, 43 KD, 29 KD, 20 KD, 14,3 KD;

40 Carril B: Conjugación de tioéster-HES10/0,4 con péptido inhibidor de GM-CSF (54-78) empleando tiofenol como catalizador;

Carril C: péptido inhibidor de GM-CSF (54-78).

45 La figura 3 muestra un análisis de los conjugados de EPO tioéster-HES brutos según el ejemplo 2.3 mediante electroforesis en gel. Para la electroforesis en gel se emplearon XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) y una fuente de energía Consort E 143 (CONSORTnv, Turnhout, B). Se usaron un gel Bis-Tris al 10% junto con un tampón de ejecución MOPS SDS, en condiciones reductoras (ambos invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) según la instrucción del fabricante.

50 Carril A: Marcador de peso molecular Roti®-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) de arriba abajo: 200 KD, 119 KD, 88 KD, 43 KD, 29 KD, 20 KD, 14,3 KD;

Carril B: Conjugación de 6,9 equiv. de tioéster-HES con EPO empleando tiofenol como catalizador;

55 Carril C: Conjugación de 34,5 equiv. de tioéster-HES con EPO empleando tiofenol como catalizador;

Carril D: EPO sin tioéster-HES, empleando tiofenol como catalizador.

60 Ejemplos

Ejemplo 1 Síntesis de HES funcionalizado:

Ejemplo 1.1 Síntesis de amino-HES a partir de HES oxidado

65 Se calentaron 5,122 g de HES (PM = 14.500 D, DS = 0,41, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D), oxidado selectivamente en su extremo reductor según el documento DE 196 28 705 A1, a 80°C a vacío durante

15,5 h y se disolvieron bajo nitrógeno en 25 ml de DMSO seco (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). A la disolución resultante, se le añadieron 51,22 mmol de 1,4-diaminobutano (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, D). Tras la incubación durante 17 h a 40°C, se añadió la mezcla de reacción a 150 ml de una mezcla 1:1 enfriada con hielo de etanol (DAB, Sonnenberg, Braunschweig, D) y acetona (Carl Roth GmbH + Co: KG, Karlsruhe, D) (v/v), y se incubó a -20°C durante 1 h. Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se lavó con 40 ml de la misma mezcla, se disolvió de nuevo en 80 ml de agua, se dializó durante 40 h frente a agua (tubo de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D), y se liofilizó. Se aisló el producto con un rendimiento del 67%.

10 **Ejemplo 1.2 (no según la invención) Síntesis de H-Cys(S-tBu)-HES a partir de amino-HES del ejemplo 1.1**

Se disolvieron 86,3 mg de Fmoc-Cys(S-tBu)-OH (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) y 45,9 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 2 ml de N,N-dimetilformamida (calidad de síntesis de péptido, Biosolve, Valkenswaard, NL), y se añadieron 40,7 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D).

Tras la incubación a 21°C durante 30 min., se añadieron 206 mg de amino-HES, sintetizado tal como se describe en el ejemplo 1.1. Tras agitar durante 19 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 14 ml de 2-propanol enfriado con hielo (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se resuspendió de nuevo en 8 ml de 2-propanol y se centrifugó tal como se describe. Se disolvió el precipitado en 20 ml de agua, se añadieron 20 ml de diclorometano (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) y se agitó con vórtex la mezcla. Tras la centrifugación, se aisló la fase acuosa superior, se dializó durante 43 h frente a agua (tubo de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. Se aisló Fmoc-Cys(S-tBu)-HES con un rendimiento del 67%.

Se disolvieron 100,7 mg de Fmoc-Cys(S-tBu)-HES en 1 ml de piperidina al 20% (Acros Organics, Geel, B) en DMF (v/v). Tras agitar durante 15 min. a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 20 ml de terc-butil metil éter (Acros Organics, Geel, B). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se suspendió de nuevo en 10 ml de terc-butil metil éter y se centrifugó. Tras el secado, se disolvió el precipitado en 10 ml de agua y se dializó durante 31 h frente a agua (tubo de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 kD, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) y se liofilizó. Se aisló H-Cys(S-tBu)-HES con un rendimiento del 80%.

Ejemplo 1.3 Síntesis de tioéster-HES a partir de amino-HES del ejemplo 1.1

Se disolvieron 29,3 mg de tiosuccinato de pentafluorofenil-S-bencilo (Link technologies, Bellshill, UK) y 10,1 mg de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) en 1,5 ml de N,N-dimetilformamida (calidad de síntesis de péptido, Biosolve, Valkenswaard, NL), y se añadieron 75 mg de amino-HES, sintetizado tal como se describe en el ejemplo 1.1. Tras agitar durante 15 h a 22°C, se añadió la mezcla de reacción a 15 ml de terc-butil metil éter (Acros Organics, Geel, B). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación a 4°C, se suspendió de nuevo en 8 ml de terc-butil metil éter y se centrifugó. Se secó el precipitado en una corriente de nitrógeno.

Ejemplos 2 Síntesis de conjugados de proteína-HES mediante ligación química:

45 **Ejemplo 2.1 (no según la invención) Síntesis de un conjugado de péptido-tioéster A-HES a partir de H-Cys(S-tBu)-HES y péptido-tioéster A**

A 5 µl de una disolución 10 mg/ml del péptido-tioéster A (GBF, Braunschweig, D, secuencia de aminoácidos:

50 H-SPFGADTTVCCFNYSVRKLPQNHVKDYFYTSSK-éster etílico del ácido tiopropiónico; PM = 3.920 g/mol) en una mezcla 1:1 (v/v) de N,N-dimetilformamida (calidad de síntesis de péptido, Biosolve, Valkenswaard, NL) y tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2, se les añadieron 5 µl de una disolución de H-Cys(S-tBu)-HES 255 mg/ml, sintetizada tal como se describe en el ejemplo 1.2, y 5 µl de una disolución de catalizador 1,5 M en DMF a 22°C. Como catalizador, se emplearon o bien tiofenol (figura 1, carril B) o bien bencilmercaptano (figura 1, carril C). Como control de reacción, se añadieron 5 µl de tampón en lugar de la disolución de catalizador a la mezcla de derivado de HES y péptido (figura 1, carril E).

Se incubaron las mezclas durante la noche a temperatura ambiente y se analizaron mediante electroforesis en gel (figura 1).

60 **Ejemplo 2.2 Síntesis de un conjugado de péptido inhibidor de GM-CSF-HES a partir de tioéster-HES y péptido inhibidor de GM-CSF**

65 A 10 µl de una disolución 2,82 mg/ml del péptido con Cys N-terminal, péptido inhibidor de GM-CSF (54-78) (Bachem AG, n.º de pedido H-3438, Bubendorf, CH, secuencia de aminoácidos: H-Cys-Leu-Gln-Thr-Arg-Leu-Glu-Leu-Tyr-Lys-

Gln-Gly-Leu-Arg-Gly-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-Lys-Gly-Pro-Leu-Thr-OH; PM = 2.816,4 g/mol) en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2, que contenía cloruro de sodio 150 mM y EDTA 5 mM, se añadieron 32 µl de una disolución 156 mg/ml de tioéster-HES, sintetizado tal como se describe en el ejemplo 1.3, en el mismo tampón y 1,7 µl de tiofenol (figura 2, carril B) a 22°C.

5 Se incubó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente y se analizó mediante electroforesis en gel (figura 2).

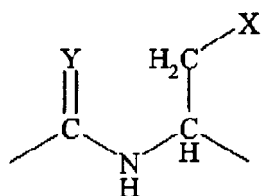
Ejemplo 2.3 Control de reacción - incubación de EPO con tioéster-HES

10 A 19,2 µl de una disolución 0,78 mg/ml de EPO (EPO producida de manera recombinante que tenía la secuencia de aminoácidos de EPO humana y esencialmente las mismas características que Erypo® comercialmente disponible (Ortho Biotech, Jansen-Cilag) o NeoRocormon® (Roche), véanse los documentos EP 0 148 605, EP 0 205 56.4, EP 0 411 678) en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2, que contenía cloruro de sodio 150 mM, se añadieron 1,7 µl de tiofenol y 5 µl de una disolución o bien 10 o bien 50 mg/ml de tioéster-HES, sintetizado tal como se describe en el ejemplo 1.3, en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2, que contenía cloruro de sodio 150 mM y EDTA 50 mM (figura 3, carriles B y C) a 22°C. Como control de reacción, se realizó la misma reacción sin tioéster-HES (figura 3, carril D).

15 Se incubó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente y se analizó mediante electroforesis en gel.

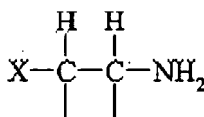
REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un conjugado de un principio activo e hidroxialquilalmidón, en el que el principio activo y el hidroxialquilalmidón están covalentemente unidos mediante un residuo químico que tiene una estructura según la fórmula (I)



(I)

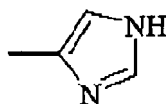
en la que Y es un heteroátomo, seleccionado del grupo que consiste en O y S, comprendiendo dicho método hacer reaccionar un grupo tioéster $-(C=Y)-S-R'$ de un derivado de hidroxialquilalmidón que comprende dicho grupo tioéster con un grupo alfa-X-beta-amino



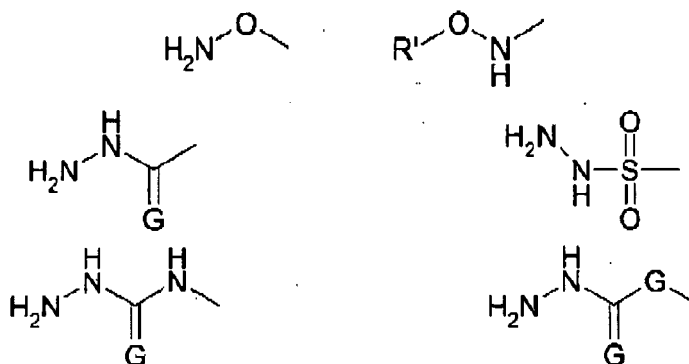
de un derivado de principio activo que comprende dicho grupo alfa-X-beta-amino, comprendiendo dicho método además hacer reaccionar un hidroxialquilalmidón con un compuesto al menos bifuncional que comprende un grupo funcional M que se hace reaccionar con el hidroxialquilalmidón por medio del extremo reductor no oxidado, y un grupo funcional Q que es un grupo tioéster o un grupo funcional que se modifica adicionalmente para dar un grupo tioéster,

para dar el derivado de hidroxialquilalmidón que comprende dicho grupo tioéster, en el que R' se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo y heteroaralquilo lineal, cíclico y/o ramificado, opcionalmente sustituido de manera adecuada, preferiblemente bencilo,

en el que X se selecciona del grupo que consiste en SH y



y en la que el grupo $-(C=Y)$ se deriva del grupo tioéster $-(C=Y)-S-R'$ y el grupo $HN-CH-CH_2-X$ se deriva del grupo alfa-X-beta-amino, y en el que el grupo funcional M se selecciona del grupo que consiste en



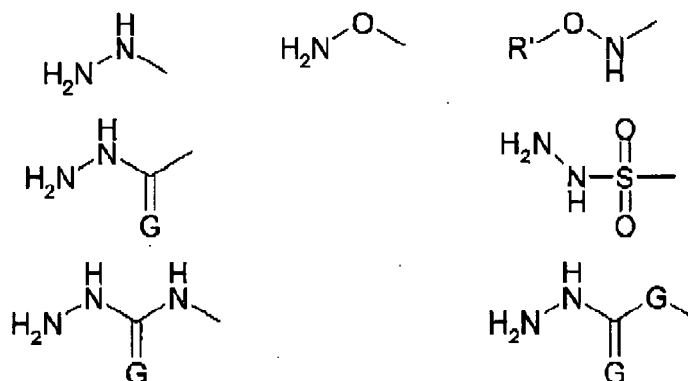
en los que G es O o S y, si está presente dos veces, independientemente O o S, y R' es metilo.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el hidroxialquilalmidón funcionalizado con tioéster se hace reaccionar con un grupo alfa-X-beta-amino del principio activo estando comprendido el grupo alfa-X-beta-amino en un residuo de cisteína o histidina del principio activo.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el grupo funcional Q comprende la estructura química NH-.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo funcional Q se selecciona del grupo que consiste en

5

H₂N-

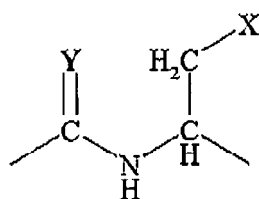


10

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

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el grupo funcional Q es un grupo amino -NH₂.
6. Conjugado de un principio activo e hidroxialquilalmidón, en el que el principio activo y el hidroxialquilalmidón están unidos mediante un resto químico, que tiene una estructura según la fórmula (IV)

15

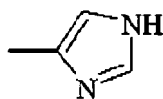


20

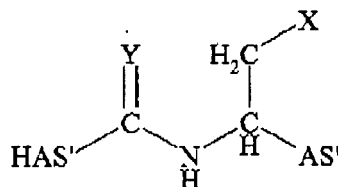
(IV)

en la que Y es un heteroátomo, seleccionado del grupo que consiste en O y S, y X se selecciona del grupo que consiste en SH y

25



teniendo dicho conjugado una estructura según la fórmula (II)

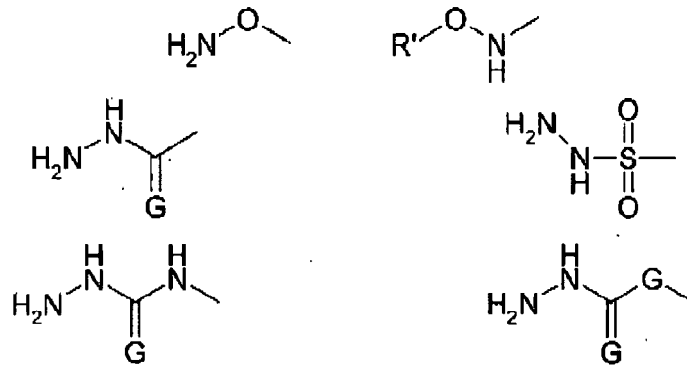


30

(II)

en la que HAS' es el residuo del derivado de hidroxialquilalmidón que se unió al grupo tioéster haciendo reaccionar el hidroxialquilalmidón con un compuesto al menos bifuncional que comprende un grupo funcional M que se hace reaccionar con el hidroxialquilalmidón por medio del extremo reductor no oxidado, y un grupo funcional Q que es un grupo tioéster o un grupo funcional que se modifica adicionalmente para dar un grupo tioéster, para dar el derivado de hidroxialquilalmidón que comprende dicho grupo tioéster, y en la que AS' es el residuo del principio activo o un derivado del mismo que se unió al grupo alfa-X-beta-amino, y en el que el grupo funcional M se selecciona del grupo que consiste en

35



- 5 en los que G es O o S y, si está presente dos veces, independientemente O o S, y R' es metilo, y en la que el grupo -(C=Y) se deriva del grupo tioéster -(C=Y)-S-R' y el grupo HN-CH-CH₂-X se deriva del grupo alfa-X-beta-amino.
7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que el principio activo se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos y fármacos de molécula pequeña.
8. Conjugado según las reivindicaciones 6 a 7, en el que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón que tiene un peso molecular medio de desde 1 hasta 300 kD, preferiblemente desde 2 hasta 200 kD, más preferiblemente desde 4 hasta 130 kD; y un grado de sustitución en el intervalo de desde 0,1 hasta 0,8.
9. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.
10. Composición farmacéutica que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, que comprende además al menos un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Composición que comprende conjugados de un principio activo e hidroxialquilalmidón según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.

Fig. 1

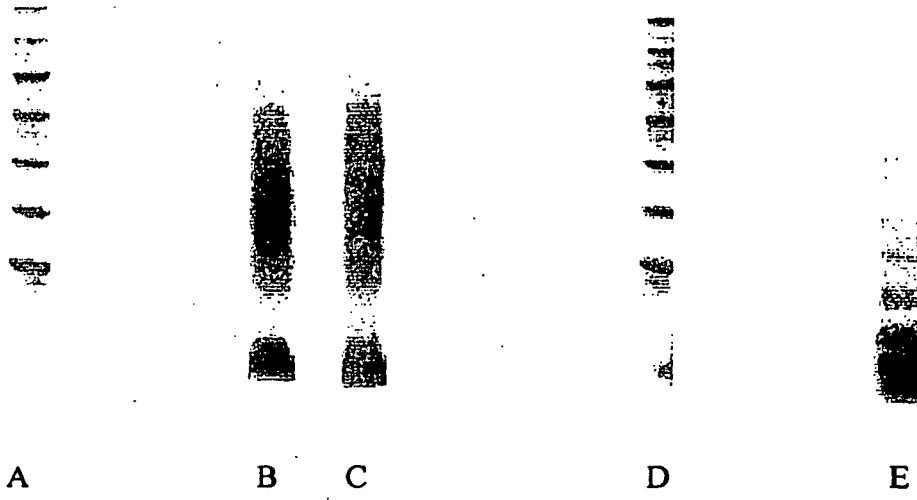


Fig. 2

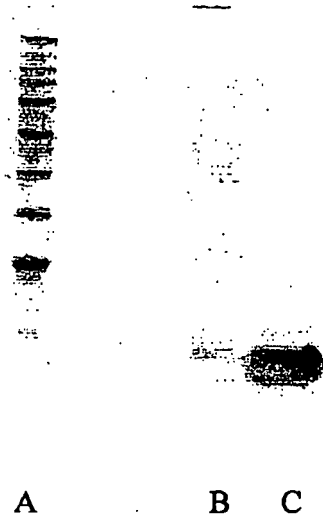


Fig. 3

