

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 006**

51 Int. Cl.:

**C08B 31/12** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07K 14/505** (2006.01)

**C07K 17/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2003 E 09012453 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 2143736**

54 Título: **Derivados de HIDROXIALQUILALMIDÓN**

30 Prioridad:

**11.09.2002 EP 02020425**

**11.09.2002 US 409781 P**

**08.08.2003 WO PCT/EP03/08859**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.03.2013**

73 Titular/es:

**FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH**

**(100.0%)**

**ELSE-KRÖNER-STRASSE 1**

**61352 BAD HOMBURG, DE**

72 Inventor/es:

**ZANDER, NORBERT;**

**EICHNER, WOLFRAM y**

**CONRADT, HARALD**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

ES 2 399 006 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

Derivados de hidroxialquilalmidón

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de hidroxialquilalmidón, particularmente derivados de hidroxialquilalmidón que pueden obtenerse mediante un procedimiento en el que se hace reaccionar hidroxialquilalmidón con un grupo amino primario o secundario de un compuesto de unión. Según una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a derivados de hidroxialquilalmidón que pueden obtenerse mediante un procedimiento según el cual se hace reaccionar hidroxialquilalmidón con un grupo amino primario o secundario de un compuesto de unión y se hace reaccionar el producto de reacción resultante con un polipéptido, preferiblemente con una glicoproteína y de manera especialmente preferible con eritropoyetina, mediante al menos otro grupo reactivo del compuesto de unión. Un hidroxialquilalmidón que se prefiere especialmente es hidroxietilalmidón. Según la presente invención, se hace reaccionar el hidroxialquilalmidón, y preferiblemente el hidroxietilalmidón, con el compuesto de unión en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción.

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

La amilopectina consiste restos 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 están determinadas 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 vuelta. 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 en el patrón de sustitución en un grado limitado.

En la técnica se describen algunas maneras de producción de un derivado de hidroxietilalmidón.

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

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

Un problema bien conocido con la aplicación de polipéptidos y enzimas es que con frecuencia estas proteínas muestran una estabilidad insatisfactoria. Especialmente la eritropoyetina tiene una semivida en plasma relativamente corta (Spivak y Hogans, 1989, *Blood* 73, 90; McMahon *et al.*, 1990, *Blood* 76, 1718). Esto significa que se pierden rápidamente los niveles en plasma terapéuticos y deben llevarse a cabo administraciones intravenosas repetidas. Además, en determinadas circunstancias se observa una respuesta inmunitaria frente a los péptidos.

Generalmente se acepta que puede mejorarse la estabilidad de polipéptidos y se reduce la respuesta inmunitaria frente a estos polipéptidos cuando se acoplan los polipéptidos a moléculas poliméricas. El documento WO 94/28024 da a conocer que polipéptidos fisiológicamente activos modificados con polietilenglicol (PEG) muestran una reducción de la inmunogenicidad y antigenicidad y circulan en el torrente sanguíneo durante considerablemente más tiempo que las proteínas no conjugadas, es decir, tienen una velocidad de aclaramiento más larga. Sin embargo, los conjugados de PEG-fármaco muestran diversas desventajas, por ejemplo, no muestran una estructura natural que pueda reconocerse por elementos de rutas de degradación *in vivo*. Por tanto, aparte de conjugados de PEG, se han producido otros conjugados y polimerizados de proteínas. Se ha descrito una pluralidad de métodos para la reticulación de diferentes proteínas y macromoléculas tales como polimerasa en la bibliografía (véase, por ejemplo, Wong, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, 1993, CRCS, Inc.).

Los conjugados de HES-fármaco dados a conocer en la técnica presentan la desventaja de que HES no se conjuga al fármaco de manera específica para el sitio. Por consiguiente, la conjugación da como resultado un producto muy heterogéneo que tiene muchos componentes que pueden ser inactivos debido a la destrucción de la estructura tridimensional durante la etapa de conjugación. Por tanto, existe la necesidad de conjugados de HES-polipéptidos

adicionalmente mejorados con estabilidad y/o bioactividad mejoradas.

5 Un método de producción de estos conjugados usa, como material de partida, una forma oxidada de HES que se hace reaccionar con un compuesto de reticulación en el que se hace reaccionar el producto resultante con un polipéptido o se modifica adicionalmente y se hace reaccionar posteriormente con un polipéptido. Una desventaja importante de este método es que en una primera etapa, el HES original ha de oxidarse selectivamente, en general en su extremo reductor, oxidando el grupo aldehído y/o grupo hemiacetal terminal para dar una lactona, haciendo de ese modo que el proceso global sea más difícil y caro.

10 El documento WO 02/080979 da a conocer compuestos que comprenden un conjugado de un agente activo y un hidroxialquilalmidón en los que el agente activo y el hidroxialquilalmidón están unidos o bien directamente o bien mediante un compuesto de unión. En lo que se refiere a la unión directa, la reacción de agente activo e hidroxialquilalmidón se lleva a cabo en un medio acuoso que comprende al menos el 10% en peso de agua. No se proporcionan ejemplos que se refieran a un derivado de hidroxialquilalmidón que se produce haciendo reaccionar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor con un compuesto de reticulación que comprende la unidad estructural -NH- en un medio acuoso. Todos los ejemplos se refieren a hidroxialquilalmidón que se oxida antes de una reacción adicional, teniendo de ese modo la enseñanza específica del documento WO 02/080979 las desventajas mencionadas anteriormente.

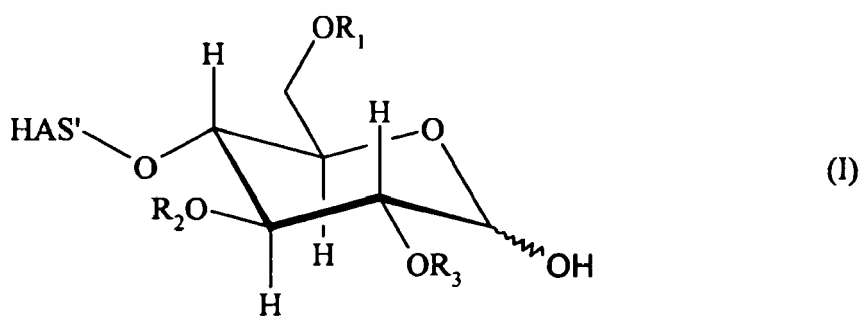
20 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de un derivado de hidroxialquilalmidón que permite hacer reaccionar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor con un compuesto adecuado en el que el extremo reductor del almidón no se oxida antes de la reacción.

25 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método de producción de un derivado de hidroxialquilalmidón que permite hacer reaccionar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor con un compuesto adecuado en el que el extremo reductor del almidón no se oxida antes de la reacción, caracterizándose además dicho método porque el producto de reacción de la reacción de hidroxialquilalmidón en su extremo reductor con un compuesto adecuado se hace reaccionar adicionalmente con al menos un compuesto adicional.

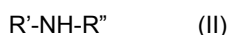
30 Todavía un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método tal como se describió anteriormente en el que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido, preferiblemente una proteína, más preferiblemente eritropoyetina.

35 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente que comprende hacer reaccionar hidroxialquilalmidón en su extremo reductor con un compuesto adecuado en el que el extremo reductor del almidón no se oxida antes de la reacción.

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



45 en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción, con un compuesto de fórmula (II)



en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado,

50 en el que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  con el compuesto (I) en su extremo reductor que no se oxida;

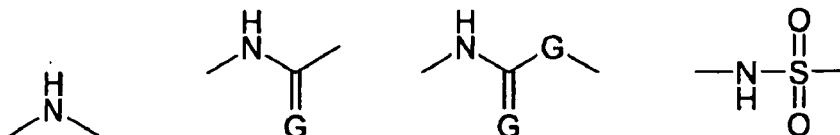
55 en la que  $R'$  es H, o un residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo, uniéndose el residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo opcionalmente mediante un puente de oxígeno al grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  del compuesto (II),

y en la que R" comprende un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con al menos otro compuesto antes o después de la reacción de (I) y (II),

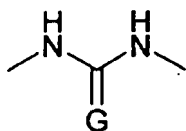
5 y

-- en el que el compuesto (II) es una hidroxilamina,

10 -- o en la que R" comprende, aparte del grupo funcional X, un grupo funcional adicional W que se une directamente al grupo NH que forma un puente entre R' y R", seleccionándose dicho grupo funcional W del grupo que consiste en



15 y



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

25 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. Por tanto, el término hidroxialquilalmidón tal como se usa en la presente invención no se limita a compuestos en los que el resto hidrato de carbono terminal comprende grupos hidroxialquilo R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y/o R<sub>3</sub> tal como se representan, por motivos de brevedad, en la fórmula (I), sino que también se refiere a compuestos en los que al menos un grupo hidroxilo presente en cualquier sitio, o bien en el resto hidrato de carbono terminal y/o bien en la parte restante de la molécula de almidón, HAS', está sustituido con un grupo hidroxialquilo R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub>.

30 En este contexto, el grupo alquilo puede ser un grupo alquilo lineal o ramificado que puede estar adecuadamente sustituido. Preferiblemente, el grupo hidroxialquilo contiene de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente desde 1 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente desde 1 hasta 4 átomos de carbono, e incluso más preferiblemente 2-4 átomos de carbono. Por tanto, "hidroxialquilalmidón" comprende preferiblemente hidroxietilalmidón, hidroxipropilalmidón e hidroxibutilalmidón, en los que se prefieren particularmente hidroxietilalmidón e hidroxipropilalmidón.

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

40 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.

45 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, siempre que el HAS siga siendo soluble en agua. Además, el grupo hidroxilo terminal de un grupo hidroxialquilo puede estar esterificado o eterificado.

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

50 El 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, butilalmidón y propilalmidón.

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

En el caso de derivados de ácidos dicarboxílicos, es útil que el segundo grupo carboxilo del ácido dicarboxílico

también esté esterificado. Además, derivados de ésteres monoalquílicos de ácidos dicarboxílicos también son adecuados en el contexto de la presente invención.

5 Para los ácidos mono o dicarboxílicos sustituidos, los grupos sustituyentes pueden ser preferiblemente los mismos que se mencionaron 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). El hidroxietilalmidón (HES) es el más preferido para todas las realizaciones de la presente invención.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón.

15 El HES se caracteriza principalmente por la distribución de peso molecular y el grado de sustitución. Existen dos posibilidades de descripción del grado de sustitución:

20 1. El grado de sustitución puede describirse con relación a la parte de monómeros de glucosa sustituidos con respecto a todos los restos glucosa (GS).

2. El grado de sustitución puede describirse como la "sustitución molar" (MS), en la que se describen el número de grupos hidroxietilo por resto glucosa.

25 Las disoluciones de HES están presentes como composiciones polidispersas, en las que cada molécula difiere de las demás con respecto al grado de polimerización, el número y el patrón de sitios de ramificación, y el patrón de sustitución. Por tanto, el 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 dependiendo del número de moléculas. Alternativamente,  $M_w$ , la media en peso, representa una unidad que depende de la masa del HES.

30 En el contexto de la presente invención, el hidroxietilalmidón puede tener un peso molecular medio (media en peso) de desde 1 hasta 300 kDa, en el que se prefiere más una media de peso molecular de desde 5 hasta 100 kDa. El hidroxietilalmidón puede mostrar además un grado de sustitución molar de desde 0,1 hasta 0,8 y una razón entre la sustitución en  $C_2 : C_6$  en el intervalo de desde 2 hasta 20 con respecto a los grupos hidroxietilo.

35 En lo que se refiere a los residuos  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  según la fórmula (I), no hay limitaciones específicas dado que el compuesto (I) sigue pudiendo hacerse reaccionar con un compuesto según la fórmula (II). 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 tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono. Se prefieren hidrógeno y grupos hidroxialquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono. El grupo alquilo, arilo, aralquilo y/o alcarilo puede ser lineal o ramificado y estar adecuadamente sustituido.

40 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método y 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 1 hasta 6 átomos de carbono.

45 Por tanto,  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  pueden ser hidroxihexilo, hidroxipentilo, hidroxibutilo, hidroxipropilo tal como 1-hidroxipropilo, 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 1-hidroxiiisopropilo, 2-hidroxiiisopropilo, hidroxietilo tal como 1-hidroxietilo, 2-hidroxietilo, o hidroximetilo. Se prefieren hidrógeno y los grupos hidroxietilo, prefiriéndose especialmente hidrógeno y el grupo 2-hidroxietilo.

50 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo.

55 Según la presente invención, se hace reaccionar hidroxialquilalmidón con un compuesto de fórmula (II) en el que el compuesto (II) puede hacerse reaccionar con otro compuesto antes de la reacción con el compuesto (I), para dar un derivado de hidroxialquilalmidón. En cuanto al compuesto (II), no existen limitaciones específicas si el compuesto (II) puede hacerse reaccionar mediante el grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  con el compuesto (I) en su extremo reductor que no se oxida, para dar un derivado de hidroxialquilalmidón.

60 Residuos  $R'$  preferidos del compuesto (II) son hidrógeno y residuos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo pudiendo unirse los residuos cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo directamente al grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  del compuesto (II) o, según otra realización, pudiendo unirse mediante un puente de oxígeno al grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  del compuesto (II). Los residuos alquilo, arilo, aralquilo o alcarilo pueden estar adecuadamente sustituidos. Como sustituyentes preferidos, pueden mencionarse halógenos tales como F, Cl o Br. Residuos  $R'$  especialmente

65

preferidos son hidrógeno, grupos alquilo y alcoxilo, e incluso más preferidos son hidrógeno y grupos alquilo y alcoxilo no sustituidos.

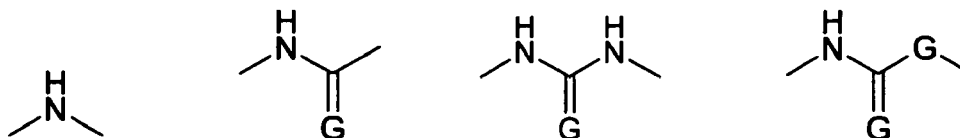
5 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que R' es hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxilo lineal o ramificado.

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

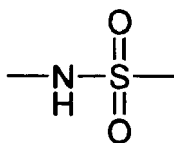
10 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que R' es hidrógeno o un grupo metilo o uno metoxilo.

15 Aparte del grupo funcional X, R" pueden comprender al menos un grupo funcional adicional W. Este al menos un grupo funcional adicional W generalmente puede estar en cualquier sitio en R". Preferiblemente, W se une directamente al grupo NH al que se une R'.

20 En general, no existen limitaciones específicas referentes al grupo funcional W dado que el compuesto (I) puede hacerse reaccionar con el compuesto (II). En realizaciones preferidas, el grupo funcional W 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 -SO<sub>2</sub>-. Según realizaciones más preferidas, el grupo funcional W se selecciona del grupo que consiste en

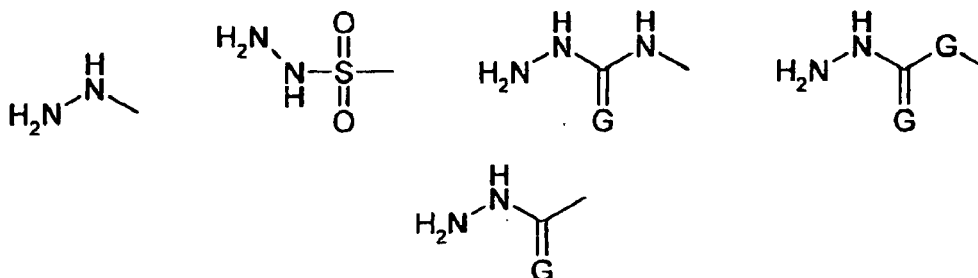


25 y



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

Según las realizaciones preferidas de la presente invención en las que R' es H y W se une directamente al grupo NH que forma un puente entre R' y R", R' y el grupo NH que forma un puente entre R' y R" forman, junto con W, uno de los siguientes grupos:



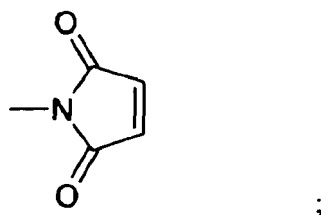
35 En lo que se refiere al al menos un grupo funcional X que está comprendido en R' y/o R", preferiblemente en R", no existen limitaciones específicas. En general, son posibles todos los grupos funcionales que permiten la reacción con al menos un compuesto adicional.

40 En lo que se refiere a esta reacción con un compuesto adicional, son posibles todas las clases de interacciones del al menos un grupo funcional con el al menos un compuesto adicional. Entre otros, son posibles las reacciones del al menos un grupo funcional X con un compuesto adicional que conducen a una unión covalente, una unión iónica y/o una unión de van-der-Waals, prefiriéndose especialmente la unión covalente.

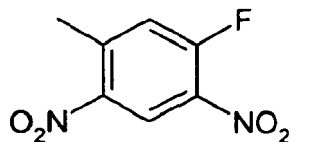
45 Entre otros, van a mencionarse los siguientes grupos funcionales X:

## ES 2 399 006 T3

- dobles enlaces C-C o triples enlaces C-C o enlaces C-C aromáticos;
- el grupo tio o el grupo hidroxilo;
- 5 - hidrazidas de ácido alquilsulfónico, hidrazidas de ácido arilsulfónico;
- 1,2-dioles;
- 1,2-aminoalcoholes;
- 10 - el grupo amino  $\text{-NH}_2$  o derivados de los grupos amino que comprenden la unidad estructural  $\text{-NH-}$  tales como grupos aminoalquilo, grupo aminoarilo, grupos aminoaralquilo o grupos alcarilamino;
- el grupo hidroxilamino  $\text{-O-NH}_2$ , o derivados del grupo hidroxilamino que comprenden la unidad estructural  $\text{-O-NH-}$ , tales como grupos hidroxilalquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino o grupos hidroxilalcarilamino;
- 15 - grupos alcoxi-amino, grupos ariloxi-amino, grupos aralquiloxi-amino o grupos alcariloxi-amino, comprendiendo cada uno la unidad estructural  $\text{-NH-O-}$ ;
- 20 - residuos que tienen un grupo carbonilo,  $\text{-Q-C(=G)-M}$ , en los que G es O o S, y M es, por ejemplo,
  - $\text{-OH}$  o  $\text{-SH}$ ;
- 25 -- un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo aralquiloxilo o un grupo alcariloxilo;
- un grupo alquiltio, un grupo ariltio, un grupo aralquiltio o un grupo alcariltio;
- 30 -- un grupo alquilcarboniloxilo, un grupo arilcarboniloxilo, un grupo aralquilcarboniloxilo, un grupo alcarilcarboniloxilo;
- ésteres activados tales como ésteres de hidroxilaminas que tienen estructura de imida tales como N-hidroxisuccinimida o que tienen una unidad estructural  $\text{O-N}$  en la que N es parte de un compuesto de heteroarilo o, con G = O y Q ausentes, tales como compuestos de ariloxilo con un residuo arilo sustituido tal como pentafluorofenilo, paranitrofenilo o triclorofenilo;
- 35 en los que Q está ausente o es NH o un heteroátomo tal como S u O;
- 40 --  $\text{-NH-NH}_2$  o  $\text{-NH-NH-}$ ;
- $\text{-NO}_2$ ;
- el grupo nitrilo;
- 45 - grupos carbonilo tales como el grupo aldehído o el grupo ceto;
- el grupo carboxilo;
- el grupo  $\text{-N=C=O}$  o el grupo  $\text{-N=C=S}$ ;
- 50 - grupos haluro de vinilo tales como el grupo yoduro de vinilo o el bromuro de vinilo o triflato de vinilo;
- $\text{-C=C-H}$ ;
- 55 --  $\text{-(C=NH}_2\text{Cl)-O-}$ alquilo
- grupos  $\text{-(C=O)-CH}_2\text{-Hal}$  en los que Hal es Cl, Br o I;
- $\text{-CH=CH-SO}_2\text{-}$ ;
- 60 - un grupo disulfuro que comprende la estructura  $\text{-S-S-}$ ;
- el grupo

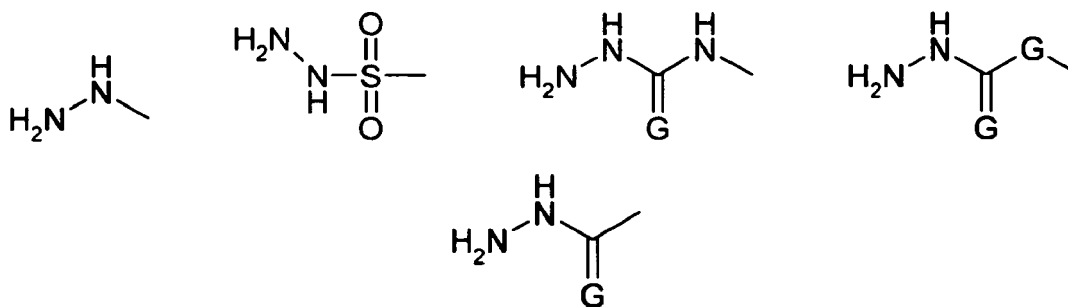


- el grupo



5

Entre estos grupos, se prefieren especialmente el grupo tio, el grupo amino, el grupo hidroxilamino, los grupos alcoxiamino y los siguientes grupos:



10

15

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el al menos un grupo funcional X se selecciona del grupo que consiste en -SH, -NH<sub>2</sub>, -O-NH<sub>2</sub>, -NH-O-alquilo, -(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -G-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -NH-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub> y -SO<sub>2</sub>-NH-NH<sub>2</sub>, en los que G es O o S y, si G está presente dos veces, es independientemente O o S.

20

En lo que se refiere a los grupos alcoxiamino, se da preferencia particular al grupo propoxiamino, el grupo etoxiamino y el grupo metoxiamino, prefiriéndose especialmente el grupo metoxiamino -NH-O-CH<sub>3</sub>.

25

Según aún otro aspecto de la presente invención, el al menos un grupo funcional X puede ser un grupo que no puede hacerse reaccionar directamente con un compuesto adicional dado pero que puede modificarse químicamente para poder hacerse reaccionar de la manera deseada. Esta modificación del grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) puede llevarse a cabo o bien antes de la reacción del compuesto (II) con el compuesto (I) o bien después de la reacción del compuesto (II) con el compuesto (I). Si el compuesto (II) comprende al menos dos grupos funcionales X, opcionalmente diferentes químicamente, es posible modificar al menos un grupo funcional X antes de la reacción del compuesto (II) con el compuesto (I) y al menos un grupo funcional X después de la reacción del compuesto (II) con el compuesto (I).

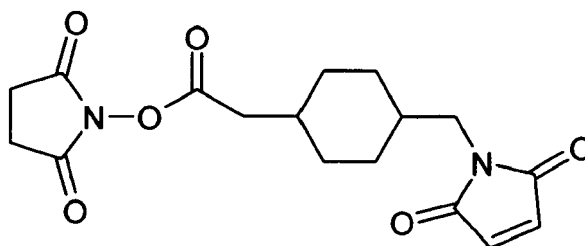
30

Como ejemplo de un grupo funcional X que va a modificarse antes de la reacción con un compuesto adicional, puede mencionarse un 1,2-aminoalcohol o un 1,2-diol que se modifica, por ejemplo, mediante oxidación para formar un grupo aldehído o uno ceto.

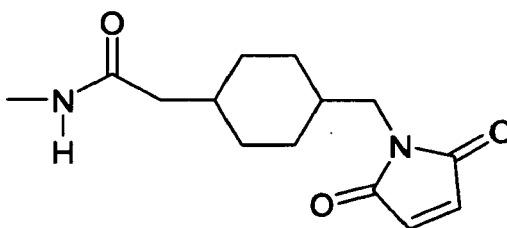
35

Otro ejemplo de un grupo funcional X que va a modificarse antes de la reacción con un compuesto adicional es un grupo -NH<sub>2</sub> que se modifica mediante la reacción con, por ejemplo, un compuesto según la siguiente fórmula





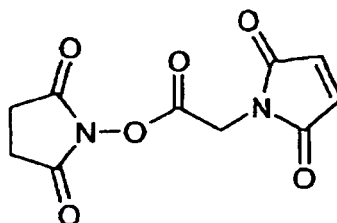
para dar una estructura de la siguiente fórmula



5

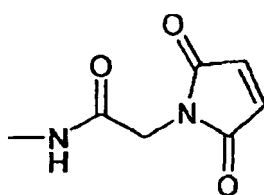
que es, por ejemplo, reactivo frente a un grupo tio.

10 Otro ejemplo de un grupo funcional X que va a modificarse antes de la reacción con un compuesto adicional es un grupo  $-NH_2$  que se modifica mediante la reacción con, por ejemplo, un compuesto según la siguiente fórmula



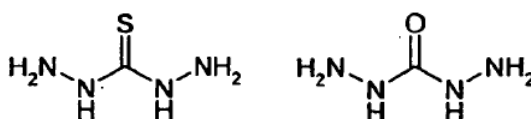
15

para dar una estructura de la siguiente fórmula



que es, por ejemplo, reactivo frente a un grupo tio.

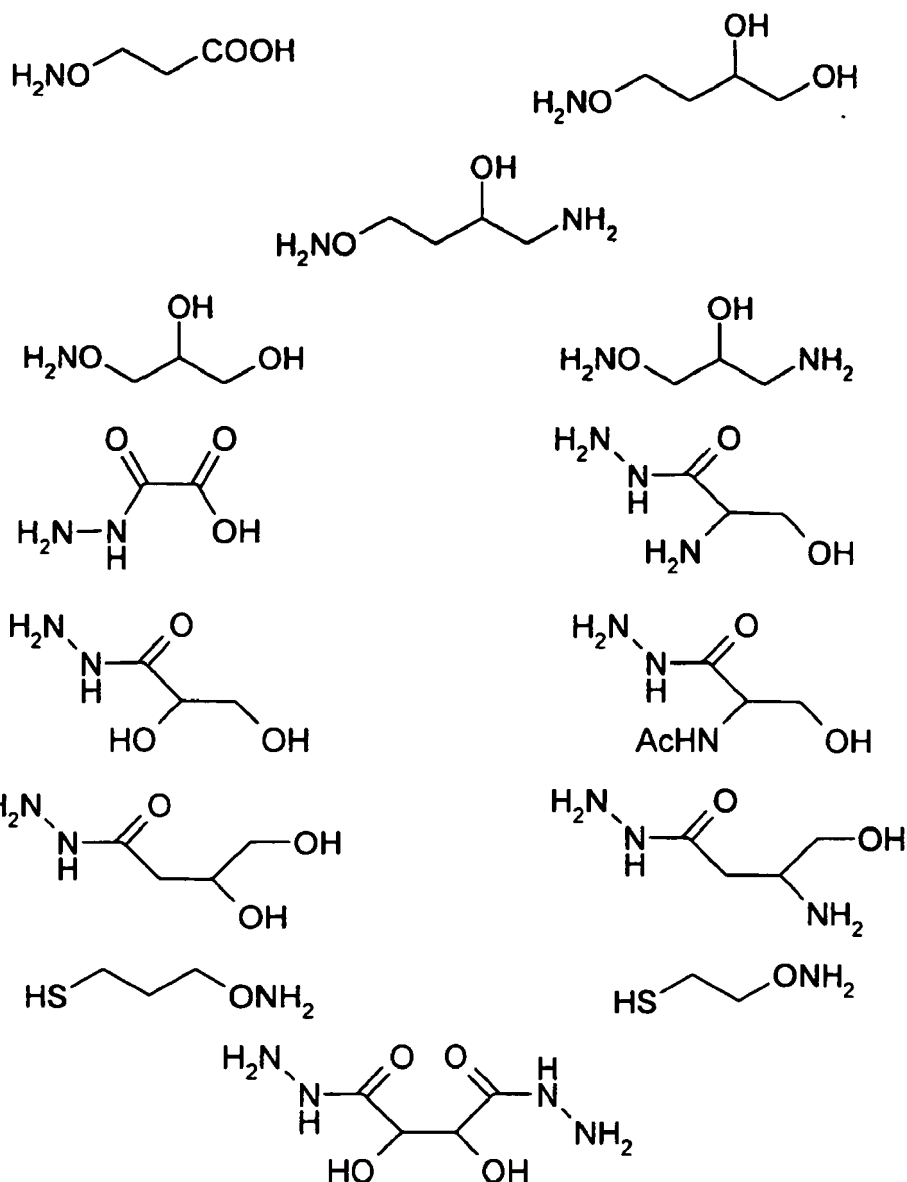
20 El al menos un grupo funcional X puede unirse directamente al grupo NH que forma un puente entre R' y R". Por tanto, según una realización de la presente invención, el grupo funcional X es equivalente a R". Ejemplos específicos de compuestos en los que X se une directamente al grupo NH que forma un puente entre R' y R" son, entre otros,  $H_2N-NH_2$  o



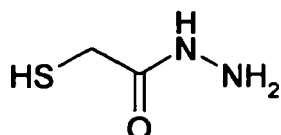
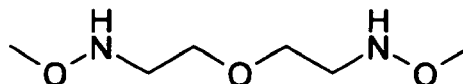
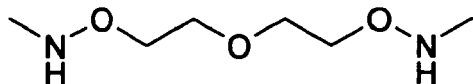
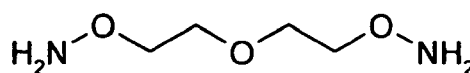
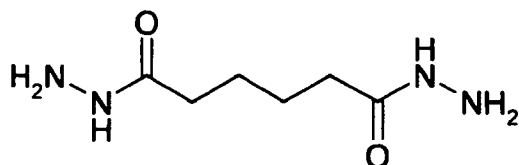
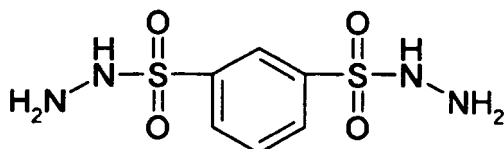
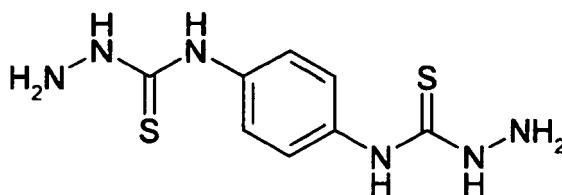
25

Otro ejemplo específico de un compuesto de este tipo que también están comprendido en la presente invención es  $NH_3$ .

- Según otra realización de la presente invención, el grupo NH que forma un puente entre R' y R'' puede estar separado del al menos un grupo funcional X por un grupo alquilo o cicloalquilo o arilo o aralquilo o arilcicloalquilo o alcarilo o cicloalquilarilo lineal o ramificado, en el que estos grupos pueden comprender al menos un heteroátomo tal como N, O, S, y en el que estos grupos pueden estar adecuadamente sustituidos. El tamaño del grupo de separación de NH, que forma un puente entre R' y R'', y el al menos un grupo funcional X puede adaptarse a las necesidades específicas. Generalmente, el grupo de separación tiene generalmente 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 preferible 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 preferible desde 1 hasta 4 heteroátomos. Según realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, el grupo de separación comprende de 1 a 4 átomos de oxígeno. El grupo de separación puede comprender una cadena de alquilo opcionalmente ramificado 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 los que la parte de alquilo puede ser un grupo alquilo lineal y/o cíclico. Según una realización incluso más preferida, el grupo de separación es una cadena de alquilo de desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 8, más preferiblemente desde 1 hasta 6, más preferiblemente desde 1 hasta 4 y de manera especialmente preferible desde 2 hasta 4 átomos de carbono. En el caso en que están presentes heteroátomos, se prefiere particularmente una cadena que comprende de 1 a 4 átomos de oxígeno.
- Ejemplos específicos de compuestos (II) en los que X está separado del grupo NH que forma un puente entre R' y R'' son, entre otros,

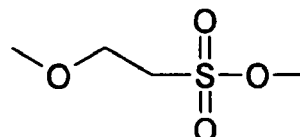
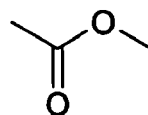
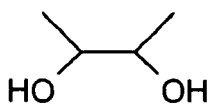
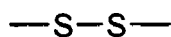


25



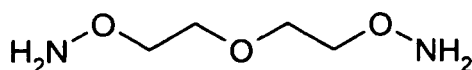
5 El grupo de separación de NH, que forma un puente entre R' y R'', y el al menos un grupo funcional X pueden estar adecuadamente sustituidos. Sustituyentes preferidos son, por ejemplo, haluros tales como F, Cl, Br o I.

10 El grupo de separación de NH, que forma un puente entre R' y R'', y el al menos un grupo funcional X pueden comprender uno o más sitios de escisión tales como

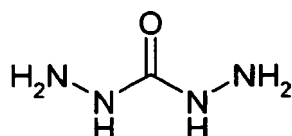


15 que permiten una fácil escisión de un compuesto resultante en un sitio predeterminado.

Según una realización especialmente preferida de la presente invención, el compuesto (II) es O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina



20 o carbohidrazida



25 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el compuesto (II) es O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina o carbohidrazida.

En el caso en que el compuesto (II) comprende uno o más centros quirales, el compuesto (II) puede estar presente en conformación R o en conformación S o como compuesto racémico con respecto a cada centro quiral.

5 Tal como se describió anteriormente, el compuesto (I) puede hacerse reaccionar con el compuesto (II) como tal o con el compuesto (II) que se ha hecho reaccionar con al menos un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I).

10 La reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) como tal puede llevarse a cabo en al menos un disolvente adecuado. El disolvente o la mezcla de dos o más disolventes respectivo puede adaptarse a las necesidades específicas de las condiciones de reacción y la naturaleza química de los compuestos (I) y (II). Según una realización especialmente preferida de la presente invención, se usa agua como disolvente, o bien sola o bien en combinación con al menos otro disolvente. Como al menos otro disolvente, pueden mencionarse DMSO, DMF, metanol y etanol. Disolventes preferidos distintos del agua son DMSO, DMF, metanol y etanol.

15 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) se lleva a cabo en un sistema acuoso.

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

25 En lo que se refiere a las temperaturas que se aplican durante la reacción, no existen limitaciones específicas dado que la reacción da como resultado el derivado de hidroxialquilalmidón deseado.

30 En el caso en que se hace reaccionar el compuesto (I) con el compuesto (II), siendo el compuesto (II) una hidroxilamina o una hidrazida, la temperatura está preferiblemente en el intervalo de desde 5 hasta 45°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 30°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 15 hasta 25°C.

35 En el caso en que se hace reaccionar el compuesto (I) con el compuesto (II), siendo dicha reacción una aminación reductora, la temperatura está preferiblemente en el intervalo de hasta 100°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 20 hasta 95°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 25 hasta 90°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 70 hasta 90°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 75 hasta 85°C.

40 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo el compuesto (II) una hidroxilamina o una hidrazida, se lleva a cabo a una temperatura de desde 5 hasta 45°C.

45 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo dicha reacción una aminación reductora, se lleva a cabo a una temperatura de desde 25 hasta 90°C.

Durante el transcurso de la reacción la temperatura puede variarse, preferiblemente en los intervalos facilitados anteriormente, o mantenerse esencialmente constante.

50 El tiempo de reacción para la reacción del compuesto (I) con (II) puede adaptarse a las necesidades específicas y está generalmente en el intervalo de desde 1 h hasta 7 d.

En el caso en que el compuesto (II) es una hidroxilamina o una hidrazida, el tiempo de reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 1 h hasta 3 d y más preferiblemente de desde 2 h hasta 48 h.

55 En el caso en que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) es una aminación reductora, el tiempo de reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 2 h hasta 7 d.

60 El valor de pH para la reacción del compuesto (I) con (II) puede adaptarse a las necesidades específicas tales como la naturaleza química de los reactantes.

En el caso en que el compuesto (II) es una hidroxilamina o una hidrazida, el valor de pH está preferiblemente en el intervalo de desde 4,5 hasta 6,5.

65 En el caso en que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) es una aminación reductora, el valor de pH está preferiblemente en el intervalo de desde 8 hasta 12.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo el compuesto (II) una hidroxilamina o una hidrazida, se lleva a cabo a un pH de desde 4,5 hasta 6,5.

5 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo dicha reacción una aminación reductora, se lleva a cabo a un pH de desde 8 hasta 12.

10 Ejemplos específicos de las condiciones de reacción mencionadas anteriormente son, por ejemplo, una temperatura de reacción de aproximadamente 25°C y un pH de aproximadamente 5,5 en el caso en que el compuesto es una hidroxilamina, y una temperatura de reacción de aproximadamente 80°C y un pH de aproximadamente 11 en el caso en que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) es una aminación reductora.

15 El valor de pH adecuado de la mezcla de reacción puede ajustarse añadiendo al menos un tampón adecuado. Entre los tampones preferidos, pueden mencionarse el tampón acetato de sodio, tampones fosfato o borato.

20 Según una realización preferida de la presente invención, el producto de reacción que resulta de la reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) se hace reaccionar con al menos un compuesto adicional mediante el al menos un grupo funcional X.

25 Si es necesario, el al menos un grupo funcional X puede protegerse con al menos un grupo protector adecuado antes de la reacción del compuesto (I) con el compuesto (II). A este respecto, son posibles todos los grupos protectores concebibles que impiden que el compuesto (II) protegido reaccione con el compuesto (I) mediante el al menos un grupo funcional X. Por tanto, el grupo protector puede elegirse dependiendo de la naturaleza química del grupo funcional X que va a protegerse, frente a, por ejemplo, el disolvente en que se lleva a cabo la reacción o el pH de la mezcla de reacción. Grupos protectores preferidos son, entre otros, el grupo benciloxicarbonilo, el grupo terc-butoxicarbonilo, el grupo metoxifenilo, el grupo 2,4-dimetoxifenilo, grupos triarilmetilo, tritilo, el grupo monometoxitritilo, el grupo dimetoxitritilo, el grupo monometiltritilo, el grupo dimetiltritilo, el grupo trifluoracetilo, compuestos de ftalimina, compuestos de 2-(trialquilsilil)etoxicarbonilo, Fmoc, el grupo terc-butilo o grupos trialquilsililo.

30 Si están presentes dos o más grupos funcionales X diferentes en el compuesto (II), puede protegerse al menos un grupo mientras que puede dejarse sin proteger al menos otro grupo.

35 Después de la reacción del compuesto (I) con el compuesto (II), el al menos un grupo protector puede dejarse en el producto de reacción o eliminarse mediante métodos adecuados tales como métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Si dos grupos funcionales X diferentes se protegen mediante grupos protectores adecuados, es posible eliminar al menos un grupo protector de modo que se haga que al menos un grupo funcional X esté disponible para la reacción adicional con al menos un compuesto adicional, y dejar al menos otro grupo funcional protegido hasta que el producto de reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) se hace reaccionar con el compuesto adicional. Después de eso, el grupo protector del grupo funcional todavía protegido puede eliminarse para hacer que el grupo funcional X restante esté disponible para la reacción con aún un compuesto adicional.

40 El uso de al menos un grupo protector puede ser importante para impedir que la reacción dé como resultado un derivado de hidroxialquilalmidón que consiste en un compuesto (II) que se ha hecho reaccionar con dos o más compuestos (I), es decir un compuesto (II) sustituido con HAS de forma múltiple. El mismo resultado, sin embargo, puede lograrse haciendo reaccionar el compuesto (I) con un exceso del compuesto (II). Si se usa una cantidad en exceso del compuesto (II) en el procedimiento de la presente invención, la razón molar del compuesto (II) con respecto al compuesto (I) está preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 100.

45 Una vez que se forma el producto de reacción de la reacción del compuesto (I) con el compuesto (II), puede aislarse de la mezcla de reacción mediante al menos un método adecuado. Si es necesario, el producto de reacción puede precipitarse antes del aislamiento mediante al menos un método adecuado.

50 Si el producto de reacción se precipita en primer lugar, es posible, por ejemplo, poner en contacto la mezcla de reacción con al menos un disolvente o mezcla de disolventes distinto del disolvente o la mezcla de disolventes presente en la mezcla de reacción a temperaturas adecuadas. Según una realización particularmente preferida de la presente invención en la que se usa agua como disolvente, la mezcla de reacción se pone en contacto con una mezcla de etanol y acetona, preferiblemente una mezcla 1:1, que indica volúmenes iguales de dichos compuestos, a una temperatura preferiblemente en el intervalo de desde -20 hasta +50°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 0 hasta 25°C.

55 El aislamiento del producto de reacción puede llevarse a cabo mediante un procedimiento adecuado que puede comprender una o más etapas. Según una realización preferida de la presente invención, el producto de reacción se separa en primer lugar de la mezcla de reacción o la mezcla de la mezcla de reacción con, por ejemplo, la mezcla etanol-acetona, mediante un método adecuado tal como centrifugación o filtración. En una segunda etapa, el

producto de reacción separado puede someterse a un tratamiento adicional tal como un tratamiento posterior como diálisis, filtración centrífuga o filtración por presión, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, MPLC, filtración en gel y/o liofilización. Según una realización incluso más preferida, el producto de reacción separado se dializa en primer lugar, preferiblemente frente a agua, y luego se liofiliza hasta que el contenido en disolvente del producto de reacción es suficientemente bajo según las especificaciones deseadas del producto. La liofilización puede llevarse a cabo a temperatura de desde 20 hasta 35°C, preferiblemente de desde 25 hasta 30°C.

El producto de reacción así aislado del compuesto (I) y el compuesto (II) puede hacerse reaccionar adicionalmente con al menos otro compuesto mediante al menos un grupo funcional X comprendido en dicho producto de reacción.

Dependiendo de la naturaleza química del grupo funcional X, puede usarse cualquier compuesto concebible que pueda formar una unión química con este grupo X. Para esta reacción, puede usarse uno o más disolventes adecuados, y todos los parámetros de reacción tales como la temperatura durante la reacción, el tiempo de reacción, las razones de los reactantes o el valor de pH de la mezcla de reacción pueden adaptarse a las necesidades específicas. Según una realización particularmente preferida de la presente invención, el al menos un compuesto que puede formar una unión química con el al menos un grupo funcional X es un polipéptido o una mezcla de al menos dos polipéptidos diferentes.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) se hace reaccionar con un polipéptido mediante el grupo funcional X comprendido en el compuesto (II).

Según otra realización particularmente preferida de la presente invención, el al menos un compuesto adicional que puede formar una unión química con el al menos un grupo funcional X es un compuesto de reticulación que puede formar una primera unión química con el al menos un grupo funcional X del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), y una segunda unión química con el segundo compuesto adicional.

Según una realización incluso más preferida de la presente invención, el segundo compuesto adicional es un polipéptido o una mezcla de al menos dos polipéptidos diferentes.

En el contexto de esta realización de la presente invención, es posible hacer reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), el primer derivado de hidroxialquilalmidón, con el compuesto de reticulación para dar un segundo derivado de hidroxialquilalmidón. Este segundo derivado de hidroxialquilalmidón puede hacerse reaccionar posteriormente con el segundo compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido, para dar un tercer derivado de hidroxialquilalmidón.

Sin embargo, también es posible hacer reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), el primer derivado de hidroxialquilalmidón, con un producto de reacción del compuesto de reticulación con el segundo compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el producto de reacción de los compuestos (I) y (II) se hace reaccionar con un compuesto adicional, siendo dicho compuesto adicional un compuesto de reticulación, mediante reacción de un grupo funcional V comprendido en el compuesto de reticulación y un grupo funcional X comprendido en el producto de reacción de los compuestos (I) y (II).

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el producto de reacción de los compuestos (I) y (II) se hace reaccionar con un compuesto adicional, siendo dicho compuesto adicional un compuesto de reticulación, mediante reacción de un grupo funcional V comprendido en el compuesto de reticulación y un grupo funcional X comprendido en el producto de reacción de los compuestos (I) y (II), habiéndose hecho reaccionar dicho compuesto de reticulación con un segundo compuesto adicional antes de la reacción con el producto de reacción de los compuestos (I) y (II).

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el segundo compuesto adicional es un polipéptido, preferiblemente eritropoyetina, que se hace reaccionar con el compuesto de reticulación mediante reacción de un grupo funcional X, comprendido en el compuesto de reticulación.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que se hace reaccionar el compuesto (II) con un primer compuesto adicional, preferiblemente un compuesto de reticulación, para dar un primer producto de reacción, dicho primer producto de reacción se hace reaccionar con un segundo compuesto adicional para dar un segundo producto de reacción, y dicho segundo producto de reacción se hace reaccionar con el compuesto (I).

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que un primer compuesto adicional, preferiblemente un compuesto de reticulación, se hace reaccionar con un segundo compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido, para dar un primer producto de reacción, dicho primer producto

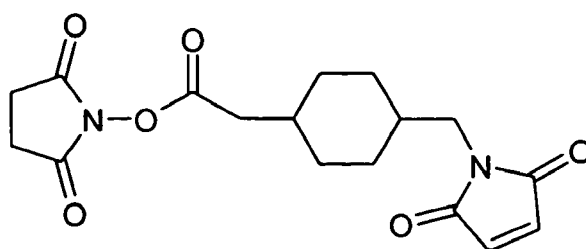
de reacción se hace reaccionar con el compuesto (II) para dar un segundo producto de reacción, y dicho segundo producto de reacción se hace reaccionar con el compuesto (I) para dar el derivado de hidroxialquilalmidón.

Según realizaciones especialmente preferidas de la presente invención, los compuestos de reticulación se usan para formar un puente químico entre el compuesto (II) o el producto de reacción de los compuestos (I) y (II), y un segundo compuesto adicional en el que el grupo funcional del segundo compuesto adicional que reacciona con el compuesto de reticulación es un grupo -SH o un grupo aldehído o un grupo ceto, y el grupo funcional del compuesto (II) o el producto de reacción de los compuestos (I) y (II) que reacciona con el compuesto de reticulación es un grupo que comprende la estructura -NH-, de manera particularmente preferible -NH<sub>2</sub>.

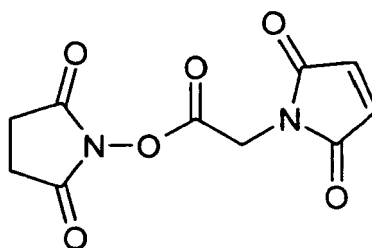
En el contexto de la presente invención, el término "compuesto de reticulación" se refiere a compuestos químicos que pueden formar una unión entre el compuesto (II) o el producto de reacción de los compuestos (I) y (II), y al menos un segundo compuesto adicional dado. Dependiendo de la naturaleza química del segundo compuesto adicional, el compuesto de reticulación comprende al menos un grupo funcional V que puede hacerse reaccionar con el grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) o el producto de reacción de los compuestos (I) y (II), y al menos un grupo funcional adicional que puede formar al menos una unión química con el segundo compuesto adicional. Este al menos un grupo funcional adicional comprendido en el compuesto de reticulación puede ser un grupo funcional del tipo comentado anteriormente con respecto al grupo funcional X.

El compuesto de reticulación puede usarse para ampliar la longitud del puente químico global entre el compuesto (I) y el segundo compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido, y/o para influir en la naturaleza química del producto de reacción resultante, o bien con o bien sin el segundo compuesto adicional, y/o proporcionar la posibilidad de formar una unión entre varios segundos compuestos adicionales y el producto de reacción del compuesto (I), (II) y el compuesto de reticulación, y/o para modificar químicamente el grupo funcional X comprendido en el producto de reacción del compuesto (I) y (II) de modo que se haga que dicho producto de reacción pueda hacerse reaccionar con un compuesto adicional dado.

Por tanto, las realizaciones de la presente invención que se comentaron anteriormente y que se refieren a la modificación química del grupo funcional X que es un grupo -NH<sub>2</sub>, con un compuesto adicional, por ejemplo



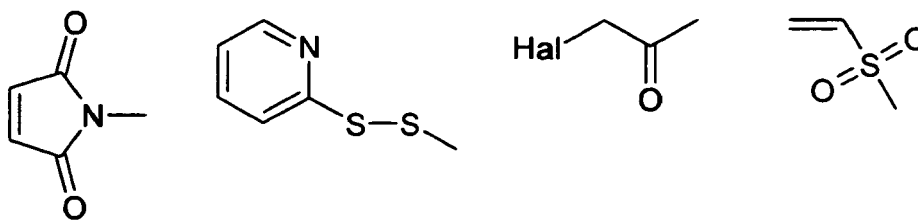
o



para proporcionar la posibilidad de la reacción con un grupo -SH comprendido en un segundo compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido, son ejemplos específicos de hacer reaccionar el producto de reacción de los compuestos (I) y (II) con un compuesto de reticulación.

Según una realización preferida de la presente invención, el grupo funcional V puede ser un grupo funcional del tipo comentado anteriormente como grupo X.

Según otra realización preferida, o bien el grupo funcional X o bien el grupo funcional V es un grupo tio y el grupo funcional V o el grupo funcional X se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en



en los que Hal es Cl, Br o I, preferiblemente Br o I.

- 5 Según aún otra realización preferida, o bien el grupo funcional X o bien el grupo funcional V se selecciona del grupo que consiste en un éster activado tal como se describió anteriormente o un grupo carboxilo que se transforma opcionalmente en un éster activado. En este caso particular, el grupo funcional V o el grupo funcional X, respectivamente, comprende la estructura química -NH-.
- 10 Por tanto, el compuesto de reticulación es un compuesto que tiene al menos dos grupos funcionales que son iguales o diferentes. En el caso de dos grupos funcionales, el compuesto de reticulación puede ser homobifuncional o heterobifuncional. Un compuesto de reticulación homobifuncional, por ejemplo, proporciona la posibilidad de formar un puente entre el producto de reacción de los compuestos (I) con (II) y un segundo compuesto adicional, teniendo el producto de reacción y el compuesto adicional el mismo tipo de grupos funcionales. Un compuesto de reticulación
- 15 heterobifuncional, por ejemplo, proporciona la posibilidad de formar un puente entre el producto de reacción de los compuestos (I) con (II) y un segundo compuesto adicional, teniendo el producto de reacción y el compuesto adicional grupos funcionales que no pueden reaccionar entre sí.

20 Los al menos dos grupos funcionales del compuesto de reticulación pueden unirse directamente entre sí o pueden estar separados por un grupo alquilo o cicloalquilo o arilo o aralquilo o arilcicloalquilo o alcarilo o cicloalquilarilo lineal o ramificado, en los que estos grupos pueden comprender al menos un heteroátomo tal como N, O, S, y en los que estos grupos pueden estar adecuadamente sustituidos. La longitud del grupo de separación de los al menos dos grupos funcionales del compuesto de reticulación puede adaptarse a las necesidades específicas. Generalmente, el grupo de separación tiene desde 1 hasta 60, preferiblemente desde 1 hasta 40, más preferiblemente desde 1 hasta

25 20, más preferiblemente desde 1 hasta 10, más preferiblemente desde 5 hasta 10 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 preferible desde 1 hasta 4 heteroátomos. Según una realización incluso más preferida, el grupo de separación es una cadena de alquilo o aralquilo de desde 1 hasta 20 átomos de carbono. Además, el compuesto de reticulación puede comprender además al menos un sitio de escisión tal como se

30 comentó anteriormente con respecto al compuesto (II).

Otros ejemplos de compuestos de reticulación que van a mencionarse en el contexto de la presente invención pueden clasificarse, por ejemplo, según la siguiente lista:

Tipo de compuesto de reticulación	Grupo funcional, que puede hacerse reaccionar con un segundo compuesto adicional preferiblemente un polipéptido	Grupo funcional V
A	Hidrazida (reactivo con aldehído)	Maleimido (reactivo con SH)
B	Hidrazida (reactivo con aldehído)	Piridiltio (reactivo con SH)
C	Yodoalquilo (reactivo con SH)	Éster de N-succinimida (reactivo con amina)
D	Bromoalquilo (reactivo con SH)	Éster de N-succinimida (reactivo con amina)
E	Maleimido (reactivo con SH)	Éster de N-succinimida (reactivo con amina)
F	Piridiltio (reactivo con SH)	Éster de N-succinimida (reactivo con amina)
G	Vinilsulfona (reactivo con SH)	Éster de N-succinimida (reactivo con amina)

35 En la tabla 1 al final de la presente descripción, se indican algunos ejemplos preferidos de compuestos de reticulación.

40 En el caso en que el al menos un compuesto adicional, por ejemplo el compuesto de reticulación, comprende uno o más centros quirales, el al menos un compuesto adicional puede estar presente en conformación R o en conformación S o como compuesto racémico con respecto a cada centro quiral.

45 El término "polipéptido" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a un compuesto que comprende al menos 2 aminoácidos que se unen mediante un enlace peptídico, es decir un enlace con la estructura -(C=O)-NH-. El polipéptido puede ser un compuesto que se produce de manera natural o un polipéptido que no se



produce de manera natural, comprendiendo este último aminoácidos se producen de manera natural y/o al menos un aminoácido que no se produce de manera natural. La estructura principal del polipéptido, la cadena del polipéptido, puede estar sustituida adicionalmente con al menos un sustituyente adecuado teniendo por tanto al menos una cadena lateral. El al menos un grupo funcional Y puede ser parte de la estructura principal del polipéptido o de al menos un sustituyente de la estructura principal en el que son posibles realizaciones que comprenden al menos un grupo funcional que es parte de la estructura principal del polipéptido y al menos un grupo funcional que es parte de al menos un sustituyente de la estructura principal del polipéptido.

En lo que se refiere al polipéptido, no existen restricciones, dado que el polipéptido comprende al menos un grupo funcional Y. Dicho grupo funcional Y puede unirse directamente a la estructura principal del polipéptido o ser parte de una cadena lateral de la estructura principal. O bien la cadena lateral o bien el grupo funcional Y o bien ambos pueden ser parte de un polipéptido que se produce de manera natural o pueden introducirse en un polipéptido que se produce de manera natural o en un polipéptido que, al menos parcialmente, no se produce de manera natural, antes de la reacción con el grupo funcional X.

Además, el polipéptido puede ser, al menos parcialmente, de cualquier fuente humana o animal. En una realización preferida, el polipéptido es de fuente humana.

El polipéptido puede ser una citocina, especialmente eritropoyetina, una antitrombina (AT) tal como AT III, una interleucina, especialmente interleucina-2, IFN-beta, IFN-alfa, G-CSF, CSF, interleucina-6 y anticuerpos terapéuticos.

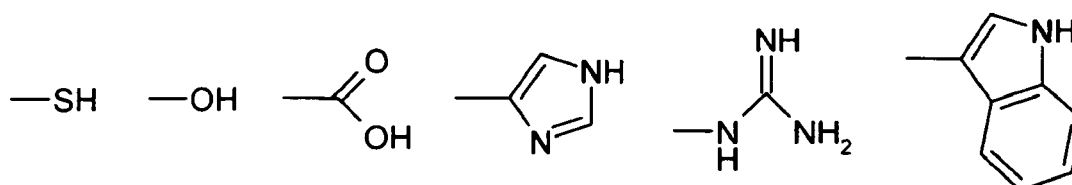
Según una realización preferida, el polipéptido es una antitrombina (AT), preferiblemente AT III (Levy JH, Weisinger A, Ziomek CA, Echelard Y, Recombinant Antithrombin: Production and Role in Cardiovascular Disorder, Seminars in Thrombosis and Hemostasis 27, 4 (2001) 405-416; Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson J, Cole ES, Transgenically Produced human antithrombin: Structural and Functional Comparison to Human Plasma-Derived Antithrombin, Blood 91, 12 (1998) 4661-4671; Minnema MC, Chang ACK, Jansen PM, Lubbers YTP, Pratt BM, Whittaker BG, Taylor FB, Hack CE, Friedman B, Recombinant human antithrombin III improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with *Escherichia coli*, Blood 95, 4 (2000) 1117-1123; Van Patten SM, Hanson EH, Bernasconi R, Zhang K, Manavaln P, Cole ES, McPherson JM, Edmunds T, Oxidation of Methionine Residues in Antithrombin, J. Biol. Chemistry 274, 15 (1999) 10268-10276).

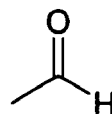
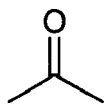
Según otra realización preferida, el polipéptido es IFN-beta humano, en particular IFN-beta 1a (véase Avonex®, REBIF®) e IFN-beta 1b (véase BETASERON®).

Un polipéptido preferido adicional es G-CSF humano (factor estimulante de colonias de granulocitos). Véase, por ejemplo, Nagata *et al.*, The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor, EMBO J. 5: 575-581, 1986; Souza *et al.*, Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells, Science 232 (1986) 61-65; y Herman *et al.*, Characterization, formulation, and stability of Neupogen® (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, en: Formulation, characterization, and stability of protein drugs, Rodney Pearlman and Y. John Wang, eds., Plenum Press, Nueva York, 1996, 303-328.

Si se usa una mezcla de al menos dos polipéptidos diferentes, los al menos dos polipéptidos pueden diferir, por ejemplo, en la masa molecular, el número y/o la secuencia de aminoácidos, diferentes grados de glicosilación, el número y/o la naturaleza química de los sustituyentes o el número de cadenas de polipéptido unidas mediante enlaces químicos adecuados tales como puentes disulfuro.

Según una realización preferida de la presente invención, el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), que opcionalmente se ha hecho reaccionar adicionalmente con un compuesto de reticulación, se aísla, preferiblemente según al menos uno de los procedimientos mencionados anteriormente, y luego se hace reaccionar con un polipéptido que tiene al menos un grupo funcional Y que puede hacerse reaccionar con el al menos un grupo funcional X del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), opcionalmente que se hace adicionalmente con un compuesto de reticulación, para formar al menos una unión química. Grupos funcionales Y de polipéptidos tales como proteínas son, por ejemplo,





o un resto hidrato de carbono que puede unirse al polipéptido mediante N-glicosilación u O-glicosilación.

5 En el contexto de la presente invención, el término “resto hidrato de carbono” se refiere a hidroxialdehídos o hidroxicetonas así como a modificaciones químicas de los mismos (véase Römpp Chemielexikon, Thieme Verlag Stuttgart, Alemania, 9ª edición 1990, Volumen 9, páginas 2281-2285 y la bibliografía citada en ese documento). Además, también se refiere a derivados de restos hidrato de carbono que se producen de manera natural como glucosa, galactosa, manosa, ácido siálico y similares. El término también incluye restos hidrato de carbono que se producen de manera natural oxidados químicamente. La estructura del resto hidrato de carbono oxidado puede ser cíclica o lineal.

15 El resto hidrato de carbono puede unirse directamente a la estructura principal del polipéptido. Preferiblemente, el resto hidrato de carbono es parte de una cadena lateral de hidrato de carbono. Más preferiblemente, el resto hidrato de carbono es el resto terminal de la cadena lateral de hidrato de carbono.

20 En una realización incluso más preferida, el resto hidrato de carbono es un residuo galactosa de la cadena lateral de hidrato de carbono, preferiblemente el residuo galactosa terminal de la cadena lateral de hidrato de carbono. Puede hacerse que este residuo galactosa esté disponible para la reacción con el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) mediante la eliminación de ácidos siálicos terminales, seguido por oxidación, tal como se describe a continuación en el presente documento.

25 Todavía en una realización preferida adicional, el producto de reacción del compuesto (I) y (II) se une a un residuo ácido siálico de las cadenas laterales de hidrato de carbono, preferiblemente el residuo ácido siálico terminal de la cadena lateral de hidrato de carbono.

Puede realizarse la oxidación de restos hidrato de carbono terminales o bien químicamente o bien enzimáticamente.

30 Se conocen en la técnica métodos para la oxidación química de restos hidrato de carbono de polipéptidos e incluyen el tratamiento con peryodato (Chamow *et al.*, 1992, J. Biol. Chem., 267, 15916-15922).

35 Mediante oxidación química, es posible en principio oxidar cualquier resto hidrato de carbono, ya esté situado de manera terminal o no. Sin embargo, eligiendo condiciones leves (periyodato 1 mM, 0°C a diferencia de condiciones agresivas: peryodato 10 mM, 1 h a temperatura ambiente), es posible oxidar preferiblemente el ácido siálico terminal de una cadena lateral de hidrato de carbono.

40 Alternativamente, el resto hidrato de carbono puede oxidarse enzimáticamente. Se conocen en la técnica enzimas para la oxidación de los restos hidrato de carbono individuales, por ejemplo en el caso de galactosa, la enzima es galactosa oxidasa. Si pretenden oxidarse restos galactosa terminales, será necesario eventualmente eliminar ácidos siálicos terminales (parcial o completamente) si el polipéptido se ha producido en células que pueden unir ácidos siálicos a cadenas de hidrato de carbono, por ejemplo en células de mamífero o en células que se han modificado genéticamente para poder unir ácidos siálicos a cadenas de hidrato de carbono. Se conocen en la técnica métodos químicos o enzimáticos para la eliminación de ácidos siálicos (Chaplin and Kennedy (eds.), 1996, Carbohydrate Analysis: a practical approach, especialmente el Capítulo 5 Montreuil, Glycoproteins, páginas 175-177; IRL Press Practical approach series (ISBN 0-947946-44-3)).

50 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) se hace reaccionar con el polipéptido mediante un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el polipéptido.

Según otra realización preferida de la presente invención, el grupo funcional del polipéptido es el grupo tio. Por tanto, el producto de reacción del compuesto (I) y (II) puede unirse al polipéptido mediante un grupo tioéter en el que el átomo de S puede derivarse de cualquier grupo tio comprendido en el polipéptido.

55 El grupo tio puede estar presente en el polipéptido como tal. Además, es posible introducir un grupo tio en el polipéptido según un método adecuado. Entre otros, pueden mencionarse métodos químicos. Si está presente un puente disulfuro en el polipéptido, es posible reducir la estructura -S-S- para obtener un grupo tio. También es posible transformar un grupo amino presente en el polipéptido en un grupo SH mediante reacción del polipéptido mediante el grupo amino con un compuesto que tiene al menos dos grupos funcionales diferentes, uno de los cuales puede hacerse reaccionar con el grupo amino y el otro es un grupo SH o un precursor de un grupo SH. Esta modificación de un grupo amino puede considerarse como un ejemplo en el que la proteína se hace reaccionar en

60

primer lugar con un compuesto (L) que tiene al menos dos grupos funcionales diferentes, uno de los que puede hacerse reaccionar con el grupo amino y el otro es un grupo SH, y luego se hace reaccionar el producto de reacción resultante con, por ejemplo, un derivado de HAS que comprende HAS y un compuesto (D), comprendiendo dicho derivado un grupo funcional que puede hacerse reaccionar con el grupo SH. También es posible introducir un grupo SH mediante mutación del polipéptido tal como introduciendo una cisteína o un aminoácido funcional con SH adecuado en el polipéptido o tal como eliminando una cisteína del polipéptido de modo que se impide que otra cisteína en el polipéptido forme un puente disulfuro.

En el contexto de esta realización, se prefiere particularmente hacer reaccionar el polipéptido con un producto de reacción que resulta de la reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II) con un compuesto de reticulación.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) se hace reaccionar con un compuesto de reticulación y el producto de reacción resultante se hace reaccionar adicionalmente con el polipéptido mediante un resto hidrato de carbono oxidado y/o un grupo tio comprendido en el polipéptido.

Como polipéptido especialmente preferido, se usa eritropoyetina (EPO).

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que el polipéptido es eritropoyetina.

La EPO puede ser de cualquier fuente humana (véase, por ejemplo, Inoue, Wada, Takeuchi, 1994, An improved method for the purification of human erythropoietin with high *in vivo* activity from the urine of anemic patients, Biol. Pharm. Bull. 17(2), 180-4; Miyake, Kung, Gold-wasser, 1977, Purification of human erythropoietin., J. Biol. Chem., 252(15), 5558-64) u otra de mamífero y puede obtenerse mediante purificación a partir de fuentes que se producen de manera natural como riñón humano, hígado humano embrionario o riñón de animal, preferiblemente de mono. Además, la expresión "eritropoyetina" o "EPO" engloba también una variante de EPO en la que uno o más aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 25, preferiblemente de 1 a 10, más preferido de 1 a 5, lo más preferido 1 ó 2) se han intercambiado por otro aminoácido y que muestra actividad eritropoyética (véase, por ejemplo, el documento EP 640 619 B1). La medición de la actividad eritropoyética se describe en la técnica (para la medición de la actividad *in vitro* véase, por ejemplo, Fibi *et al.*, 1991, Blood, 77, 1203 y sig.; Kitamura *et al.*, 1989, J. Cell Phys., 140, 323-334; para la medición de la actividad de EPO *in vivo* véase Ph. Eur. 2001, 911-917; Ph. Eur. 2000, 1316 Erythropoietini solutio concentrata, 780-785; European Pharmacopoeia (1996/2000); European Pharmacopoeia, 1996, Erythropoietin concentrated solution, Pharmaeuropa., 8, 371-377; Fibi, Hermentin, Pauly, Lauffer, Zettlmeissl., 1995, N- and O-glycosylation mutants of recombinant human erythropoietin secreted from BHK-21 cells, Blood, 85(5), 1229-36; (se inyectaron EPO y formas de EPO modificadas en ratones NMRI hembra (cantidades iguales de proteína de 50 ng/ratón) en el día 1, 2 y 3 se extrajeron muestras de sangre en el día 4 y se determinaron los reticulocitos)). Publicaciones adicionales en las que se describen pruebas para la medición de la actividad de EPO: Barbone, Aparicio, Anderson, Natarajan, Ritchie, 1994, Reticulocytes measurements as a bioassay for erythropoietin, J. Pharm. Biomed. Anal., 12(4), 515-22; Bowen, Culligan, Beguin, Kendall, Willis, 1994, Estimation of effective and total erythropoiesis in myelodysplasia using serum transferrin receptor and erythropoietin concentrations, with automated reticulocyte parameters, Leukemi, 8(1), 151-5; Delorme, Lorenzini, Giffin, Martin, Jacobsen, Boone, Elliott, 1992, Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin, Biochemistry, 31(41), 9871-6; Higuchi, Oheda, Kuboniwa, Tomonoh, Shimonaka, Ochi, 1992; Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin, J. Biol. Chem., 267(11), 7703-9; Yamaguchi, Akai, Kawanishi, Ueda, Masuda, Sasaki, 1991, effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties, J. Biol. Chem., 266(30), 20434-9; Takeuchi, Inoue, Strickland, Kubota, Wada, Shimizu, Hoshi, Kozutsumi, Takasaki, Kobata, 1989, Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(20), 7819-22; Kurtz, Eckardt, 1989, Assay methods for erythropoietin, Nephron., 51(1), 11-4 (en alemán); Zucali, Sulkowski, 1985, Purification of human urinary erythropoietin on controlled-pore glass and silicic acid, Exp. Hematol., 13(3), 833-7; Krystal, 1983, Physical and biological characterization of erythroblast enhancing factor (EEF), a late acting erythropoietic stimulator in serum distinct from erythropoietin, Exp. Hematol., 11(1), 18-31.

Preferiblemente, la EPO se produce de manera recombinante. Esto incluye la producción en células eucariotas o procariontas, preferiblemente células de mamífero, insecto, levadura, bacterianas o en cualquier otro tipo celular que sea conveniente para la producción recombinante de EPO. Además, la EPO puede expresarse en animales transgénicos (por ejemplo en líquidos corporales como leche, sangre, etc.), en huevos de aves transgénicas, especialmente aves de corral, preferidas las gallinas, o en plantas transgénicas.

Se conoce en la técnica la producción recombinante de un polipéptido. 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 del polipéptido y la purificación del polipéptido de las células huésped. Para información detallada véase, por ejemplo, Krystal, Pankratz, Farber, Smart, 1986, Purification of human erythropoietin to homogeneity by a rapid five-step procedure, Blood, 67(1), 71-9; Quelle, Caslake, Burkert, Wojchowski, 1989, High-

level expression and purification of a recombinant human erythropoietin produced using a baculovirus vector, Blood, 74(2), 652-7; documentos EP 640 619 B1 y EP 668 351 B1.

5 En una realización preferida, la EPO tiene la secuencia de aminoácidos de EPO humana (véase el documento EP 148 605 B2).

10 La EPO puede comprender una o más cadenas laterales de hidrato de carbono, preferiblemente de 1 a 12, más preferiblemente de 1 a 9, incluso más preferiblemente de 1 a 6 y particularmente de 1 a 4, de manera especialmente preferible 4 cadenas laterales de hidrato de carbono, unidas a la EPO mediante glicosilación con unión a N y/u O, es decir la EPO se glicosila. Habitualmente, cuando se produce EPO en células eucariotas, el polipéptido se glicosila de manera postraduccional. Por consiguiente, las cadenas laterales de hidrato de carbono pueden haberse unido a la EPO durante la biosíntesis en células de mamífero, especialmente de ser humano, de insecto o levadura. La estructura y las propiedades de la EPO glicosilada se han estudiado extensamente en la técnica (véanse los documentos EP 428 267 B1; EP 640 619 B1; Rush, Derby, Smith, Merry, Rogers, Rohde, Katta, 1995, Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure, Anal Chem., 67(8), 1442-52; Takeuchi, Kobata, 1991, Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins, Glycobiology, 1(4), 337-46 (revisión).

20 Por tanto, el derivado de hidroxialquilalmidón según la presente invención puede comprender al menos una, preferiblemente de 1 a 12, más preferiblemente de 1 a 9, incluso más preferiblemente de 1 a 6 y de manera particularmente preferible de 1 a 4 molécula de HAS por molécula de EPO. El número de moléculas de HAS por molécula de EPO puede determinarse mediante análisis composicional cuantitativo de hidratos de carbono usando CG-EM después de hidrólisis del producto y derivatización de los monosacáridos resultantes (véase Chaplin and Kennedy (eds.), 1986, Carbohydrate Analysis: a practical approach, IRL Press Practical approach series (ISBN 0-947946-44-3), especialmente Capítulo 1, Monosaccharides, páginas 1-36; Capítulo 2, Oligosaccharides, páginas 37-53, Capítulo 3, Neutral Polysaccharides, páginas 55-96).

30 Según una realización especialmente preferida de la presente invención, el resto hidrato de carbono unido a EPO es parte de una cadena lateral de hidrato de carbono. Más preferiblemente, el resto hidrato de carbono es el resto terminal de la cadena lateral de hidrato de carbono. En una realización incluso más preferida, el resto hidrato de carbono es un residuo galactosa de la cadena lateral de hidrato de carbono, preferiblemente el residuo galactosa terminal de la cadena lateral de hidrato de carbono. Puede hacerse que este residuo galactosa esté disponible para la reacción con el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) mediante la eliminación de ácidos siálicos terminales, seguido por oxidación, tal como se describe a continuación en el presente documento. En una realización preferida adicional, el producto de reacción del compuesto (I) y (II) se une a un residuo ácido siálico de las cadenas laterales de hidrato de carbono, preferiblemente el residuo ácido siálico terminal de la cadena lateral de hidrato de carbono. Se oxida el ácido siálico tal como se describe en el presente documento.

40 De manera particularmente preferible, se hace que este residuo galactosa esté disponible para reacción con el producto de reacción de los compuestos (I) y (II) o con el producto de reacción de la reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II) y un compuesto de reticulación mediante el grupo funcional X mediante la eliminación de ácido siálico terminal seguido por oxidación.

45 Tal como se mencionó anteriormente, el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), que se hace reaccionar opcionalmente con un compuesto de reticulación, puede hacerse reaccionar con un grupo tio comprendido en EPO.

50 También es posible hacer reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), que se hace reaccionar opcionalmente con un compuesto de reticulación, con un grupo tio así como con un resto hidrato de carbono, cada uno de ellos comprendido en el al menos un compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido, más preferiblemente eritropoyetina.

55 Según una realización preferida, este grupo SH puede unirse a un resto hidrato de carbono preferiblemente oxidado, por ejemplo usando un derivado de hidroxilamina, por ejemplo clorhidrato de 2-(aminooxi)etilmercaptano (Bauer L. *et al.*, 1965, J. Org. Chem., 30, 949) o usando un derivado de hidrazida, por ejemplo hidrazida de ácido tioglicólico (Whitesides *et al.*, 1977, J. Org. Chem., 42, 332.)

60 Según una realización preferida adicional, el grupo tio se introduce preferiblemente en un resto hidrato de carbono oxidado de EPO, más preferiblemente un resto hidrato de carbono oxidado que es parte de una cadena lateral de hidrato de carbono de EPO.

65 Preferiblemente, el grupo tio se deriva de una cisteína que se produce de manera natural o de una cisteína añadida. Más preferiblemente, la EPO tiene la secuencia de aminoácidos de EPO humana y las cisteínas que se producen de manera natural son la cisteína 29 y/o 33. En una realización más preferida, el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), que se hace reaccionar opcionalmente con un compuesto de reticulación, se hace reaccionar con la cisteína 29 mientras que la cisteína 33 se sustituye por otro aminoácido. Alternativamente, el producto de

reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), que se hace reaccionar opcionalmente con un compuesto de reticulación, se hace reaccionar con la cisteína 33 mientras que la cisteína 29 se sustituye por otro aminoácido.

5 En el contexto de la presente invención, el término "cisteínas añadidas" indica que los polipéptidos, preferiblemente EPO, comprenden un residuo de cisteína que no está presente en el polipéptido de tipo natural.

En el contexto de este aspecto de la invención, la cisteína puede ser un aminoácido adicional añadido en el extremo N- o C-terminal de EPO.

10 Además, la cisteína añadida puede haberse añadido sustituyendo un aminoácido que se produce de manera natural por cisteína o una cisteína adecuadamente sustituida. Preferiblemente, en el contexto de este aspecto de la invención, la EPO es EPO humana y el residuo de aminoácido sustituido es serina 126.

15 Las condiciones de reacción de la reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II), que se hace reaccionar opcionalmente con un compuesto de reticulación, con el al menos un compuesto adicional pueden adaptarse a las necesidades específicas de la reacción respectiva, tal como en el caso en que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido o en el caso en que el al menos un compuesto adicional es un compuesto de reticulación o en el caso en que el al menos un compuesto adicional es un producto de reacción de un compuesto de reticulación y un polipéptido. Como compuestos tampón, puede usarse preferiblemente al menos uno de los compuestos mencionados anteriormente. Como disolvente o mezcla de disolventes, puede usarse preferiblemente al menos uno de los disolventes mencionados anteriormente. Puede llevarse a cabo aislamiento y/o tratamiento posterior, en los que se seleccionan métodos preferidos de los métodos comentados anteriormente.

20 Si el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) se hace reaccionar adicionalmente, por ejemplo, con un polipéptido como compuesto adicional, preferiblemente EPO, se usa preferiblemente agua como disolvente para la reacción. Además de agua, puede estar presente al menos un disolvente adicional. Como posible disolvente adicional preferido, pueden mencionarse DMSO, DMF, metanol o etanol.

25 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con un polipéptido, preferiblemente EPO, se lleva a cabo en un sistema acuoso.

30 En lo que se refiere a las temperaturas que se aplican durante esta reacción, no existen limitaciones específicas dado que la reacción da como resultado el derivado de hidroxialquilalmidón deseado que comprende el producto de reacción de los compuestos (I) y (II) que se hace reaccionar con el polipéptido mediante el al menos un grupo funcional X. La temperatura de la reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 4 hasta 37°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 30°C de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 15 hasta 25°C.

35 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con el polipéptido se lleva a cabo a una temperatura de desde 4 hasta 37°C.

40 Durante el transcurso de la reacción la temperatura puede variarse, preferiblemente en los intervalos facilitados anteriormente, o mantenerse esencialmente constante.

45 El tiempo de reacción para reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con el polipéptido puede adaptarse a las necesidades específicas y está generalmente en el intervalo de desde 0,5 hasta 48 h, preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 24 h y de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 10 hasta 20 h.

El valor de pH para la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con el polipéptido puede adaptarse a las necesidades específicas tales como la naturaleza química de los reactantes.

50 Si, por ejemplo, el producto de reacción del compuesto (I) y (II) se hace reaccionar con un compuesto adicional mediante la reacción de un grupo funcional X que es un grupo hidroxilamino -O-NH<sub>2</sub> con al menos un grupo aldehído que está comprendido en el polipéptido, el pH está preferiblemente en el intervalo de desde 4,5 hasta 6, más preferiblemente a aproximadamente 5,5.

55 Si el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) se hace reaccionar, por ejemplo, adicionalmente con un compuesto de reticulación como compuesto adicional, preferiblemente EPO, se usa preferiblemente agua como disolvente para la reacción. Además de agua, puede estar presente al menos un disolvente adicional. Como posible disolvente adicional preferido, pueden mencionarse DMSO, DMF, metanol o etanol. Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con un compuesto de reticulación se lleva a cabo en un sistema acuoso.

60 Si el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) se hace reaccionar, por ejemplo, adicionalmente con un compuesto de reticulación como compuesto adicional, preferiblemente EPO, se usa preferiblemente agua como disolvente para la reacción. Además de agua, puede estar presente al menos un disolvente adicional. Como posible disolvente adicional preferido, pueden mencionarse DMSO, DMF, metanol o etanol. Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con un compuesto de reticulación se lleva a cabo en un sistema acuoso.

65 Si el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) se hace reaccionar, por ejemplo, adicionalmente con un compuesto de reticulación como compuesto adicional, preferiblemente EPO, se usa preferiblemente agua como disolvente para la reacción. Además de agua, puede estar presente al menos un disolvente adicional. Como posible disolvente adicional preferido, pueden mencionarse DMSO, DMF, metanol o etanol. Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con un compuesto de reticulación se lleva a cabo en un sistema acuoso.

En lo que se refiere a las temperaturas que se aplican durante esta reacción, no existen limitaciones específicas dado que la reacción da como resultado el derivado de hidroxialquilalmidón deseado que comprende el producto de reacción de los compuestos (I) y (II) que se hace reaccionar con el compuesto de reticulación mediante el al menos un grupo funcional X. La temperatura de la reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 4 hasta 37°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 30°C de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 15 hasta 25°C.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con el compuesto de reticulación se lleva a cabo a una temperatura de desde 4 hasta 37°C.

Durante el transcurso de la reacción la temperatura puede variarse, preferiblemente en los intervalos facilitados anteriormente, o mantenerse esencialmente constante.

El tiempo de reacción para reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con el compuesto de reticulación puede adaptarse a las necesidades específicas y está generalmente en el intervalo de desde 10 min. hasta 10 h, preferiblemente de desde 20 min. hasta 5 h y más preferiblemente de desde 30 min. hasta 2 h.

El valor de pH para la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con el compuesto de reticulación puede adaptarse a las necesidades específicas tales como la naturaleza química de los reactantes.

Si, por ejemplo, el producto de reacción del compuesto (I) y (II) se hace reaccionar con un compuesto de reticulación que es un compuesto de reticulación mediante el grupo funcional X que está comprendido en el producto de reacción del compuesto (I) y (II) y es un grupo amino -NH<sub>2</sub>, el pH está preferiblemente en el intervalo de desde 7 hasta 8,5, más preferiblemente a aproximadamente 7,2.

Si el producto de reacción de la reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II), y un compuesto de reticulación se hace reaccionar, por ejemplo, adicionalmente con un polipéptido, preferiblemente EPO, se usa preferiblemente agua como disolvente para la reacción. Además de agua, puede estar presente al menos un disolvente adicional. Como posible disolvente adicional preferido, pueden mencionarse DMSO, DMF, metanol o etanol.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) que se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto de reticulación, con un polipéptido se lleva a cabo en un sistema acuoso.

En lo que se refiere a las temperaturas que se aplican durante esta reacción, no existen limitaciones específicas dado que la reacción da como resultado el derivado de hidroxialquilalmidón deseado que comprende el producto de reacción de los compuestos (I) y (II), que se hace reaccionar con un compuesto de reticulación y que se hace reaccionar adicionalmente con un polipéptido mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto de reticulación. La temperatura de la reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 4 hasta 37°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 30°C de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 15 hasta 25°C.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) que se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto de reticulación, con el polipéptido se lleva a cabo a una temperatura de desde 4 hasta 37°C.

Durante el transcurso de la reacción la temperatura puede variarse, preferiblemente en los intervalos facilitados anteriormente, o mantenerse esencialmente constante.

El tiempo de reacción para la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) que se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto de reticulación, con el polipéptido puede adaptarse a las necesidades específicas y está generalmente en el intervalo de desde 0,5 hasta 48 h, preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 24 h y de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 10 hasta 20 h.

El valor de pH para la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) que se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto de reticulación, con el polipéptido puede adaptarse a las necesidades específicas tales como la naturaleza química de los reactantes.

Si, por ejemplo, el producto de reacción del compuesto (I) y (II) es el que se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto de reticulación, se hace reaccionar con un polipéptido mediante el grupo funcional X que está comprendido en el compuesto de reticulación y es un grupo amino -NH<sub>2</sub>, el pH está preferiblemente en el intervalo de desde 7 hasta 8,5, más preferiblemente a aproximadamente 7,2.

El valor de pH adecuado de la mezcla de reacción puede ajustarse en cada caso añadiendo al menos un tampón adecuado. Entre los tampones preferidos, pueden mencionarse el tampón acetato de sodio, tampón fosfato de sodio o tampones borato.

5 El producto de reacción que resulta de la reacción del producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con el al menos un compuesto adicional, siendo el al menos un compuesto adicional o bien un polipéptido o bien un compuesto de reticulación, y comprendiendo además el producto de reacción los compuestos que resultan de las reacciones del compuesto (I), el compuesto (II), un compuesto de reticulación y un polipéptido, puede aislarse de la mezcla de reacción mediante al menos un método adecuado y someterse a al menos un tratamiento adicional tal como al menos un tratamiento posterior tal como diálisis y/o liofilización.

Una vez que se forma el producto de reacción mencionado anteriormente, puede aislarse de la mezcla de reacción mediante al menos un método adecuado.

15 El aislamiento del producto de reacción puede llevarse a cabo mediante un procedimiento adecuado que puede comprender una o más etapas.

Según una realización preferida de la presente invención, en la que el producto de reacción no comprende un polipéptido, el producto de reacción se separa en primer lugar de la mezcla de reacción o la mezcla de la mezcla de reacción preferiblemente mediante filtración centrífuga. En una segunda etapa, el producto de reacción separado puede someterse a un tratamiento adicional tal como un tratamiento posterior como diálisis y/o liofilización. Según una realización incluso más preferida, el producto de reacción separado se dializa en primer lugar, preferiblemente frente a agua, y luego se liofiliza hasta que el contenido en disolvente del producto de reacción es suficientemente bajo según las especificaciones deseadas del producto.

25 Según otra realización de la presente invención en la que el producto de reacción comprende el polipéptido, el producto de reacción se aísla preferiblemente tal como se describe en el ejemplo 7.8.

Según una realización adicional de la presente invención, se hace reaccionar el compuesto (II) con un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I), es decir se produce un derivado del compuesto (II) mediante la reacción del compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X con al menos un compuesto adicional que comprende al menos un grupo funcional Y, tal como se describió anteriormente, antes de la reacción con el compuesto (I).

35 Si se hace reaccionar el compuesto (II) en primer lugar con un compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido, más preferiblemente EPO, se usa preferiblemente agua como disolvente para la reacción. Además de agua, puede estar presente al menos un disolvente adicional. Como posible disolvente adicional preferido, pueden mencionarse DMSO, DMF, metanol y etanol.

40 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del compuesto (II), antes de la reacción con el compuesto (I), con un compuesto adicional, preferiblemente un polipéptido, incluso más preferiblemente EPO, se lleva a cabo en un sistema acuoso.

45 En lo que se refiere a las temperaturas que se aplican durante la reacción, no existen limitaciones específicas dado que la reacción da como resultado el derivado deseado del compuesto (II) que comprende el producto de reacción del compuesto (II) que se hace reaccionar con al menos un compuesto adicional mediante el al menos un grupo funcional X, preferiblemente un polipéptido, más preferiblemente EPO. La temperatura de la reacción está preferiblemente en el intervalo de desde 4 hasta 37°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 30°C de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 15 hasta 25°C.

50 Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que la reacción del compuesto (II) con el al menos un compuesto adicional se lleva a cabo a una temperatura de desde 4 hasta 37°C.

55 Durante el transcurso de la reacción la temperatura puede variarse, preferiblemente en los intervalos facilitados anteriormente, o mantenerse esencialmente constante.

El tiempo de reacción, el valor de pH para la reacción del compuesto (II) con el al menos un compuesto adicional pueden adaptarse a las necesidades específicas tales como la naturaleza química de los reactantes. El valor de pH adecuado de la mezcla de reacción puede ajustarse añadiendo al menos un tampón adecuado. Entre los tampones preferidos, pueden mencionarse tampones acetato, fosfato o borato tales como tampones acetato de sodio, fosfato de sodio o borato de sodio.

65 El producto de reacción que resulta de la reacción del compuesto (II) con el al menos un compuesto adicional puede aislarse de la mezcla de reacción mediante al menos un método adecuado y someterse a al menos un tratamiento adicional tal como al menos un tratamiento posterior tal como diálisis y/o liofilización.

Una vez que se forma el producto de reacción de la reacción del compuesto (II) con el al menos un compuesto adicional, puede aislarse de la mezcla de reacción mediante al menos un método adecuado.

5 El aislamiento del producto de reacción puede llevarse a cabo mediante un procedimiento adecuado que puede comprender una o más etapas tal como se ha descrito ya anteriormente.

Si se desea y/o es necesario, el grupo NH que forma un puente entre R' y R'' del compuesto (II) puede protegerse con un grupo protector adecuado antes de la reacción del compuesto (II) con el al menos un compuesto adicional. Como grupo protector, puede usarse uno de los grupos protectores mencionados anteriormente. Antes de la reacción del producto de reacción del compuesto (II) y el al menos un compuesto adicional tal como un polipéptido, preferiblemente EPO, con el compuesto (I), el grupo protector se elimina mediante al menos un método adecuado.

15 Si se hace reaccionar el compuesto (II) en primer lugar con un compuesto de reticulación o un producto de reacción de un compuesto de reticulación y un polipéptido, pueden ajustarse todas las condiciones de reacción a las necesidades específicas de estas reacciones. Entre otros, pueden usarse los sistemas de tampón y/o disolventes mencionados anteriormente.

20 En una segunda etapa, el producto de reacción de la reacción del compuesto (II) con el al menos un compuesto adicional se hace reaccionar con el compuesto (I).

Para esta reacción, pueden ajustarse todas las condiciones de reacción a las necesidades específicas de estas reacciones. Entre otros, pueden usarse los sistemas de tampón y/o disolventes mencionados anteriormente.

25 El producto de reacción que resulta de la reacción del producto de reacción del compuesto (II) y el al menos un compuesto adicional con el compuesto (I) puede aislarse de la mezcla de reacción respectiva mediante al menos un método adecuado y someterse a al menos un tratamiento adicional tal como al menos un tratamiento posterior tal como diálisis y/o liofilización. En este contexto, puede usarse cualquier método adecuado descrito anteriormente.

30 Generalmente, el aislamiento del conjugado de HAS-polipéptido, o bien con o bien sin compuesto de reticulación, puede realizarse usando procedimientos conocidos para la purificación de polipéptidos naturales y recombinantes tales como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, RP-HPLC, cromatografía con hidroxipatita, cromatografía de interacción hidrófoba o combinaciones de al menos dos métodos de los mismos.

35 La unión covalente de HAS al polipéptido puede verificarse mediante análisis composicional de hidratos de carbono después de hidrólisis de la proteína modificada.

40 La demostración de la modificación de HAS en oligosacáridos unidos a N del polipéptido puede lograrse mediante la eliminación de los N-glicanos modificados con HAS y la observación del desplazamiento predicho a mayor movilidad en análisis mediante SDS-PAGE +/- inmunotransferencia de tipo Western.

45 La modificación con HAS del polipéptido en residuos cisteína puede demostrarse por la incapacidad para detectar el Cys-péptido proteolítico correspondiente en RP-HPLC y MALDI/TOF-EM en los fragmentos proteolíticos del producto modificado con HAS (Zhou *et al.*, 1998, Application of capillary electrophoresis, liquid chromatography, electrospray-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectrometry to the characterization of recombinant human erythropoietin, Electrophoresis, 19(13), 2348-55). El aislamiento de la fracción que contiene HAS después de digestión proteolítica del polipéptido modificado con Cys permite la verificación en esta fracción del péptido correspondiente mediante análisis composicional de aminoácidos convencional.

50 Todas las realizaciones dadas a conocer anteriormente con respecto al HAS-polipéptido de la invención referentes a las propiedades del polipéptido o HAS se aplican también al método de la invención para la producción de un conjugado de HAS-polipéptido. Además, todas las realizaciones dadas a conocer anteriormente con respecto a HAS-EPO o la preparación del mismo que se refieren a péptidos en general o a HAS se aplican también al método de la invención para la producción de un conjugado de HAS-polipéptido.

55 Según una realización especialmente preferida de la presente invención se hace reaccionar hidroxietilalmidón con un compuesto (II), seleccionado preferiblemente de los compuestos homo y heterobifuncionales descritos anteriormente, y se hace reaccionar el producto de reacción resultante con una glicoproteína, preferiblemente eritropoyetina, preferiblemente con el resto hidrato de carbono terminal oxidado de una cadena lateral de hidrato de carbono de EPO.

60 Según otra realización especialmente preferida de la presente invención, se hace reaccionar hidroxietilalmidón con un compuesto (II), seleccionado preferiblemente de los compuestos homo y heterobifuncionales descritos anteriormente, para dar un primer derivado de hidroxietilalmidón. Este primer derivado de hidroxietilalmidón se hace reaccionar posteriormente con un compuesto de reticulación para dar un segundo derivado de hidroxietilalmidón.



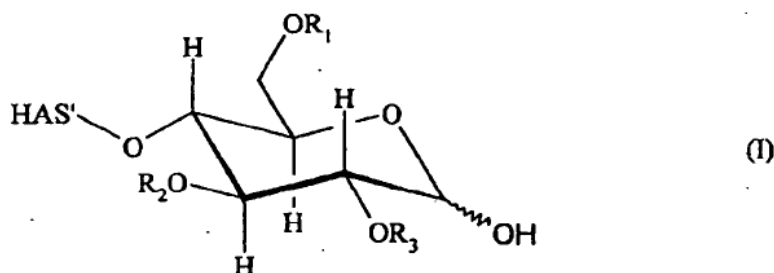
Este segundo derivado de hidroxietilalmidón se hace reaccionar posteriormente con una glicoproteína, preferiblemente eritropoyetina, preferiblemente con un grupo -SH comprendido en la glicoproteína, para dar un tercer derivado de hidroxietilalmidón. Preferiblemente, el compuesto de reticulación es un compuesto heterobifuncional. Más preferiblemente, el compuesto de reticulación se hace reaccionar con un grupo funcional que comprende la estructura -NH- que está comprendida en el primer derivado de hidroxietilalmidón. Más preferiblemente, este grupo funcional es -NH<sub>2</sub>.

Una ventaja de la presente invención es que no es necesario usar disolventes toxicológicamente críticos en al menos una etapa de reacción, preferiblemente todas las etapas de reacción, la etapa de reacción implicada y por tanto, no es necesario eliminar estos disolventes después del procedimiento de producción para evitar la contaminación de los productos con el disolvente. Además, no es necesario realizar controles de calidad adicionales con respecto a disolventes residuales toxicológicamente críticos. Si se usan disolventes orgánicos, preferiblemente además de agua, se prefiere usar disolventes toxicológicamente no críticos tales como etanol y/o propilenglicol.

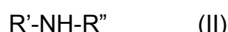
Otra ventaja de la presente invención es que se evitan cambios estructurales irreversibles o reversibles en las etapas en las que se usa un sistema acuoso como disolvente que de lo contrario se inducen por los disolventes orgánicos. Por consiguiente, los derivados de polipéptido obtenidos según el método de la invención son diferentes de los preparados en disolventes orgánicos tales como DMSO.

Además, se ha observado sorprendentemente que la conjugación de HAS a polipéptidos tales como EPO en una disolución acuosa minimiza o evita las reacciones secundarias. Por consiguiente, esta realización del método de la invención conduce a productos de hidroxialquilalmidón mejorados con gran pureza.

Según otro aspecto, la presente invención también se refiere al derivado de hidroxialquilalmidón, que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende hacer reaccionar hidroxialquilalmidón (HAS) de fórmula (I)



en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción, con un compuesto de fórmula (II)



en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado,

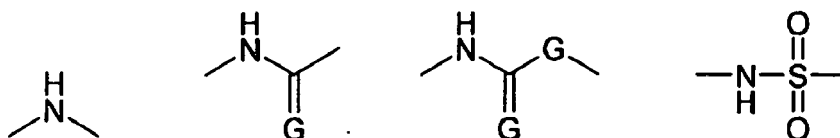
en el que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el grupo NH que forma un puente entre R' y R'' con el compuesto (I) en su extremo reductor que no se oxida;

en la que H, o un residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo, uniéndose el residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo opcionalmente mediante un puente de oxígeno al grupo NH que forma un puente entre R' y R'' del compuesto (II),

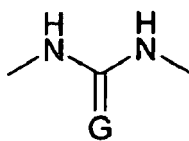
y en la que R'' comprende un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con al menos otro compuesto antes o después de la reacción de (I) y (II), y

-- en el que el compuesto (II) es una hidroxilamina,

-- o en la que R'' comprende, aparte del grupo funcional X, un grupo funcional adicional W que se une directamente al grupo NH que forma un puente entre R' y R'', seleccionándose dicho grupo funcional W del grupo que consiste en



y



5

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

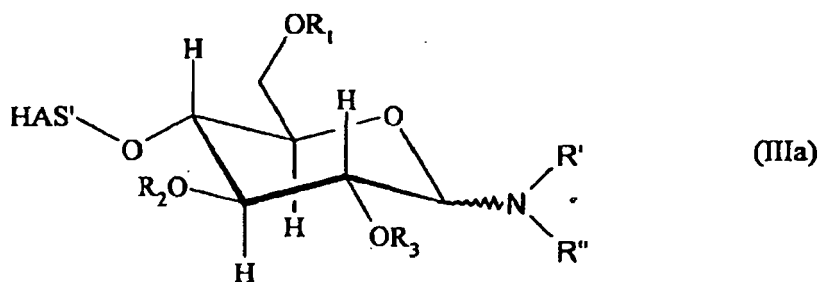
Tal como se ha descrito ya anteriormente en el contexto de los métodos de la presente invención, se usa O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina como compuesto (II) preferido, y se usa hidroxietilalmidón como hidroxialquilalmidón preferido.

10

Por tanto, la presente invención también se refiere a un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método en el que se hace reaccionar hidroxietilalmidón mediante su extremo reductor con O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina.

15

Dependiendo de las condiciones de reacción respectivas, el disolvente o la mezcla de disolventes usado y/o los residuos R' y/o R'', es posible que el derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante el método o métodos descritos anteriormente pueda tener las siguientes constituciones (IIIa):



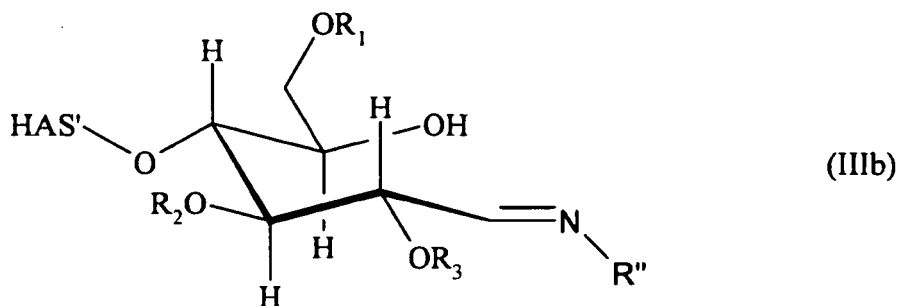
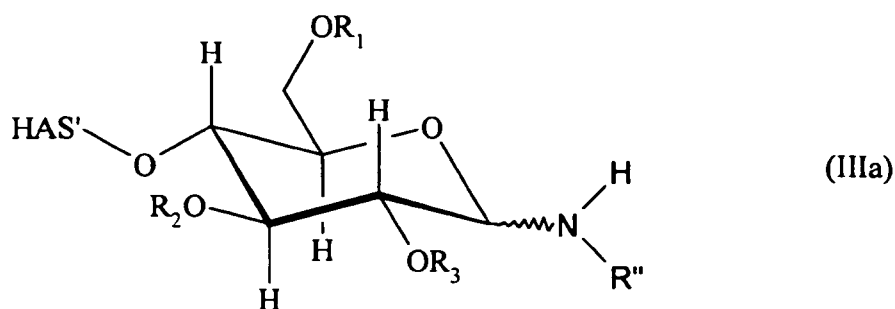
(IIIa)

20

Por tanto, la presente invención también se refiere a un derivado de hidroxialquilalmidón tal como se describió anteriormente que tiene una constitución según la fórmula (IIIa).

También es posible que, por ejemplo en el caso en el que R' es hidrógeno que el derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante el método o métodos descritos anteriormente pueda tener las siguientes constituciones (IIIa) o (IIIb) en las que (IIIa) y (IIIb) pueden estar ambas presentes en la mezcla de reacción, teniendo una determinada distribución en equilibrio:

25



5 Por tanto, la presente invención también se refiere a un derivado de hidroxialquilalmidón tal como se describió anteriormente que tiene una constitución según la fórmula (IIIb).

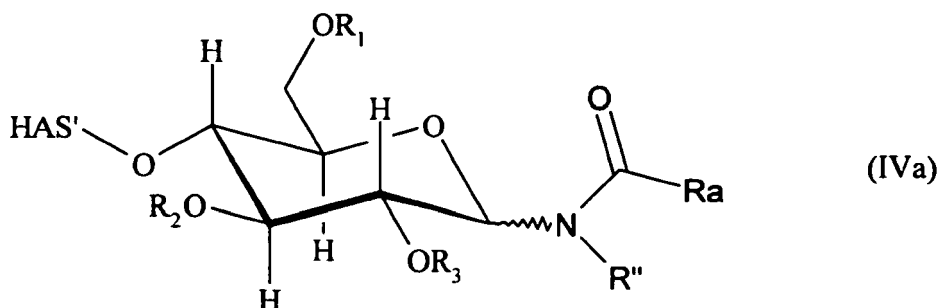
Además, la presente invención también se refiere a un derivado de hidroxialquilalmidón tal como se describió anteriormente que está presente en una mezcla de constituciones según las fórmulas (IIIa) y (IIIb).

10 Dependiendo de las condiciones de reacción y/o la naturaleza química del compuesto (II) usado para la reacción, los compuestos según la fórmula (IIIa) pueden estar presentes con el átomo de N en posición ecuatorial o axial en los que también una mezcla de ambas formas puede estar presente, teniendo una determinada distribución en equilibrio.

15 Dependiendo de las condiciones de reacción y/o la naturaleza química del compuesto (II) usado para la reacción, los compuestos según la fórmula (IIIb) pueden estar presentes con el doble enlace C-N en conformación E o Z en los que también una mezcla de ambas formas puede estar presente, teniendo una determinada distribución en equilibrio.

20 En algunos casos, puede ser deseable estabilizar el compuesto según la fórmula (IIIa). Éste es el caso especialmente cuando el compuesto según la fórmula (IIIa) se produce y/o se usa en una disolución acuosa. Como método de estabilización, se prefiere particularmente la acilación del compuesto según la fórmula (IIIa), especialmente en el caso en el que R' es hidrógeno. Como reactivo de acilación, pueden usarse todos los reactivos adecuados que dan como resultado el derivado de hidroxialquilalmidón deseado según la fórmula (IVa)

25

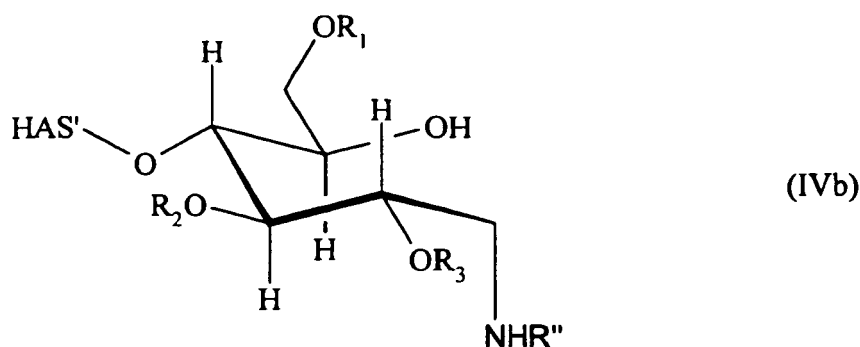


30 Según realizaciones especialmente preferidas de la presente invención, el residuo Ra que es parte del reactivo de acilación es metilo. Como reactivos de acilación, se usan preferiblemente anhídridos de ácidos carboxílicos, haluros de ácidos carboxílicos y ésteres activos de ácidos carboxílicos.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente en el que dicho derivado tiene una constitución según la fórmula (IVa).

- 5 La acilación se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de desde 0 hasta 30°C, preferiblemente en el intervalo de desde 2 hasta 20°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 4 hasta 10°C.

En otros casos, puede ser deseable estabilizar el compuesto según la fórmula (IIIb). Éste es especialmente el caso cuando el compuesto según la fórmula (IIIb) se produce y/o se usa en una disolución acuosa. Como método de estabilización, se prefiere particularmente la reducción del compuesto según la fórmula (IIIb), especialmente en el caso en el que R' es hidrógeno. Como reactivo de reducción, pueden usarse todos los reactivos adecuados que dan como resultado el derivado de hidroxialquilalmidón deseado según la fórmula (IVb)



15 Según realizaciones especialmente preferidas de la presente invención, como agentes de reducción se usan hidruros de boro tales como NaCNBH<sub>3</sub> o NaBH<sub>4</sub>.

20 Por tanto, la presente invención también se refiere a un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente en el que dicho derivado tiene una constitución según la fórmula (IVb).

25 La reducción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de desde 4 hasta 100°C, preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 90°C y de manera especialmente preferible en el intervalo de desde 25 hasta 80°C.

30 La presente invención se refiere además a mezclas de los compuestos (IIIa) y (IIIb), (IVa) y (IVb), (IIIa) y (IVa), (IIIa) y (IVb), (IIIb) y (IVa), (IIIb) y (IVb), (IIIa) y (IIIb) y (IVa), (IIIa) y (IIIb) y (IVb), (IVa) y (IVb) y (IIIa), y (IVa) y (IVb) y (IIIb) en las que (IIIa) y/o (IVa) puede estar presente independientemente en una conformación en la que el átomo de N en posición ecuatorial o axial y/o en la que (IIIb) puede estar presente con el doble enlace C-N en conformación E o Z.

35 Según un aspecto de la presente invención, se hace reaccionar el compuesto (I) con el compuesto (II) para dar un primer producto de reacción. Dicho primer producto de reacción se estabiliza entonces opcionalmente según al menos uno de los métodos descritos anteriormente. El primer producto de reacción, opcionalmente estabilizado se hace reaccionar luego con al menos un compuesto adicional mediante la reacción de al menos un grupo funcional X comprendido en R'' del primer producto de reacción con al menos un grupo funcional Y comprendido en el al menos un compuesto adicional, para dar un segundo producto de reacción. Dicho segundo producto de reacción se estabiliza entonces opcionalmente según al menos uno de los métodos descritos anteriormente.

40 Según aún otro aspecto de la presente invención, el al menos un compuesto adicional es un polipéptido o un compuesto de reticulación o un producto de reacción de un compuesto de reticulación con un polipéptido. En el caso en que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido, el grupo funcional Y está comprendido en el polipéptido. En el caso en que el al menos un compuesto adicional es un compuesto de reticulación, el grupo funcional Y está comprendido en el compuesto de reticulación y opcionalmente también en el polipéptido. En el caso en que el al menos un compuesto adicional es un producto de reacción de un compuesto de reticulación con un polipéptido, el grupo funcional Y está comprendido en el compuesto de reticulación.

50 Según un aspecto adicional de la presente invención, se hace reaccionar el compuesto (II) con al menos un compuesto adicional mediante la reacción de al menos un grupo funcional X comprendido en R'' del compuesto (II) con al menos un grupo funcional Y comprendido en el al menos un compuesto adicional para dar un primer producto de reacción. El al menos un compuesto adicional es preferiblemente un polipéptido o un compuesto de reticulación o un producto de reacción de un compuesto de reticulación con un polipéptido, tal como se comentó anteriormente. Dicho primer producto de reacción se hace reaccionar luego con el compuesto (I) mediante la reacción del extremo

reductor del compuesto (I) con el grupo NH del primer producto de reacción que forma un puente entre los residuos R' y R" originales del compuesto (II) para dar un segundo producto de reacción. Dicho segundo producto de reacción se estabiliza entonces opcionalmente según al menos uno de los métodos descritos anteriormente.

5 Según una realización especialmente preferida de la presente invención, se usa hidroxietilalmidón como el compuesto (I), se usa O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina como el compuesto (II), y se usa EPO que tiene un resto hidrato de carbono terminal oxidado de una cadena lateral de hidrato de carbono como compuesto adicional. Más preferiblemente, se hace reaccionar hidroxietilalmidón con O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina para dar un primer derivado de hidroxietilalmidón, y ese primer derivado se hace reaccionar adicionalmente con EPO que  
10 tiene un resto hidrato de carbono terminal oxidado de una cadena lateral de hidrato de carbono para dar un segundo derivado de hidroxietilalmidón. En este caso específico, no ha de llevarse a cabo ninguna reacción de estabilización en absoluto.

15 Por tanto, la presente invención también se refiere a un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método en el que se hace reaccionar hidroxietilalmidón mediante su extremo reductor con O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina y el producto de reacción se hace reaccionar con eritropoyetina mediante el resto hidrato de carbono terminal oxidado de una cadena lateral de hidrato de carbono de la eritropoyetina.

20 Según aún otra realización especialmente preferida de la presente invención, se usa hidroxietilalmidón como el compuesto (I), se usa O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina como el compuesto (II), se usa un compuesto heterobifuncional de reticulación que tiene un grupo maleimida y un grupo éster activo de N-hidroxisuccinimida, y se usa EPO que tiene al menos un grupo -SH (denominado TioEPO) como polipéptido. Más preferiblemente, se hace reaccionar hidroxietilalmidón con O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina para dar un primer derivado de hidroxietilalmidón, ese primer derivado se hace reaccionar adicionalmente con el éster activo de N-  
25 hidroxisuccinimida del compuesto de reticulación para dar un segundo derivado, y ese segundo derivado se hace reaccionar mediante el grupo maleimida con la TioEPO para dar un tercer derivado de hidroxietilalmidón.

30 El derivado de hidroxialquilalmidón que a continuación se denomina conjugado de HAS-EPO y que se forma mediante la reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) y posiblemente un compuesto de reticulación y eritropoyetina, tiene la ventaja de que muestra una estabilidad biológica mejorada en comparación con la eritropoyetina antes de la conjugación. Esto se debe principalmente al hecho de que este derivado de hidroxialquilalmidón se reconoce menos o incluso no se reconoce por los sistemas de eliminación del hígado y el riñón y, por tanto, persiste en el sistema circulatorio durante un periodo de tiempo más largo. Además, puesto que el HAS se une de manera específica al sitio, se minimiza el riesgo de destruir la actividad biológica *in vivo* de EPO  
35 mediante conjugación de HAS a EPO.

40 El conjugado de HAS-EPO de la invención puede mostrar esencialmente la misma actividad biológica *in vitro* que la EPO nativa recombinante, puesto que la actividad biológica *in vitro* sólo mide la afinidad de unión al receptor de la EPO. Se conocen en la técnica métodos para determinar la actividad biológica *in vitro*.

45 Además, el HAS-EPO muestra una mayor actividad *in vivo* que la EPO usada como material de partida para la conjugación (EPO no conjugada). Se conocen en la técnica métodos para determinar la actividad biológica *in vivo*.

50 El conjugado de HAS-EPO puede mostrar una actividad *in vivo* de desde el 110% hasta el 300%, preferiblemente desde el 110% hasta el 200%, más preferiblemente desde el 110% hasta el 180% o desde el 110 hasta el 150%, lo más preferiblemente desde el 110% hasta el 140%, si se fija la actividad *in vivo* ende la EPO no conjugada como el 100%.

55 En comparación con la EPO altamente sialilada de Amgen (véase el documento EP 428 267 B1), el HAS-EPO muestra preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente al menos el 85% o al menos el 95%, al menos el 150%, al menos el 200% o al menos el 300% de la actividad *in vivo* de la EPO altamente sialilada si se fija la actividad *in vivo* de la EPO altamente sialilada como el 100%. Lo más preferiblemente, muestra al menos el 95% de la actividad *in vivo* de la EPO altamente sialilada.

60 La alta la actividad biológica *in vivo* del conjugado de HAS-EPO de la invención resulta principalmente del hecho de que el conjugado de HAS-EPO permanece más tiempo en la circulación que la EPO no conjugada debido a que se reconoce menos por los sistemas de eliminación del hígado y debido a que se reduce el aclaramiento renal debido al mayor peso molecular. Se conocen en la técnica métodos para la determinación del tiempo de semivida *in vivo* de la EPO en la circulación (Sytkowski, Lunn, Davis, Feldman, Siekman, 1998, Human erythropoietin dimers with markedly enhanced *in vivo* activity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(3), 1184-8).

65 Por consiguiente, una gran ventaja de la presente invención es que se proporciona un conjugado de HAS-EPO que puede administrarse de manera menos frecuente que las preparaciones de EPO disponibles comercialmente en la actualidad. Mientras que las preparaciones de EPO convencionales han de administrarse al menos cada 3 días, el conjugado de HAS-EPO de la invención se administra preferiblemente dos veces a la semana week, más preferiblemente una vez a la semana.

Además, el método de la invención tiene la ventaja de que puede producirse un derivado de EPO eficaz a costes reducidos puesto que el método no comprende etapas de purificación extensas y que llevan mucho tiempo que dan como resultado un bajo rendimiento final, por ejemplo no es necesario eliminar mediante purificación formas de EPO subsialiladas que se sabe que muestran baja o ninguna actividad biológica *in vivo*.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, el conjugado de HAS-polipéptido, preferiblemente el conjugado de HAS-EPO, más preferiblemente el conjugado de HES-EPO de la presente invención. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además al menos un diluyente, adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable útil en la terapia con eritropoyetina.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, un derivado de hidroxialquilalmidón tal como se describió anteriormente en la que el producto de reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) se hace reaccionar mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) con al menos un compuesto adicional o en el que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X con al menos un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I) y en la que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido.

Según realizaciones preferidas de la presente invención, el polipéptido, preferiblemente eritropoyetina se hace reaccionar con el compuesto (II) o con el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) mediante un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el polipéptido.

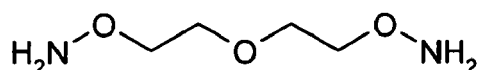
Según una realización incluso más preferida de la presente invención, el polipéptido, preferiblemente eritropoyetina se hace reaccionar con el compuesto (II) o con el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) mediante un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el polipéptido.

Por tanto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica tal como se describió anteriormente en la que el polipéptido se hace reaccionar con el compuesto (II) o con el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) mediante un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el polipéptido.

Según las realizaciones preferidas, el polipéptido es GCS-F, AT III, IFN-beta o eritropoyetina, más preferiblemente eritropoyetina.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica tal como se describió anteriormente en la que el polipéptido es eritropoyetina.

Según una realización especialmente preferida de la presente invención, la composición farmacéutica tal como se describió anteriormente se produce haciendo reaccionar hidroxietilalmidón en un medio acuoso con un compuesto según la siguiente fórmula



y haciendo reaccionar el producto de reacción con eritropoyetina.

Según una realización particularmente preferida, la eritropoyetina se oxida con peryodato de sodio antes de la reacción mencionada anteriormente.

Según otra realización particularmente preferida, la eritropoyetina se desialila y posteriormente se oxida con peryodato de sodio antes de la reacción.

Según una realización preferida adicional de la presente invención, se excluyen las composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de hidroxialquilalmidón que se producen basándose en una Tio-EPO completamente reducida según el ejemplo 5. Según otra realización preferida, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, un derivado de hidroxialquilalmidón tal como se describió anteriormente en la que el producto de reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) se hace reaccionar mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) con al menos un compuesto adicional o en la que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X con al menos un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I) y en la que el al menos un compuesto adicional es un compuesto de reticulación y el producto de reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II) con el compuesto de reticulación se hace reaccionar con un polipéptido.

Según todavía una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica mencionada anteriormente en la que el polipéptido es eritropoyetina.

5 La composición farmacéutica mencionada anteriormente es especialmente adecuada para el tratamiento de trastornos anémicos o trastornos o enfermedades con disfunción hematopoyética relacionados con los mismos.

10 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a aquella cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un estado y régimen de administración dados. La administración de isoformas de eritropoyetina es preferiblemente por vías parenterales. La vía específica elegida dependerá del estado que está tratándose. La administración de isoformas de eritropoyetina se realiza preferiblemente como parte de una formulación que contiene un portador adecuado, tal como albúmina sérica humana, un diluyente adecuado, tal como solución salina tamponada, y/o un adyuvante adecuado. La dosificación requerida será en cantidades suficientes para elevar el hematocrito de los pacientes y variará dependiendo de la gravedad del estado que está tratándose, el método de administración usado, y similares.

15 El objeto del tratamiento con la composición farmacéutica de la invención es preferiblemente un aumento del valor de hemoglobina superior a 6,8 mmol/l en la sangre. Para ello, la composición farmacéutica puede administrarse de manera que el valor de hemoglobina aumente entre desde 0,6 mmol/l y 1,6 mmol/l a la semana. Si el valor de hemoglobina supera 8,7 mmol/l, debe interrumpirse preferiblemente la terapia hasta que el valor de hemoglobina sea inferior a 8,1 mmol/l.

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

25 Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de 0,01-10 µg/kg de peso corporal del paciente, más preferiblemente de 0,1 a 5 µg/kg, de 0,1 a 1 µg/kg, o 0,2-0,9 µg/kg, lo más preferiblemente 0,3-0,7 µg/kg, y lo más preferido 0,4-0,6 µg/kg de peso corporal.

En general, se administran preferiblemente entre 10 µg y 200 µg, preferiblemente entre 15 µg y 100 µg por dosis.

35 La invención se refiere además a un HAS-polipéptido según la presente invención para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal.

40 La invención se refiere además al uso de un conjugado de HAS-EPO de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos anémicos o trastornos o enfermedades con disfunción hematopoyética relacionados con los mismos.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, tablas y figuras que no pretenden restringir en modo alguno el alcance de la presente invención.

#### 45 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1

La figura 1 muestra un análisis mediante SDS-PAGE del conjugado de HES-EPO, producido según el ejemplo 4.1.

50 Carril A: Marcador proteico Roti®-Mark PRESTAINED (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, A); pesos moleculares (en kD) del marcador proteico de la parte superior a la inferior: 245, 123, 77, 42, 30, 25,4, y 17.

Carril B: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 4.1.

55 Carril C: Material de partida de EPO.

Figura 2

La figura 2 muestra un análisis mediante SDS-PAGE del conjugado de HES-EPO, producido según el ejemplo 4.3.

60 Carril A: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 4.3.

Carril B: Material de partida de EPO.

65 Carril C: Marcador proteico Roti®-Mark PRESTAINED (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, A); pesos moleculares (en kD) del marcador proteico de la parte superior a la inferior: 245, 123, 77, 42, 30, 25,4 y 17.

Figura 3

5 La figura 3 muestra un análisis mediante SDS-PAGE de conjugados de HES-EPO, producidos según los ejemplos 6.1 y 6.4.

Carril A: Marcador proteico Roti®-Mark PRESTAINED (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, A); pesos moleculares (en kD) del marcador proteico de la parte superior a la inferior: 245, 123, 77, 42, 30, 25,4 y 17.

10 Carril B: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.4.

Carril C: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.1.

15 Carril D: Material de partida de EPO.

Figura 4

20 La figura 4 muestra un análisis mediante SDS-PAGE de conjugados de HES-EPO, producidos según los ejemplos 6.2, 6.3, 6.5 y 6.6.

Carril A: Marcador proteico Roti®-Mark PRESTAINED (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, A); pesos moleculares (en kD) del marcador proteico de la parte superior a la inferior: 245, 123, 77, 42, 30, 25,4 y 17.

25 Carril B: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.6, basado en el ejemplo 1.3 b).

Carril C: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.5, basado en el ejemplo 1.1 b).

Carril D: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.6, basado en el ejemplo 1.3 a).

30 Carril E: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.5, basado en el ejemplo 1.1 a).

Carril F: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.2.

35 Carril G: Producto en bruto después de conjugación según el ejemplo 6.3.

Carril K: Material de partida de EPO.

Figura 5

40 Análisis mediante SDS-PAGE de EPO-GT-1 sometido a tratamiento con ácido suave durante 5 min. = carril 2; 10 min. = carril 3; 60 min. = carril 4 y EPO no tratada = carril 1; se muestra el desplazamiento de la movilidad de EPO después de la eliminación de N-glicanos (+PNGASA).

Figura 6

45 Patrón de HPAEC-PAD de oligosacáridos aislados de EPO no tratada y de EPO incubada durante 5 min., 10 min. y 60 min. en condiciones de hidrólisis ácida suave. Los números romanos I-V indican la posición de elución de I = estructura diantenaria desialilada, II = estructuras triantenarias trisialiladas (dos isómeros), III = estructura tetraantenaria tetrasialilada + 2 repeticiones de N-acetil-lactosamina, IV = estructura tetraantenaria tetrasialilada + 1 repeticiones de N-acetil-lactosamina; V = estructura tetraantenaria tetrasialilada + sin repeticiones de N-acetil-lactosamina. El área de elución de estructuras de oligosacáridos sin, con ácido siálico 1-4 se indica entre corchetes.

Figura 7

55 HPAEC-PAD de oligosacáridos unidos a N después de desialilación; se muestra la posición de elución del ácido N-acetilneuramínico; los números 1-9 indican la posición de elución de oligosacáridos convencionales: 1 = diantenario; 2 = triantenario (isómero 2-4), 3 = triantenario (isómero 2-6); 4 = tetraantenario; 5 = triantenario más 1 repeticiones; 6 = tetraantenario más 1 repeticiones; 7 = triantenario más 2 repeticiones; 8 = tetraantenario más 2 repeticiones y 9 = tetraantenario más 3 repeticiones.

Figura 8

65 Análisis mediante SDS-PAGE de EPO tratada de manera suave y no tratada que se sometieron a oxidación con peryodato de residuos ácido siálico. 1 = oxidado con peryodato sin tratamiento con ácido; 2 = oxidado con peryodato 5 min. de tratamiento con ácido; 3 = oxidado con peryodato y 10 min. de tratamiento con ácido; 4 = oxidado con peryodato sin tratamiento con ácido; 5 = BRP, patrón de EPO sin peryodato y sin tratamiento con ácido.



Figura 9

5 Patrón de HPAEC-PAD de oligosacáridos nativos aislados de EPO no tratada y de EPO incubada durante 5 min. y 10 min. en condiciones de hidrólisis ácida suave y posterior tratamiento con peryodato. El área de elución de estructuras de oligosacáridos sin y con ácido siálico 1-4 se indica entre corchetes 1-5.

Figura 10

10 Análisis mediante SDS-PAGE del transcurso temporal de la modificación con HES de EPO-GT-1-A: se hicieron reaccionar alícuotas de 20 µg de EPO-GT-1-A con derivado de HES modificado con hidroxilamina X durante 30 min., 2, 4 y 17 horas.

15 Carril 1 = tiempo de reacción de 30 min.; carril 2 = tiempo de reacción de 2 horas; carril 3 = tiempo de reacción de 4 horas; carril 4 = tiempo de reacción de 17 horas; carril 5 = EPO-GT-1-A sin la modificación con HES. La figura a la izquierda muestra el desplazamiento de la movilidad de EPO-GT-1-A con un tiempo de incubación creciente en presencia del derivado de HES modificado con hidroxilamina (velocidad de flujo: 1 ml·min<sup>-1</sup>) X: Carril 1 = tiempo de reacción de 30 min.; carril 2 = tiempo de reacción de 2 horas; carril 3 = tiempo de reacción de 4 horas, carril 4 = tiempo de reacción de 17 horas; carril 5 = EPO-GT-1-A con modificación con HES. La figura a la derecha muestra el análisis de las mismas muestras después de su tratamiento con N-glicosidasa.

Figura 11

25 Análisis mediante SDS-PAGE de fracciones de Q-Sepharose de conjugados de HES-EPO. Cada 1% de la fracción retenida y 1% de la fracción que eluye a altas concentraciones salinas se concentraron en un concentrador Speed Vac y se cargaron sobre los geles en tampón de muestra. Se tiñó la proteína EPO mediante azul de Coomassie. A = muestra I; B = muestra II; C = muestra III; K = EPO-GT-1 de control; A1, B1, C1 y K1 indicaron la fracción retenida; A2, B2, C2 y K2 indican la fracción eluida con alta concentración salina.

30 Figura 12a

Análisis mediante SDS-PAGE de la muestra de EPO modificada con HES A2 (véase la figura 7), la muestra de EPO de control K2 y la preparación de EPO EPO-GT-1-A se digirieron en presencia de N-glicosidasa para eliminar los oligosacáridos unidos a N. Todas las muestras de EPO mostraron el desplazamiento de la movilidad hacia formas de bajo peso molecular que carecen de o que contienen O-glicano. Se observó una menor razón de la banda de proteína O-glicosilada y no glicosilada para la muestra de EPO modificada con HES A2 después de des-N-glicosilación y se detectó una banda de proteína difusa a aproximadamente 30 KDa, que representa presumiblemente la modificación con HES en el ácido siálico del residuo O-glicano (véase la flecha marcada mediante un asterisco).

40 Figura 12b

45 Análisis mediante SDS-PAGE después de hidrólisis suave de la muestra de EPO modificada con HES A2 (véase la figura 11), la muestra de EPO de control K2 y EPO-GT-1A que no se trataron o digirieron en presencia de N-glicosidasa para eliminar los oligosacáridos unidos a N (véase la figura 12a). Tanto la forma de alto peso molecular de A2 antes como A después del tratamiento con N-glicosidasa (véanse los corchetes con y sin flecha) desaparecieron tras el tratamiento con ácido de las muestras. El patrón de EPO BRP que se hizo correr para su comparación no se sometió a tratamiento con ácido suave.

50 Figura 13

55 Análisis mediante HPAEC-PAD de material de oligosacárido unido a N liberado de la muestra modificada con HES A, de EPO-GT-1-A y de una muestra de EPO de control incubada con HES no modificado (K). Los números romanos I-V indican la posición de elución de I = estructura diantenaria disialilada, II = estructuras triantenarias trisialiladas (dos isómeros), III = estructura tetraantenaria tetrasialilada + 2 repeticiones de N-acetil-lactosamina, IV = estructura tetraantenaria tetrasialilada + 1 repetición de N-acetil-lactosamina, V = estructura tetraantenaria tetrasialilada + sin repetición de N-acetil-lactosamina; los corchetes indican el área de elución de N-glicanos di-, tri- y tetrasialilados tal como se notifica en las leyendas de las figuras 6 y 9.

60 Figura 14

65 Análisis mediante HPAEC-PAD de material de oligosacárido unido a N liberado de la muestra modificada con HES A, de EPOGT-1A y de una muestra de EPO de control (K) incubada con HES no modificado. Se muestran los tiempos de retención de una mezcla de oligosacáridos convencionales: los números 1-9 indican la posición de elución de oligosacáridos convencionales: 1 = diantenario; 2 = triantenario (isómero 2-4); 3 = triantenario (isómero 2-

6); 4 = tetraantenario; 5 = triantenario más 1 repetición; 6 = tetraantenario más 1 repetición; 7 = triantenario más 2 repeticiones; 8 = tetraantenario más 2 repeticiones y 9 = tetraantenario más 3 repeticiones.

Figuras 15 a 21

5 Las figuras 15 a 21 representan espectros de masas MALDI/TOF de los N-glicanos desialilados químicamente y liberados enzimáticamente aislados de preparaciones de EPO modificada con HES y EPO de control. Las principales señales en m/z 1809,7, 2174,8, 2539,9, 2905,0 y 3270,1 ( $[M+Na]^+$ ) corresponden a estructuras de N-glicano de tipo complejo di- a tetraantenarias con ninguna, una o dos repeticiones de N-acetil-lactosamina acompañadas por señales débiles debidas a la pérdida de fucosa o galactosa que se deben a las condiciones de hidrólisis ácida empleadas para la desialilación de muestras para análisis mediante EM.

Figura 15

15 Espectro de MALDI/TOF: oligosacáridos desialilados de EPO modificada con HES A2.

Figura 16

20 Espectro de MALDI/TOF: oligosacáridos desialilados de EPO GT-1-A.

Figura 17

Espectro de MALDI/TOF: oligosacáridos desialilados de EPO K2.

25 Figura 18

Espectro de MALDI/TOF: oligosacáridos desialilados de EPO-GT-1.

Figura 19

30 Espectro de MALDI/TOF: oligosacáridos desialilados de EPO-GT-1 sometidos a hidrólisis ácida durante 5 min.

Figura 20

35 Espectro de MALDI/TOF: oligosacáridos desialilados de EPO-GT-1 sometidos a hidrólisis ácida durante 10 min.

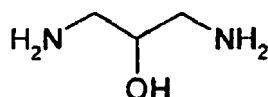
Figura 21

40 Espectro de MALDI/TOF: oligosacáridos desialilados de EPO-GT-1 sometidos a hidrólisis ácida durante 60 min.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Formación de derivados de hidroxietilalmidón mediante aminación reductora

45 Ejemplo 1.1 (que no es según la invención) Reacción de hidroxietilalmidón con 1,3-diamino-2-hidroxiopropano

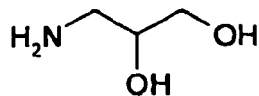


50 a) A una disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón (HES 18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4)) en 5 ml de agua, se añadieron 0,83 mmol de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub>. Se incubó la mezcla resultante a 80°C durante 17 h. Se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se dializó durante 4 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

55 b) También fue posible la incubación de la mezcla que resulta de añadir 0,83 mmol de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub> a la disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón y se llevó a cabo a 25°C durante 3 d.

Ejemplo 1.2 (que no es según la invención) Reacción de hidroxietilalmidón con 1,2-dihidroxi-3-aminopropano

60



5 a) A una disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón (HES18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4)) en 5 ml de agua, se añadieron 0,83 mmol de 1,2-dihidroxi-3-aminopropano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub>. Se incubó la mezcla resultante a 80°C durante 17 h. Se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se dializó durante 4 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

10 b) También fue posible la incubación de la mezcla que resulta de añadir 0,83 mmol de 1,2-dihidroxi-3-aminopropano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub> a la disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón y se llevó a cabo a 25°C durante 3 d.

15 Se confirmó la reacción de 1,2-dihidroxi-3-aminopropano con HES indirectamente mediante la cuantificación de formaldehído, que resulta de la escisión oxidativa del 1,2-diol en el producto de reacción por peryodato tal como se describe por G. Avigad, Anal. Biochem. 134 (1983) 449-504.

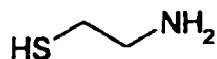
Ejemplo 1.3 (que no es según la invención) Reacción de hidroxietilalmidón con 1,4-diaminobutano



20 a) A una disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón (HES 18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4)) en 5 ml de agua, se añadieron 0,83 mmol de 1,4-diaminobutano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub>. Se incubó la mezcla resultante a 80°C durante 17 h. Se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se dializó durante 4 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

25 b) También fue posible la incubación de la mezcla que resulta de añadir 0,83 mmol de 1,4-diaminobutano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub> a la disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón y se llevó a cabo a 25°C durante 3 d.

30 Ejemplo 1.4 (que no es según la invención) Reacción de hidroxietilalmidón con 1-mercapto-2-aminoetano

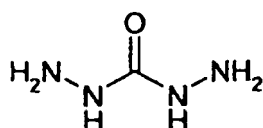


35 a) A una disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón (HES18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4)) en 5 ml de agua, se añadieron 0,83 mmol de 1-mercapto-2-aminoetano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub>. Se incubó la mezcla resultante a 80°C durante 17 h. Se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se dializó durante 4 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

40 b) También fue posible la incubación de la mezcla que resulta de añadir 0,83 mmol de 1-mercapto-2-aminoetano y 50 mg de cianoborohidrato de sodio NaCNBH<sub>3</sub> a la disolución de 200 mg de hidroxietilalmidón y se llevó a cabo a 25°C durante 3 d.

45 Ejemplo 2: Formación de derivados de hidroxietilalmidón mediante conjugación

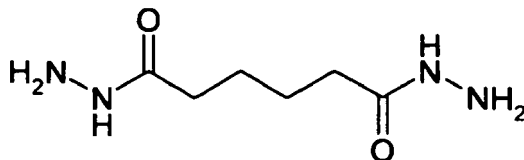
Ejemplo 2.1: Reacción de hidroxietilalmidón con carbohidrazida



50 Se disolvieron 0,96 g de HES18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4) en 8 ml de tampón acetato de sodio acuoso 0,1 M, pH 5,2, y se añadieron 8 mmol de carbohidrazida (Sigma Aldrich, Taufkirchen, A). Después de agitar durante 18 h a 25°C, se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el

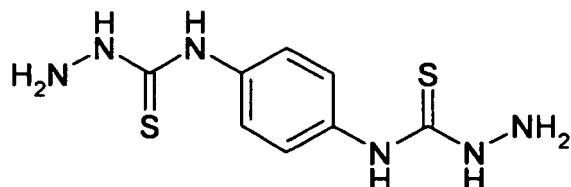
producto precipitado mediante centrifugación, se redisolvió en 40 ml de agua, y se dializó durante 3 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

Ejemplo 2.2: Reacción de hidroxietilalmidón con dihidrazida adípica



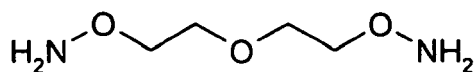
Se disolvieron 0,96 g de HES18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4) en 8 ml de tampón acetato de sodio acuoso 0,1 M, pH 5,2, y se añadieron 8 mmol de dihidrazida adípica (Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, A). Después de agitar durante 18 h a 25°C, se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación, se redisolvió en 40 ml de agua, y se dializó durante 3 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

Ejemplo 2.3: Reacción de hidroxietilalmidón con 1,4-fenilen-bis-3-tiosemicarbazida



Se disolvieron 0,96 g de HES18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4) en 8 ml de tampón acetato de sodio acuoso 0,1 M, pH 5,2, y se añadieron 8 mmol de 1,4-fenilen-bis-3-tiosemicarbazida (Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, A). Después de agitar durante 18 h a 25°C, se añadieron 8 ml de agua a la mezcla de reacción, y se centrifugó la suspensión durante 15 min. a 4.500 rpm. Se decantó el sobrenadante transparente y se añadió posteriormente a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación, se redisolvió en 40 ml de agua, y se centrifugó durante 15 min. a 4.500 rpm. Se dializó el sobrenadante transparente durante 3 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

Ejemplo 2.4: Reacción de hidroxietilalmidón con O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina



Se sintetizó O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina tal como se describe en Boturny *et al.* Tetrahedron 53 (1997) págs. 5485-5492 en 2 etapas a partir de materiales disponibles comercialmente.

Se disolvieron 0,96 g de HES18/0,4 (MW = 18.000 D, GS=0,4) en 8 ml de tampón acetato de sodio acuoso 0,1 M, pH 5,2, y se añadieron 8 mmol de O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina. Después de agitar durante 18 h a 25°C, se añadió la mezcla de reacción a 160 ml de una mezcla 1:1 fría de acetona y etanol (v/v). Se recogió el producto precipitado mediante centrifugación, se redisolvió en 40 ml de agua, y se dializó durante 3 d frente a agua (tubos de diálisis SnakeSkin, punto de corte de 3,5 KD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, A), y se liofilizó.

Ejemplo 3 Oxidación de eritropoyetina

Se produjo eritropoyetina oxidada tal como se describe en el ejemplo 7. Como eritropoyetina oxidada, se usó EPO-GT-1-A tal como se describe en el ejemplo 7.11(c) (EPO-GT-1 sin hidrólisis ácida, tratada con oxidación suave con perodato).

Ejemplo 4: Conjugación de derivados de hidroxietilalmidón con eritropoyetina oxidada del ejemplo 3

Ejemplo 4.1 Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 2.1

Se ajustó EPO oxidada (1,055  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en tampón PBS 20 mM hasta pH 5,3 con tampón acetato de sodio 5 M, pH 5,2. A 19  $\mu\text{l}$  de la disolución de EPO, se añadieron 18  $\mu\text{l}$  de una disolución del derivado de HES producido según el ejemplo 2.1 (MW 18 kD; 18,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,2), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por  
 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

Se muestra el resultado experimental en la figura 1. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

Ejemplo 4.2 Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 2.3

Se ajustó EPO oxidada (1,055  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en tampón PBS 20 mM hasta pH 5,3 con tampón acetato de sodio 5 M, pH 5,2. A 19  $\mu\text{l}$  de la disolución de EPO, se añadieron 18  $\mu\text{l}$  de una disolución del derivado de HES producido según el ejemplo 2.3 (MW 18 kD; 18,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,2), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

Ejemplo 4.3 Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 2.4

Se ajustó EPO oxidada (1,055  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en tampón PBS 20 mM hasta pH 5,3 con tampón acetato de sodio 5 M, pH 5,2. A 19  $\mu\text{l}$  de la disolución de EPO, se añadieron 18  $\mu\text{l}$  de una disolución del derivado de HES producido según el ejemplo 2.4 (MW 18 kD; 18,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,2), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

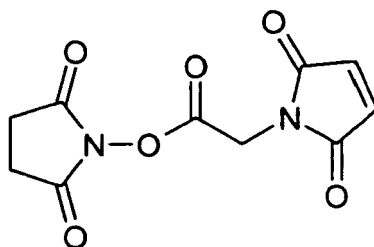
Se muestra el resultado experimental en la figura 2. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

Ejemplo 5 Formación de Tio-EPO mediante reducción de eritropoyetina

Se incubaron 241,5  $\mu\text{g}$  de eritropoyetina (EPO-GT-1, véase el ejemplo 7) en 500  $\mu\text{l}$  de un tampón borato de sodio 0,1 M, EDTA 5 mM, DTT 10 mM (Lancaster, Morcambe, R.U.), pH 8,3, durante 1 h a 37°C. Se eliminó el DTT mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, MWCO de 10 KD (VIVASCIENCE, Hannover, A) a 13.000 rpm, lavado posterior 3 veces con el tampón borato y dos veces con un tampón fosfato (0,1 M, NaCl 9,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2).  
 35  
 40  
 45

Ejemplo 6: Conjugación de derivados de hidroxietilalmidón con tio-eritropoyetina usando un compuesto de reticulación

En cada uno de los siguientes ejemplos, se usó éster de N-(alfa-maleimidoacetoxi)succinimida (AMAS)



como compuesto de reticulación.

Ejemplo 6.1 Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 2.1 y el compuesto de reticulación

A 50 nmol de derivado de HES producido según el ejemplo 2.1 y disuelto en 200  $\mu\text{l}$  de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (0,1 M, NaCl 9,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2), se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de una disolución de 2,5  $\mu\text{mol}$  de AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, A) en DMSO. Se incubó la disolución transparente durante 80 min. a 25°C y 20 min. a  
 50  
 55

40°C. Se eliminó el AMAS restante mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, MWCO de 5 KD (VIVASCIENCE, Hannover, A) a 13.000 rpm, lavado 4 veces y 30 min. cada uno con el tampón fosfato.

5 A la disolución residual, se añadieron 15 µg de TioEPO producido según el ejemplo 5 (1 µg/µl en tampón fosfato), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por Invitrogen. Se tiñe el gel con reactivo de tinción Roti-azul de Coomassie (Roth, Karlsruhe, A) durante la noche.

10 Se muestra el resultado experimental en la figura 3. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

15 Ejemplo 6.2 Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 2.2 y el compuesto de reticulación

20 A 50 nmol de derivado de HES producido según el ejemplo 2.2 y disuelto en 200 µl de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (0,1 M, NaCl 9,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2), se añadieron 10 µl de una disolución de 2,5 µmol de AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, A) en DMSO. Se incubó la disolución transparente durante 80 min. a 25°C y 20 min. a 40°C. Se eliminó el AMAS restante mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, MWCO de 5 KD (VIVASCIENCE, Hannover, A) a 13.000 rpm, lavado 4 veces y 30 min. cada uno con el tampón fosfato.

25 A la disolución residual, se añadieron 15 µg de TioEPO producido según el ejemplo 5 (1 µg/µl en tampón fosfato), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por Invitrogen. Se tiñe el gel con reactivo de tinción Roti-azul de Coomassie (Roth, Karlsruhe, A) durante la noche.

30 Se muestra el resultado experimental en la figura 4. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

35 Ejemplo 6.3 Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 2.3 y el compuesto de reticulación

40 A 50 nmol de derivado de HES producido según el ejemplo 2.3 y disuelto en 200 µl de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (0,1 M, NaCl 9,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2), se añadieron 10 µl de una disolución de 2,5 µmol de AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, A) en DMSO. Se incubó la disolución transparente durante 80 min. a 25°C y 20 min. a 40°C. Se eliminó el AMAS restante mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, MWCO de 5 KD (VIVASCIENCE, Hannover, A) a 13.000 rpm, lavado 4 veces y 30 min. cada uno con el tampón fosfato.

45 A la disolución residual, se añadieron 15 µg de TioEPO producido según el ejemplo 5 (1 µg/µl en tampón fosfato), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por Invitrogen. Se tiñe el gel con reactivo de tinción Roti-azul de Coomassie (Roth, Karlsruhe, A) durante la noche.

50 Se muestra el resultado experimental en la figura 4. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

Ejemplo 6.4 Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 2.4 y el compuesto de reticulación

55 A 50 nmol de derivado de HES producido según el ejemplo 2.4 y disuelto en 200 µl de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (0,1 M, NaCl 9,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2), se añadieron 10 µl de una disolución de 2,5 µmol de AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, A) en DMSO. Se incubó la disolución transparente durante 80 min. a 25°C y 20 min. a 40°C. Se eliminó el AMAS restante mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, MWCO de 5 KD (VIVASCIENCE, Hannover, A) a 13.000 rpm, lavado 4 veces y 30 min. cada uno con el tampón fosfato.

60 A la disolución residual, se añadieron 15 µg de TioEPO producido según el ejemplo 5 (1 µg/µl en tampón fosfato), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por Invitrogen. Se tiñe el gel con reactivo de tinción Roti-azul de Coomassie (Roth, Karlsruhe, A) durante la noche.

65

Se muestra el resultado experimental en la figura 3. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

Ejemplo 6.5 (que no es según la invención) Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 1.1 y el compuesto de reticulación

A 50 nmol de derivado de HES producido según el ejemplo 1.1, en condiciones de incubación de 80°C y 17 h (Ejemplo 1.1 a)) así como de 25°C y 3 d (Ejemplo 1.1 b)), y disuelto en 200 µl de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (0,1 M, NaCl 9,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2), se añadieron 10 µl de una disolución de 2,5 µmol de AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, A) en DMSO. Se incubó la disolución transparente durante 80 min. a 25°C y 20 min. a 40°C. Se eliminó el AMAS restante mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, MWCO de 5 KD (VIVASCIENCE, Hannover, A) a 13.000 rpm, lavado 4 veces y 30 min. cada uno con el tampón fosfato.

A la disolución residual, se añadieron 15 µg de TioEPO producido según el ejemplo 5 (1 µg/µl en tampón fosfato), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por Invitrogen. Se tiñe el gel con reactivo de tinción Roti-azul de Coomassie (Roth, Karlsruhe, A) durante la noche.

Se muestra el resultado experimental en la figura 4. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

Ejemplo 6.6 (que no es según la invención) Reacción de eritropoyetina oxidada con el producto de reacción del ejemplo 1.3 y el compuesto de reticulación

A 50 nmol de derivado de HES producido según el ejemplo 1.3, en condiciones de incubación de 80°C y 17 h (Ejemplo 1.3 a)) así como de 25°C y 3 d (Ejemplo 1.3 b)), y disuelto en 200 µl de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (0,1 M, NaCl 9,15 M, EDTA 50 mM, pH 7,2), se añadieron 10 µl de una disolución de 2,5 mmol de AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, A) en DMSO. Se incubó la disolución transparente durante 80 min. a 25°C y 20 min. a 40°C. Se eliminó el AMAS restante mediante filtración centrífuga con un concentrador VIVASPIN de 0,5 ml, MWCO de 5 KD (VIVASCIENCE, Hannover, A) a 13.000 rpm, lavado 4 veces y 30 min. cada uno con el tampón fosfato.

A la disolución residual, se añadieron 15 µg de TioEPO producido según el ejemplo 5 (1 µg/µl en tampón fosfato), y se incubó la mezcla durante 16 h a 25°C. Después de liofilización, se analizó el producto en bruto mediante SDS-PAGE con geles de Bis-Tris al 10% de NuPAGE/tampón MOPS (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) tal como se describe en las instrucciones facilitadas por Invitrogen. Se tiñe el gel con reactivo de tinción Roti-azul de Coomassie (Roth, Karlsruhe, A) durante la noche.

Se muestra el resultado experimental en la figura 4. Una conjugación satisfactoria está indicada por la migración de la banda de proteína a mayores pesos moleculares. El aumento del ancho de banda se debe a la distribución de peso molecular de los derivados de HES usados y el número de derivados de HES unidos a la proteína.

Ejemplo 7 Producción preparativa de conjugados de HES-EPO

Resumen

Se sintetizaron conjugados de HES-EPO mediante acoplamiento de derivados de HES (mw promedio de 18.000 Dalton; grado de sustitución con hidroxietilo de 0,4) a los residuos ácido siálico parcialmente oxidados (con perodato de forma suave) en las cadenas de oligosacárido de la EPO recombinante humana. Basándose en el análisis estructural de hidratos de carbono, las modificaciones introducidas no afectaron a la integridad estructural de las cadenas de oligosacárido centrales puesto que la MALDI/TOF-EM de los glicanos modificados con HES tratados con ácido suave revelaron cadenas de tipo N-acetil-lactosamina neutras intactas que eran indistinguibles de las observadas en un producto de EPO no modificada. Los resultados obtenidos indican que al menos 3 residuos de HES modificados se unen por molécula de EPO en el caso de la preparación de EPO que se sometió a modificación sin eliminación parcial previa de ácido siálico. Una variante de EPO que carece de aproximadamente el 50% de los residuos ácido siálico de la proteína anterior mostró una movilidad en peso molecular aparente similar en SDS-PAGE (60-110 KDa frente a 40 KDa para el patrón de EPO BRP). La EPO modificada con HES es estable en condiciones de cromatografía de intercambio iónico a temperatura ambiente a pH 3-10.

El bioensayo de EPO en el sistema de ratón normocitémico indica que la EPO modificada con HES tiene una actividad específica (U.I./mg) 2,5-3,0 veces mayor en este ensayo en comparación con el patrón de referencia de EPO BRP internacional basado en la determinación de proteínas usando el valor de absorción UV de la Farmacopea

Europea y un método de determinación de proteínas de EPO mediante RP-HPLC calibrado frente a la preparación de patrón de EPO BRP.

#### Ejemplo 7.1 Materiales y métodos

##### (a) Liberación de oligosacáridos unidos a N mediante digestión con N-glicosidasa

Se incubaron muestras con 25 unidades (según la especificación del fabricante, Roche Diagnostics, Alemania) de PNGasa F recombinante durante la noche a 37°C. Se monitorizó la digestión completa mediante el desplazamiento específico de movilidad de la proteína en SDS-PAGE. Se separaron los N-glicanos liberados del polipéptido mediante la adición de 3 volúmenes de etanol al 100% frío e incubación a -20°C durante al menos 2 horas (Schroeter S *et al.*, 1999). Se retiró la proteína precipitada mediante centrifugación durante 10 minutos a 4°C a 13.000 rpm. Entonces se sometió el sedimento a dos lavados adicionales con 500 µl de etanol al 75% enfriado con hielo. Se secaron los oligosacáridos en los sobrenadantes reunidos en una centrífuga de vacío (concentrador Speed Vac, Savant Instruments Inc., EE.UU.). Se desalaron las muestras de glicano usando cartuchos Hypercarb (25 mg o 100 mg de HyperCarb) tal como sigue antes de su uso: se lavaron las columnas con 3 x 500 µl de acetonitrilo al 80% (v/v) en TFA al 0,1% seguido por lavados con 3 x 500 µl de agua. Se diluyeron las muestras con agua hasta un volumen final de 300 µl - 600 µl antes de la carga sobre el cartucho que entonces se lavó rigurosamente con agua. Se eluyeron los oligosacáridos con 1,2 ml (cartuchos de 25 mg; 1,8 ml en el caso de cartuchos de 100 mg) acetonitrilo al 25% en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). Se neutralizaron los oligosacáridos eluidos con NH<sub>4</sub>OH 2 M y se secaron en un concentrador Speed Vac. En algunos casos, se realizó la desalación de oligosacáridos liberados de N-glicosidasa mediante adsorción de la mezcla de digestión de muestras < 100 µg de (glico)proteína total sobre cartuchos Hypercarb de 100 mg.

##### (b) Análisis de oligosacáridos mediante desorción/ionización láser asistida por matriz/ espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI/TOF/TOF-EM)

Se usó un instrumento de tiempo de vuelo (TOF/TOF) ULTRAFLEX de Bruker: se analizaron oligosacáridos desialilados nativos usando ácido 2,5-dihidroxibenzoico como material absorbente de UV en el modo iónico positivo así como en el negativo usando el reflectrón en ambos casos. Para análisis mediante EM-EM, se sometieron iones originales seleccionados a disociación inducida por láser (LID) y se separaron los iones fragmento resultantes mediante la segunda etapa de TOF (LIFT) del instrumento. Se mezclaron disoluciones de muestra de 1 µl y una concentración aproximada de 1-10 pmol·µl<sup>-1</sup> con cantidades iguales de la matriz respectiva. Se aplicó esta mezcla sobre una diana de acero inoxidable y se secó a temperatura ambiente antes del análisis.

#### Ejemplo 7.2 Preparación y caracterización de EPO recombinante humana (EPO-GT-1)

Se expresó EPO a partir de células CHO recombinantes tal como se describe (Mueller PP *et al.*, 1999, Domer AJ *et al.*, 1984) y se caracterizaron las preparaciones según métodos descritos en la Farm. Eur. (Farm. Eur. 4, Monografía 01/ 2002:1316: disolución concentrada de eritropoyetina). El producto final tenía un contenido en ácido siálico de 12 nMol (+/- 1,5 nMol) por nMol de proteína. Se determinaron las estructuras de oligosacáridos unidos a N mediante HPAEC-PAD y mediante MALDI/TOF-EM tal como se describe (Nimtz *et al.*, 1999, Grabenhorst, 1999). Las preparaciones de EPO que se obtuvieron contenían oligosacáridos di, tri y tetrasialilados (el 2-12%, 15-28% y 60-80%, respectivamente, estaban presentes cadenas sulfatadas y pentasialiladas en pequeñas cantidades). Las características de glicosilación global de las preparaciones de EPO fueron similares a la de la preparación de patrón de EPO BRP internacional.

El patrón de isoelectroenfoco de la EPO recombinante era comparable al de preparación de patrón de EPO de referencia BRP internacional que mostraba las isoformas correspondientes. El 25% de la proteína EPO carecía de O-glicosilación en Ser<sub>126</sub> de la cadena del polipéptido.

#### Ejemplo 7.3 Preparación de formas de EPO parcialmente sialiladas

Se calentó la proteína EPO GT-1 (2,84 mg/ml) hasta 80°C en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 7,0 y luego se añadieron 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N por 1 ml de la disolución de EPO; se continuó con la incubación durante 5 min., 10 min. y 60 min., respectivamente, produciendo preparaciones de EPO de diferente grado de sialilación. Se realizó la cuantificación de oligosacáridos con 0-4 ácidos siálicos después de la liberación de oligosacáridos con polipéptido N-glicosidasa y el aislamiento de cadenas unidas a N, mediante desalación usando cartuchos Hypercarb (25 mg de HyperSep Hypercarb; ThermoHypersil-Keystone, R.U.). Se neutralizaron las preparaciones de EPO mediante la adición de NaOH 1 N y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

#### Ejemplo 7.4 Oxidación con peryodato de formas sialiladas de EPO

A 10 mg de EPO no tratada o tratada con ácido suave disuelta en 3,5 ml de tampón fosfato de Na 20 mM, pH 7,0 se añadieron 1,5 ml de tampón acetato de Na 0,1 M, pH 5,5 y se enfrió la mezcla hasta 0°C en un baño de hielo; se



añadieron 500 µl de peryodato de Na 10 mM y se mantuvo la mezcla de reacción en la oscuridad durante 60 min. a 0°C. Entonces, se añadieron 10 µl de glicerol y se continuó con la incubación durante 10 min. adicionales en la oscuridad. Se separaron las formas de EPO parcialmente oxidadas de los reactivos mediante desalación usando concentradores VIVASPIN (MWCO de 10.000, PES Vivascience AG, Hannover, Alemania) según la recomendación del fabricante a 3.000 rpm en una centrifuga de laboratorio equipada con un rotor de ángulo fijo. Después de la congelación en nitrógeno líquido, se almacenaron las preparaciones de EPO en un volumen final de 4 ml a -20°C.

Se sometieron alícuotas de 100 µg de la preparación de EPO parcialmente oxidada a tratamiento con N-glicosidasa y se aislaron los oligosacáridos usando cartuchos Hypercarb tal como se describió. Se desialilaron los oligosacáridos mediante tratamiento con ácido suave y se analizaron mediante HPAEC-PAD y se compararon sus tiempos de retención con los de oligosacáridos auténticos convencionales tal como se describe (Nimtz *et al.*, 1990 y 1993).

#### Ejemplo 7.5 Reducción de disulfuros de EPO con ditioeritritol

Se incubaron 5 mg de EPO-GT-1 en 5 ml de tampón Tris 0,1 M/HCl, pH 8,1 en presencia de ditioeritritol (DTT) 30 mM a 37°C durante 60 minutos; se logró la eliminación de DTT usando un concentrador Vivaspin a 4°C, 4 ciclos de intercambio de tampón. Se congeló la preparación de EPO reducida final en nitrógeno líquido y se almacenó a -20°C en tampón acetato de Na 50 mM, pH 5,5.

#### Ejemplo 7.6 Determinación de la proteína EPO

Se realizó la determinación cuantitativa de la proteína EPO midiendo la absorción UV a 280 nm según la Farm. Eur. (Farmacopea Europea 4, Monografía 01/2002: 1316: disolución concentrada de eritropoyetina) en una cubeta con un camino óptico de 1 cm. Además, se cuantificó la EPO aplicando un método de RP-HPLC usando una columna RP-C4 (Vydac Protein C4, n.º de cat. 214TP5410, Grace Vydac, Ca, EE.UU.); se calibró el método de HPLC usando el patrón de referencia de eritropoyetina BRP 1 (Farmacopea Europea, Conseil de l'Europe B.P. 907-F67029, Estrasburgo Cedex 1).

#### Ejemplo 7.7 Oxidación de EPO desialilada con galactosa oxidasa

Se incubaron 4,485 mg de EPO completamente desialilada en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8 en presencia de 16 µl de catalasa (6214 unidades/200 ml) y 80 µl de galactosa oxidasa (2250 unidades/ml de *Dactylium dendroides* (Sigma-Aldrich, Stein-heim, Alemania); la incubación a 37°C fue durante la noche; se añadieron 2 veces 20 µl de galactosa oxidasa después de 4 horas y después de 8 horas después del inicio de la incubación.

#### Ejemplo 7.8 Preparación de muestras de EPO para bioensayos

##### *Purificación de EPO a partir de incubaciones de preparaciones de proteína EPO oxidada con peryodato o galactosa oxidasa con HES activado*

Se llevó a cabo la purificación de muestras de EPO (eliminación de derivados de HES sin reaccionar) a temperatura ambiente. Se diluyeron las mezclas de incubación de EPO (aproximadamente 5 mg de proteína EPO) 1:10 con tampón A (ácido N-morfolinopropanosulfónico 20 mM [MOPS/NaOH] en H<sub>2</sub>O bidest., pH 8,0) y se aplicaron a una columna que contenía 3 ml de Q-Sepharose HP (n.º de código de Pharmacia 17-1014-03, n.º de lote 220211) equilibrada con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón A usando una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se lavó la columna con 6-8 VC de tampón A (velocidad de flujo = 0,8 ml/min) y se realizó la elución usando tampón B (ácido N-morfolinoetanosulfónico 20 mM [MES/NaOH], NaCl 0,5 M en H<sub>2</sub>O bidest., pH 6,5) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se detectó la EPO mediante absorción UV a 280 nm y se eluyó en aproximadamente 6 ml. Se regeneró la columna usando 3 VC de tampón C (MES 20 mM, NaCl 1,5 M en H<sub>2</sub>O ajustado a pH 6,5) y se reequilibró usando 10 VC de tampón A (velocidad de flujo = 0,7 ml/min).

Se realizó el intercambio de tampón de eluatos de EPO obtenidos a partir de la etapa con Q-Sepharose usando concentradores Vivaspin y solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 3 ciclos de centrifugación cada uno por muestra; se ajustaron las muestras a 2 ml con PBS y se almacenaron a -20°C.

Sólo se obtuvo <25% de las formas de EPO parcialmente desialiladas y posteriormente oxidadas con peryodato de forma suave que se sometieron a la modificación con HES a partir del eluato de Q-Sepharose puesto que en las condiciones empleadas, las formas básicas de EPO no se unieron a Q-Sepharose y se encontraron en la fracción retenida junto con los derivados de HES sin reaccionar.

#### Ejemplo 7.9 Cromatografía de intercambio aniónico a pH alto con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

Se analizaron oligosacáridos nativos purificados y desialilados mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH alto (HPAE) usando un sistema BioLC de Dionex (Dionex, EE.UU.) equipado con una columna CarboPac PA1 (0,4 x 25 cm) en combinación con un detector amperométrico pulsado (PAD) (Schróter *et al.*, 1999; Nimtz *et al.*, 1999). Los

potenciales del detector (E) y las duraciones de pulso (T) fueron de: E1: +50 mV, T1: 480 ms; E2: +500 mV, T2: 120 ms; E3: -500 mV, T3: 60 ms, y el intervalo de salida fue de 500-1500 nA. Entonces se inyectaron los oligosacáridos sobre la columna CarboPac PA1 que se equilibró con el 100% de disolvente A. Para los oligosacáridos desialilados, se realizó la elución (velocidad de flujo: 1 ml·min<sup>-1</sup>) aplicando un gradiente lineal (0-20%) de disolvente B a lo largo de un periodo de 40 min. seguido por un aumento lineal de desde el 20-100% de disolvente B a lo largo de 5 min. El disolvente A era NaOH 0,2 M en H<sub>2</sub>O bidestilada, el disolvente B consistía en NaOAc 0,6 M en disolvente A. Para los oligosacáridos nativos, se equilibró la columna con el 100% de disolvente C (NaOH 0,1 M en H<sub>2</sub>O bidestilada) y se realizó la elución (velocidad de flujo: 1 ml·min<sup>-1</sup>) aplicando un gradiente lineal (0-35%) de disolvente D a lo largo de un periodo de 48 min. seguido por un aumento lineal de desde el 35-100% de disolvente D a lo largo de 10 min. El disolvente D consistía en NaAc 0,6 M en disolvente C.

Ejemplo 7.10 Análisis composicional de monosacáridos de N-glicanos, N-glicanos modificados con HES y proteína EPO mediante CG-EM

Se analizaron los monosacáridos como los metilglicósidos correspondientes después de metanólisis, N-reacetilación y trimetilsililación mediante CG/EM [Chaplin, M.F. (1982) A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate. *Anal. Biochem.* 123, 336-341]. Se realizaron los análisis en un espectrómetro de masas con trampa iónica GCQ de Finnigan (Finnigan MAT corp., San Jose, CA) funcionando en el modo de EI iónica positiva equipado con una columna capilar DB5 de 30 m. Programa de temperatura: isoterma de 2 min. a 80°C, luego 10 grados·min<sup>-1</sup> hasta 300°C.

Se identificaron los monosacáridos por su tiempo de retención y patrón de fragmentación característico. Se usaron los resultados no corregidos de la integración electrónica de picos para la cuantificación. Se cuantificaron los monosacáridos que produjeron más de un pico debido a anomericidad y/o la presencia de formas furanoides y piranoides, sumando todos los picos principales. Se usaron 0,5 µg de mio-inositol como compuesto patrón interno.

Ejemplo 7.11 Resultados

Ejemplo 7.11(a) Caracterización de N-glicanos de EPO-GT-1 tratada con ácido suave (parcialmente desialida)

Se analizaron mediante SDS-PAGE preparaciones de EPO-GT-1 sometidas a tratamiento con ácido suave durante 5, 10 o 60 min., antes y después de la liberación de oligosacáridos unidos a N mediante incubación con N-glicosidasa tal como se muestra en la figura 5. Se sometieron los oligosacáridos unidos a N a mapeo de oligosacáridos mediante HPAEC-PAD (figura 6). La EPO-GT-1 no tratada contenía >90% de oligosacáridos unidos a N con 3 ó 4 residuos ácido siálico mientras que después de 5 min. de incubación en presencia de ácido suave <40% de cadenas de hidrato de carbono tenían 3 ó 4 residuos ácido siálico. La HPAEC-PAD de los N-glicanos desialilados reveló que la razón de los oligosacáridos neutros que se detectaron para la EPO-GT-1 no tratada y permaneció estable en las preparaciones sometidas a tratamiento con ácido durante 5, 10 o 60 min. La MALDI/TOF-EM de los glicanos desialilados reveló que <90% de la fucosa proximal estaba presente después de tratamiento con ácido suave de la proteína.

Ejemplo 7.11(b) Caracterización de EPO-GT-1 tratada con peryodato

En la figura 8, se compara la movilidad en SDS-PAGE de formas de EPO tratadas con peryodato de forma suave que se sometieron previamente a un tratamiento de 5 y 10 minutos con ácido o que no se trataron. Las condiciones usadas para la oxidación con peryodato de ácidos siálicos no cambiaron el patrón de SDS-PAGE de las preparaciones de EPO (compárese con la figura 5). La oxidación de ácidos siálicos dio como resultado un desplazamiento de los oligosacáridos en el análisis mediante HPAEC-PAD a tiempos de elución más tempranos (compárese con las figuras 6 y 9).

Ejemplo 7.11(c) Caracterización de EPO modificada con derivados de HES

(aa) Transcurso temporal de la modificación con HES de EPO-GT-1-A con derivado de HES modificado con hidroxilamina X, producido según el ejemplo 2.4

Se añadieron 400 µg de derivado de HES modificado con hidroxilamina X a 20 µg de EPO-GT-1-A (EPO oxidada con peryodato de forma suave, no hidrolizada con ácido antes de la oxidación suave con peryodato) en 20 µl de tampón NaOAc 0,5 M, pH 5,5 y se detuvo la reacción después de 30 min., 2, 4, y 17 horas, respectivamente, congelando las muestras en nitrógeno líquido. Posteriormente, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su análisis posterior.

Se añadió tampón de muestra para SDS-PAGE y se calentaron las muestras hasta 90°C y se aplicaron sobre geles de SDS. Tal como se muestra en la figura 10, tiempos de incubación crecientes dieron como resultado un aumento del desplazamiento hacia mayor peso molecular de la proteína. Después de 17 horas de incubación en presencia del derivado de HES modificado con hidroxilamina X, se detectó una banda de proteína teñida con Coomassie difusa que migra en un área entre 60 y 11 kDa, basándose en la posición de patrones de peso molecular (véase la parte

izquierda de la figura 10). Tras el tratamiento con N-glicosidasa, la mayor parte de la proteína se desplazó hacia la posición de EPO des-N-glicosilada (véase la figura 10, gel a la derecha; la flecha A indica la posición de migración de N-glicosidasa, la flecha B indica la posición de migración de EPO des-N-glicosilada; la banda de proteína difusa visible en la región entre los patrones de peso molecular de 28 KDa y 36 KDa representa presumiblemente formas de EPO que se modifican mediante HES y el sitio de O-glicosilación de la molécula. En vista de la especificidad de la N-glicosidasa, se concluye a partir de este resultado que, de hecho, la modificación con HES se produce en los residuos ácido siálico oxidados con peryodato de glicanos de la proteína EPO.

(bb) Caracterización de conjugados de HES-EPO

Se sintetizaron conjugados de HES-EPO I (que se originan a partir de EPO-GT-1 después de oxidación suave con peryodato, es decir a partir de EPO-GT-1-A), II (que resulta de EPO-GT-1 sometida a 5 min. de hidrólisis ácida y oxidación suave con peryodato), III (que resulta de EPO-GT-1 sometida a 10 min. de hidrólisis ácida y oxidación suave con peryodato) tal como se describió anteriormente. Se incluyó una incubación de control (K) que contenía EPO-GT-1 no modificada en las mismas condiciones tamponantes a la que se añadió una cantidad equivalente de HES no modificado. Se sometieron las mezclas de incubación a purificación adicional para el análisis bioquímico posterior de los derivados de HES-EPO.

Se sometieron las incubaciones de conjugados de HES-EPO I, II y III así como la incubación de control K a una etapa de purificación con Q-Sepharose tal como se describe en "Materiales y Métodos" (ejemplo 7.8) para eliminar el exceso de reactivo de HES sin reaccionar que se esperaba en la fracción retenida de la columna de intercambio iónico. Debido a las grandes cantidades de formas básicas de EPO contenidas en las muestras tratadas previamente con ácido II y III, se esperaban cantidades considerables de producto de EPO modificado a partir de estas incubaciones en la fracción retenida. Tal como se muestra en la figura 11, casi todo el material de EPO de las muestras I quedó retenido por la columna de Q-Sepharose mientras que sólo se recuperó aproximadamente el 20-30% de las muestras III y II en la fracción que se eluyó con alta concentración salina. Todo el material proteico procedente de las incubaciones con el derivado de HES X, tanto en la fracción retenida como en las fracciones que se eluyeron con alto contenido en sal, tenían un peso molecular aparente mayor en SDS-PAGE en comparación con la EPO de control.

Para caracterizar en más detalle la muestra de EPO modificada con HES A y K (véase la figura 11) se compararon con la forma oxidada con peryodato EPO-GT-1-A. Se sometieron las muestras a tratamiento con N-glicosidasa y tal como se representa en las figuras 12a y 12b, la liberación de los N-glicanos dio como resultado las dos bandas de bajo peso molecular en la posición de las formas de EPO O-glicosiladas y no glicosiladas de la preparación de patrón de EPO. En el caso de la muestra A, se detectó una banda adicional que migra en la posición del patrón de mw de 28 KDa, lo que sugiere la modificación con HES en el O-glicano de esta variante de EPO (véase el ejemplo 7.11(c)(aa)). Esta banda (y también la forma de alto mw fuertemente modificada con HES de EPO N-glicosilada, véanse las figuras 12a y 12b) desapareció después de someter las muestras a hidrólisis suave, lo que concuerda con la opinión de que se logró la modificación con HES en los residuos ácido siálico oxidados con peryodato de eritropoyetina.

Se hidrolizaron alícuotas de las mezclas de incubación con N-glicosidasa usando condiciones que permitían la eliminación completa de los residuos ácidos siálicos (y también el derivado de HES unido a ácido siálico) de los oligosacáridos; después de neutralización, entonces se absorbieron las mezclas sobre pequeñas columnas Hypercarb para su desalación. Se lavaron las columnas rigurosamente con agua seguido por la elución de los oligosacáridos neutros unidos con acetonitrilo al 40% en H<sub>2</sub>O que contenía el 0,1% de ácido trifluoroacético. Se sometieron los oligosacáridos resultantes a MALDI/TOF-EM. Los espectros de las fracciones de oligosacáridos desialilados de la muestra A, EPO-GT-1-A y la muestra K mostraron masas idénticas para los oligosacáridos de tipo complejo a m/z = 1810 Da (diantenarico), 2175 = triantenarico, 2540 = tetraantenarico, 2906 = tetraantenarico más 1 repetición de N-acetil-lactosamina y 3271 = tetraantenarico más 2 repeticiones de N-acetil-lactosamina; se detectaron señales pequeñas correspondientes a la falta de fucosa (-146) y galactosa (-162) que pueden atribuirse a las condiciones de hidrólisis ácida aplicadas para la eliminación de ácido siálico (véase MALDI-figuras 15, 16 y 17).

En un experimento paralelo, se absorbió la mezcla de digestión con N-glicosidasa sobre cartucho RP-C18 de 1 ml (sin hidrólisis ácida previa de los oligosacáridos) y se realizó la elución con acetonitrilo al 5% en agua que contenía el 0,1% de TFA; en estas condiciones, la proteína EPO quedó completamente retenida sobre el material de RP y se eliminaron por lavado los oligosacáridos de la columna con acetonitrilo al 5% en H<sub>2</sub>O que contenía el 0,1% de TFA. Se eluyó la proteína EPO des-N-glicosilada con acetonitrilo al 70% en H<sub>2</sub>O que contenía el 0,1% de TFA. Se neutralizaron las fracciones de oligosacárido de la etapa con RP-C18 de la muestra tratada con N-glicosidasa A, EPO GT-1-A y la muestra K y se sometieron a desalación usando cartuchos Hypercarb tal como se describió anteriormente. Se sometieron los oligosacáridos aislados a mapeo mediante HPAEC-PAD antes (véanse las figuras 13) y después de tratamiento con ácido suave en condiciones que permitieron la eliminación cuantitativa de los ácidos siálicos de glicanos (véanse las figuras 14).

El perfil de HPAEC-PAD para el material nativo obtenido a partir de la muestra modificada con HES A sólo mostró señales insignificantes para los oligosacáridos mientras que los oligosacáridos derivados de EPO GT-1-A mostraron

el mismo perfil de glicanos que el mostrado en la figura 9 (muestra denominada EPO-GT-1 después de tratamiento suave con peryodato). El perfil de elución de los oligosacáridos obtenido a partir de la muestra de EPO de control (K) produjo el patrón esperado (compárese con el perfil en la figura 6). Para su comparación, se incluye el perfil de oligosacáridos nativos del patrón de EPO BRP internacional para comparación y como patrón de referencia.

Después de hidrólisis ácida suave, todas las preparaciones de oligosacáridos mostraron un perfil de elución idéntico de estructuras de oligosacáridos neutros (véanse las figuras 14) con la composición cualitativa y cuantitativa esperada de las cadenas de hidrato de carbono de tipo complejo di, tri y tetraantenario tal como se describe en la sección de métodos para la preparación de EPO que se usó como material de partida en el presente estudio. Este resultado demuestra que la modificación con HES de la muestra de EPO da como resultado una unión covalente del derivado de HES que se escinde de la proteína EPO por N-glicosidasa y es lábil en medio ácido puesto que se elimina de los N-glicanos usando condiciones suaves de tratamiento con ácido conocidas para desialilar hidratos de carbono (véanse las figuras 12a+b).

(cc) Análisis composicional de monosacáridos de HES-EPO y N-glicanos de HES-EPO mediante CG-EM

Para confirmar adicionalmente la modificación con HES de EPO en los N-glicanos de la molécula, se digirieron muestras de EPO con N-glicosidasa y se adsorbió la proteína EPO sobre cartuchos RP-C18 mientras que se eliminó por lavado el material de oligosacárido tal como se describió anteriormente. Tal como se muestra en la tabla 2, se detectaron derivados de glucosa y glucosa hidroxietilada sólo en la proteína EPO que se sometió a la modificación con HES en residuos cisteína y en fracciones de oligosacáridos de la muestra de EPO A2.

Ejemplo 7.11(d) En sayo *in vivo* de la actividad biológica de EPO modificada con HES

Se realizó el bioensayo de EPO en el sistema de ratón normocitémico indicado según los procedimientos descritos en la Farmacopea Europea; el laboratorio que llevó a cabo el ensayo de la EPO estaba usando la preparación de patrón de referencia de EPO BRP internacional. Para la preparación de EPO modificada con HES A2, se determinó un valor medio para la actividad específica de 294.600 unidades por mg de EPO de proteína, lo que indica una actividad específica aproximadamente 3 veces mayor en comparación con la preparación de patrón de referencia de EPO BRP internacional que se incluyó en las muestras enviadas para los ensayos de actividad.

Los resultados del estudio se resumen en la tabla 3.

**Bibliografía:**

Nimtz M, Noll G, Paques EP, Conradt HS. Carbohydrate structures of a human tissue plasminogen activator expressed in recombinant Chinese hamster ovary cells. FEBS Lett. 1 de oct. de 1990; 271(1-2):14-8

Domer AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucoseregulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem. 5 de dic. de 1989; 264(34):20602-7

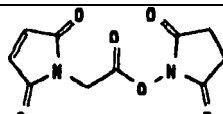
Mueller PP, Schlenke P, Nimtz M, Conradt HS, Hauser H Recombinant glycoprotein quality in proliferation-controlled BHK-21 cells. Biotechnol Bioeng. 5 de dic. de 1999; 65(5):529-36

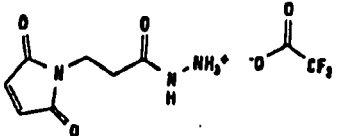
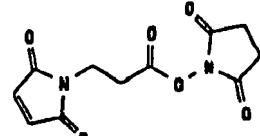
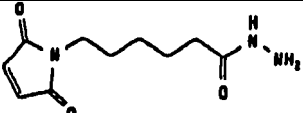
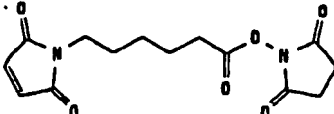
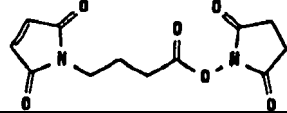
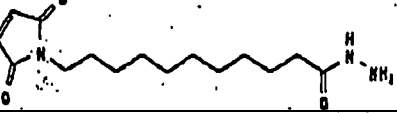
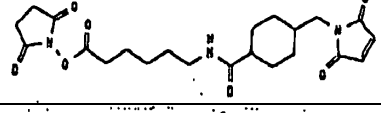
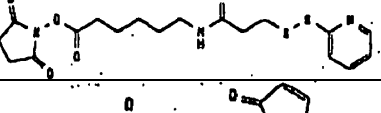
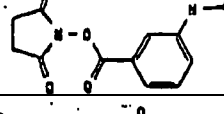
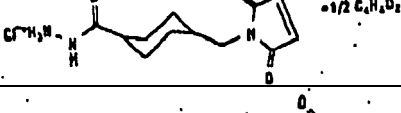
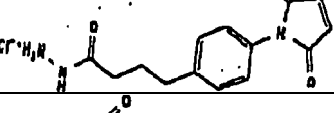
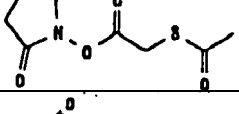
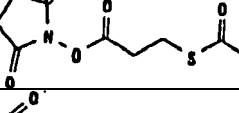
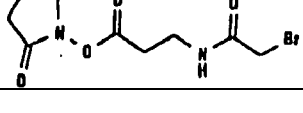
Nimtz M, Martin W, Wray V, Kloppel KD, Augustin J, Conradt HS. Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. Eur J Biochem. 1 de abr. de 1993; 213(1):39-56

Hermentin P, Witzel R, Vliegenthart JF, Kamerling JP, Nimtz M, Conradt HS. A strategy for the mapping of N-glycans by high-ph anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Anal Biochem. jun. de 1992; 203(2): 281-9

Schroter S, Derr P, Conradt HS, Nimtz M, Hale G, Kirchhoff C. Male specific modification of human CD52. J Biol Chem. 15 de oct. de 1999;274(42):29862-73

Tabla 1

Abreviatura	Nombre químico	Tipo	
AMAS	Éster de N-(a-maleimidoacetoxi)succinimida	E	

BMPH	Hidrazida de N-(ácido β-maleimidopropiónico) TFA	A	
BMPS	Éster de N-(β-maleimidopropiloxi)succinimida	E	
EMCH	Hidrazida de N-(ácido ε-maleimidocaproico)	A	
EMCS	Éster de N-(ε-maleimidocaproiloxi)succinimida	E	
GMBS	Éster de N-γ-maleimidobutiriloxi-succinimida	E	
KMUH	Hidrazida de N-(ácido κ-maleimidoundecanoico)	A	
LC-SMCC	4-(N-Maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-(6-amido-caproato) de succinimidilo	E	
LC-SPDP	6-(3'-[2-Piridil-ditio]propionamido)hexanoato de succinimidilo	F	
MBS	Éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida	E	
M <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H	4-(N-Maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxil-hidrazida · HCl · 1/2 dioxano	A	
MPBH	Hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico · HCl	A	
SATA	S-Acetiltio-acetato de N-succinimidilo	H	
SATP	S-Acetiltio-propionato de N-succinimidilo	H	
SBAP	3-(Bromoacetamido) propionato de succinimidilo	D	

SIA	Yodoacetato de N-succinimidilo	C	
SIAB	(4-Yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo	C	
SMCC	4-(N-Maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo	E	
SMPB	4-(p-Maleimidofenil)butirato de succinimidilo	E	
SMPH	6-(β-Maleimidopropionamido)hexanoato de succinimidilo	E	
SMPT	4-Succinimidiloxi-carbonil-metil-α-(2-piridilditio)tolueno	F	
SPDP	3-(2-Piridilditio)propionato de N-succinimidilo	F	
Sulfo-EMCS	Éster de N-(ε-maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida	E	
Sulfo-GMBS	Éster de N-γ-maleimidobutiriloxi-sulfosuccinimida	E	
Sulfo-KMUS	Éster de N-(κ-maleimidoundecanoiloxi)-sulfosuccinimida	E	
Sulfo-LC-SPDP	6-(3'-[2-piridil-ditio]propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo	F	
Sulfo-MBS	Éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida	E	
Sulfo-SIAB	(4-Yodoacetil)aminobenzoato de sulfosuccinimidil	C	
Sulfo-SMCC	4-(N-Maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo	E	

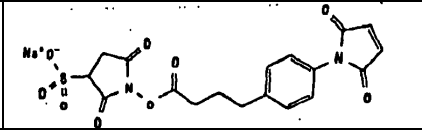
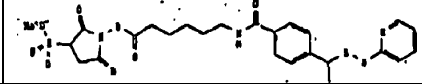
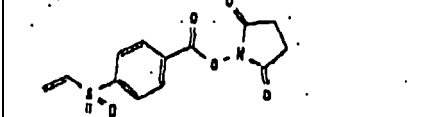
Sulfo-SMPB	4-(p-Maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo	E	
Sulfo-LC-SMPT	6-(α-Metil-α-[2-piridildio]-toluamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo	F	
SVSB N	(4-Vinilsulfonil)benzoato de succinimidilo	G	

Table 2 Análisis composicional de monosacáridos de glicanos de muestras de EPO modificada con HES y de control

**Monosacárido	I. Glicanos de A2	II. Glicanos de EPO-GT-1A	III. Glicanos de K2	III. Glicanos de A2	IV. Glicanos de EPO-GT-1A	V. Glicanos de K2	VI. proteína EPO modificada con cisteína *
fucosa	1.935	3.924	2.602	2.246	4.461	2.601	2.181
manosa	6.028	11.020	9.198	6.379	11.668	6.117	6.260
galactosa	8.886	19.935	14.427	10.570	16.911	11.555	10.386
glucosa	17.968	---	---	21.193	traza	traza	33.021
GlcNAc	7.839	21.310	14.440	11.360	15.953	10.503	10.498
GlcHe1	5.583	---	---	5.926	---	---	14.857
GlcHe2	1.380	---	---	1.552	---	---	3.775
NeuNAc	5.461	822	4.504	3.895	4.871	13.562	13.003
inositol	1.230	2.310	1.620	2.050	1.320	1.134	1.087

\* el equivalente de proteína EPO modificada con Cys-HES se sometió a análisis composicional; se aisló la proteína EPO de la mezcla de incubación con HES mediante cromatografía en una columna de Q-Sepharose tal como se describió anteriormente y se desaló mediante centrifugación usando un dispositivo de separación Vivaspin 5.

\*\* se realizaron las determinaciones de monosacáridos a partir de ejecuciones individuales de CG de los metilglicósidos pertrimetilsililados; se facilitan los valores de integración electrónica de los picos sin corrección para las pérdidas durante el procedimiento de derivatización y las recuperaciones de cada compuesto.

5

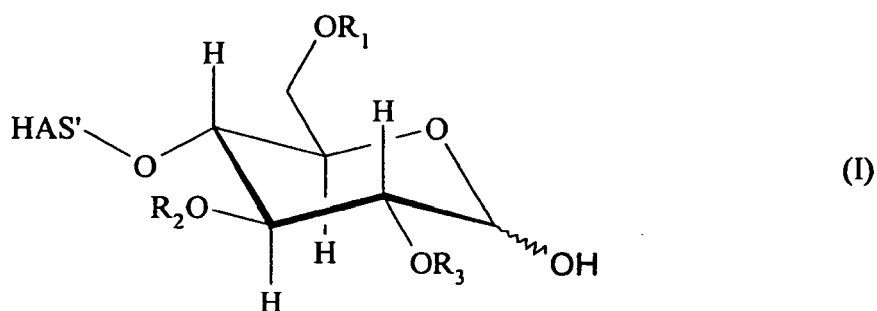
Tabla 3

N.º de muestra	Descripción de la muestra	Actividad específica calculada de la muestra de EPO (basado en A280 nm y determinación mediante RP-HPLC)
850247	1. EPO modificada con HES A2	344.000 U/mg
850248	2. EPO-GT-1-A	82.268 U/mg
850249	3. EPO de control K2	121.410 U/mg
850250	4. Patrón de EPO BRP	86.702 U/mg
850251	1. diluida con 4 volúmenes de PBS	309.129 U/mg
850252	2. diluida con 4 volúmenes de PBS	94.500 U/mg
850253	3. diluida con 4 volúmenes de PBS	114.100 U/mg
850254	4. diluida con 4 volúmenes de PBS	81.200 U/mg
850255	1. diluida con 4 volúmenes de PBS	230.720 U/mg

A continuación, se enumeran realizaciones adicionales de los métodos y derivados de hidroxialquilalmidón descritos en el presente documento, que resultan de las siguientes realizaciones 1 a 70, incluyendo las combinaciones de estas realizaciones tal como se facilitan de forma explícita:

10

1. Un método de producción de un derivado de hidroxialquilalmidón que comprende hacer reaccionar hidroxialquilalmidón de fórmula (I)

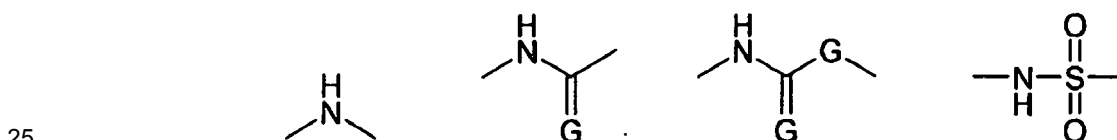


en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción, con un compuesto de fórmula (II)

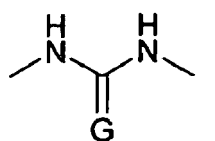


en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado, y en la que o bien  $R'$  o  $R''$  o bien  $R'$  y  $R''$  comprenden al menos un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con al menos otro compuesto antes o después de la reacción de (I) y (II).

- 10 2. Un método de la realización 1, en el que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón.
- 15 3. Un método de la realización 1 ó 2 en el que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo.
- 20 4. Un método de cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que  $R'$  es hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxilo lineal o ramificado.
5. Un método de la realización 4, en el que  $R'$  es hidrógeno o un grupo metilo o uno metoxilo.
6. Un método de cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que aparte del grupo funcional X,  $R''$  comprende al menos un grupo funcional adicional W que se une directamente al grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$ , seleccionándose dicho grupo funcional W del grupo que consiste en

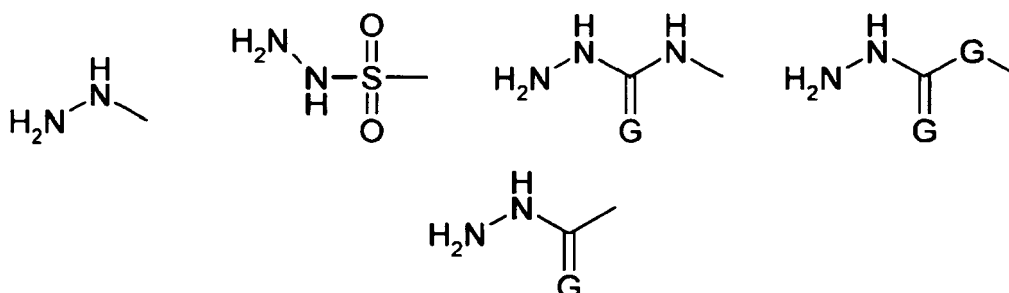


y



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

- 35 7. Un método de la realización 6 en el que, si  $R'$  es H,  $R''$  y el grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  forman, junto con W, uno de los siguientes grupos:





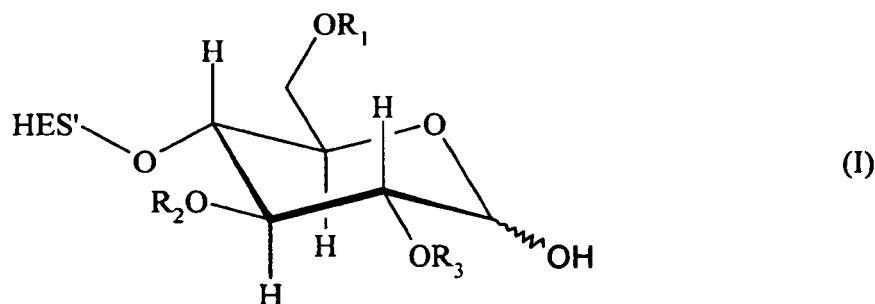
- 5 8. Un método de cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en el que el al menos un grupo funcional X se selecciona del grupo que consiste en -SH, -NH<sub>2</sub>, -O-NH<sub>2</sub>, -NH-O-alkilo, -(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -G-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -NH-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, y -SO<sub>2</sub>-NH-NH<sub>2</sub> en los que G es O o S y, si G está presente dos veces, es independientemente O o S.
9. Un método de cualquiera de las realizaciones 1 a 6 u 8, en el que el compuesto según la fórmula (II) es O-[2-(2-aminooxietoxi)-etil]-hidroxilamina o carbohidrazida.
- 10 10. Un método de cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en el que se hace reaccionar el compuesto (I) con el compuesto (II) que no se hace reaccionar con un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I).
11. Un método de la realización 10, en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo el compuesto (II) una hidroxilamina o una hidrazida, se lleva a cabo a una temperatura de desde 5 hasta 45°C y a un pH en el intervalo de desde 4,5 hasta 6,5 en un medio acuoso.
- 15 12. Un método de la realización 10, en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo dicha reacción una aminación reductora, se lleva a cabo a una temperatura de desde 25 hasta 90°C y a un pH en el intervalo de desde 8 hasta 12 en un medio acuoso.
- 20 13. Un método de cualquiera de las realizaciones 10 a 12, en el que se hace reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) con un compuesto adicional mediante el al menos un grupo funcional X.
14. Un método de la realización 13, en el que se hace reaccionar el al menos un compuesto adicional mediante un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el al menos un compuesto adicional.
- 25 15. Un método de la realización 14, en el que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido.
16. Un método de la realización 15, en el que el polipéptido es eritropoyetina.
- 30 17. Un método de cualquiera de las realizaciones 13 a 16, en el que la reacción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de desde 4 hasta 37°C.
18. Un método de cualquiera de las realizaciones 13 a 17, en el que la reacción se lleva a cabo en un medio acuoso.
- 35 19. Un método de la realización 13, en el que el compuesto adicional es un compuesto de reticulación.
20. Un método de la realización 19, en el que el producto de reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II) con el compuesto de reticulación se hace reaccionar con un segundo compuesto adicional.
- 40 21. Un método de la realización 20, en el que el segundo compuesto adicional es un polipéptido.
22. Un método de la realización 20 o 21, en el que se hace reaccionar el segundo compuesto adicional mediante un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el al menos un compuesto adicional.
- 45 23. Un método de la realización 13, en el que el compuesto adicional es un producto de reacción de un compuesto de reticulación y un segundo compuesto adicional.
24. Un método de la realización 23, en el que el segundo compuesto adicional es un polipéptido.
- 50 25. Un método de cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que se hace reaccionar el compuesto (II) con un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I).
26. Un método de la realización 25, en el que se hace reaccionar el al menos un compuesto adicional mediante un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el al menos un compuesto adicional.
- 55 27. Un método de la realización 25 o 26, en el que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido.
28. Un método de la realización 27, en el que el polipéptido es eritropoyetina.
- 60 29. Un método de cualquiera de las realizaciones 25 a 28, en el que la reacción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de desde 4 hasta 37°C.
30. Un método de cualquiera de las realizaciones 25 a 29, en el que la reacción se lleva a cabo en un medio acuoso.
- 65 31. Un método de la realización 25, en el que el compuesto adicional es un compuesto de reticulación.

32. Un método de la realización 31 en el que se hace reaccionar el compuesto de reticulación con un segundo compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (II).

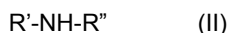
5 33. Un método de la realización 25, en el que el compuesto adicional es un producto de reacción de un compuesto de reticulación y un segundo compuesto adicional.

34. Un método de la realización 33, en el que el segundo compuesto adicional es un polipéptido.

10 35. Un método de producción de un derivado de hidroxietilalmidón que comprende hacer reaccionar hidroxietilalmidón de fórmula (I)



15 en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción, en un medio acuoso con un compuesto de fórmula (II)



20 en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxiethyl, en la que R' es hidrógeno o un grupo metilo o uno metoxilo, y en la que R'' comprende al menos un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con al menos otro compuesto antes o después de la reacción de (I) y (II), seleccionándose dicho grupo funcional X del grupo que consiste en -SH, -NH<sub>2</sub>, -O-NH<sub>2</sub>, -NH-O-alquilo, -(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -G-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -NH-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, y -SO<sub>2</sub>-NH-NH<sub>2</sub> en los que G es O o S y, si G está presente dos veces, es independientemente G o S.

25 36. Un método de la realización 35, en el que el compuesto según la fórmula (II) es O-[2-(2-aminooxiethyl)-ethyl]-hidroxilamina o carbohidrazida.

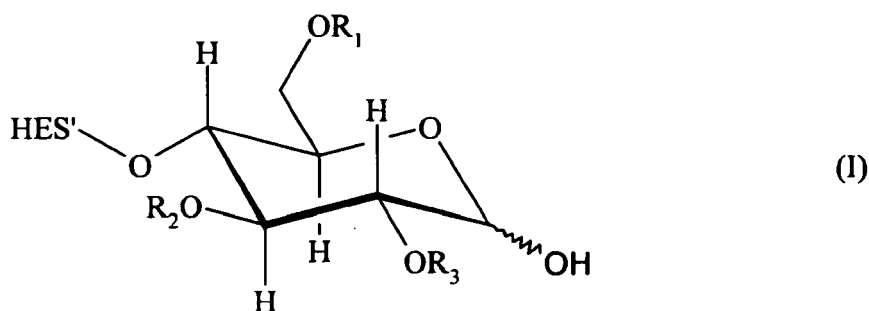
30 37. Un método de la realización 35 ó 36, en el que se hace reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) en un medio acuoso con un polipéptido mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) y un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el polipéptido.

38. Un método de la realización 37, en el que el polipéptido es eritropoyetina.

35 39. Un método de la realización 35, en el que se hace reaccionar el compuesto (II) en un medio acuoso con un polipéptido mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) y un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el polipéptido, y se hace reaccionar el producto de reacción resultante con el compuesto (I).

40 40. Un método de la realización 39, en el que el polipéptido es eritropoyetina.

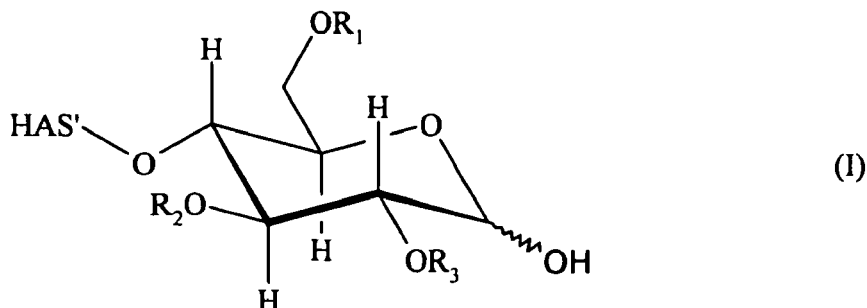
41. Un método de producción de un derivado de hidroxietilalmidón que comprende hacer reaccionar hidroxietilalmidón de fórmula (I)



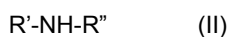
45

en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción, en un medio acuoso con O-[2-(2-aminoxietoxi)etil]-hidroxilamina en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo, y hacer reaccionar el producto de reacción en un medio acuoso con eritropoyetina mediante un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en dicha eritropoyetina.

- 5 42. Un derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método que comprende hacer reaccionar hidroxialquilalmidón (HAS) de fórmula (I)



- 10 en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción, con un compuesto de fórmula (II)



- 15 en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado, y en la que o bien R' o R'' o bien R' y R'' comprenden al menos un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con al menos otro compuesto antes o después de la reacción de (I) y (II).

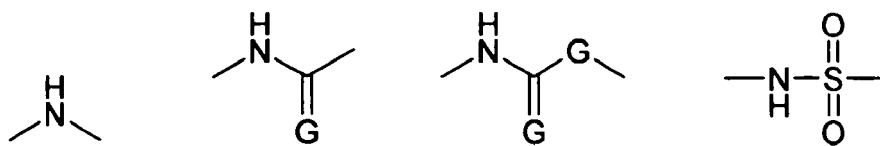
- 20 43. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42, en el que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón.

44. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42 ó 43 en el que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo.

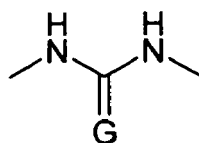
- 25 45. Un derivado de hidroxialquilalmidón de cualquiera de las realizaciones 42 a 44, en el que R' es hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxilo lineal o ramificado.

46. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 45, en el que R' es hidrógeno o un grupo metilo o uno metoxilo.

- 30 47. Un derivado de hidroxialquilalmidón de cualquiera de las realizaciones 42 a 46, en el que aparte del grupo funcional X, R'' comprende al menos un grupo funcional adicional W que se une directamente al grupo NH que forma un puente entre R' y R'', seleccionándose dicho grupo funcional W del grupo que consiste en

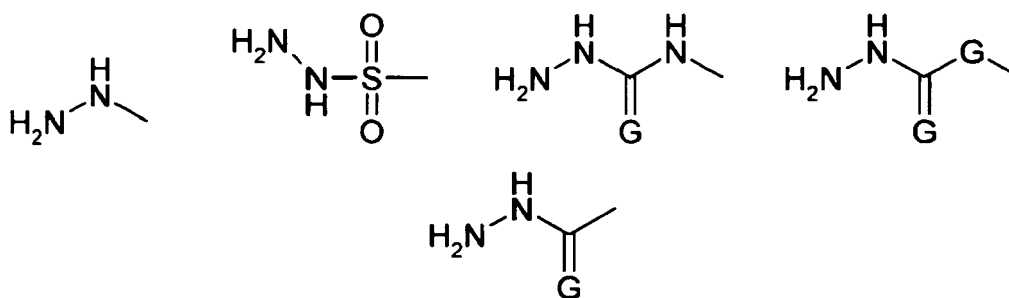


- 35 y



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

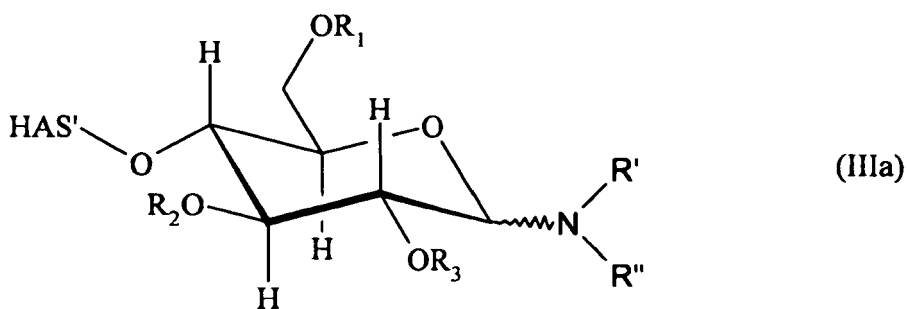
48. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 47, en el que, si R' es H, R' y el grupo NH que forma un puente entre R' y R'' forman, junto con W, uno de los siguientes grupos:



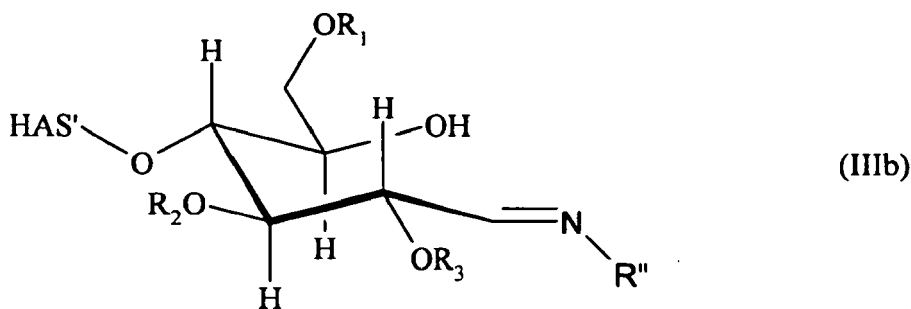
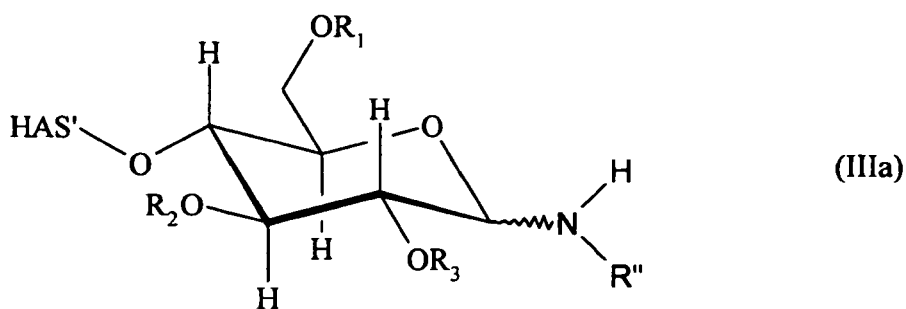
49. Un derivado de hidroxialquilalmidón de cualquiera de las realizaciones 42 a 48, en el que el al menos un grupo funcional X se selecciona del grupo que consiste en -SH, -NH<sub>2</sub>, -O-NH<sub>2</sub>, -NH-O-alquilo, -(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -G-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -NH-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, y -SO<sub>2</sub>-NH-NH<sub>2</sub> en los que G es O o S y, si G está presente dos veces, es independientemente G o S.

50. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42, en el que el compuesto según la fórmula (II) es O-[2-(2-aminooxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina o carbohidrazida.

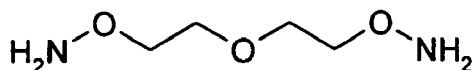
51. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42 en el que dicho derivado tiene una constitución según la fórmula (IIIa)



52. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42, en el que R' es hidrógeno y en el que el derivado es o bien un compuesto de fórmula (IIIa) o bien un compuesto de fórmula (IIIb) o bien una mezcla de los compuestos de fórmulas (IIIa) y (IIIb)



53. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42, en el que se hace reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) con al menos un compuesto adicional o en el que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X con al menos un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I).
54. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 53, en el que se hace reaccionar el al menos un compuesto adicional con el compuesto (II) o con el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) mediante un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el al menos un compuesto adicional.
55. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 54, en el que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido.
56. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 55, en el que el polipéptido es eritropoyetina.
57. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 53, en el que el compuesto adicional es un compuesto de reticulación.
58. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 57, en el que el producto de reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II) con el compuesto de reticulación se hace reaccionar con un segundo compuesto adicional.
59. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 57, en el que el segundo compuesto adicional es un polipéptido.
60. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 58, en el que se hace reaccionar el segundo compuesto adicional mediante un grupo tio o un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el al menos un compuesto adicional.
61. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 53, en el que el compuesto adicional es un producto de reacción de un compuesto de reticulación y un segundo compuesto adicional.
62. Un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 61, en el que el segundo compuesto adicional es un polipéptido.
63. Una composición farmacéutica que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42, en la que se hace reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) con al menos un compuesto adicional o en la que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X con al menos un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I) y en la que el al menos un compuesto adicional es un polipéptido.
64. Una composición farmacéutica de la realización 63, en la que se hace reaccionar el polipéptido con el compuesto (II) o con el producto de reacción del compuesto (I) y el compuesto (II) mediante un resto hidrato de carbono oxidado comprendido en el polipéptido.
65. Una composición farmacéutica de la realización 64, en la que el polipéptido es eritropoyetina.
66. Una composición farmacéutica de la realización 65, en la que se hace reaccionar hidroxietilalmidón en un medio acuoso con un compuesto según la siguiente fórmula



- y se hace reaccionar el producto de reacción con eritropoyetina.
67. Una composición farmacéutica de la realización 66, en la que la eritropoyetina se oxida con peryodato de sodio antes de la reacción.
68. Una composición farmacéutica de la realización 66, en la que la eritropoyetina se desialila y posteriormente se oxida con peryodato de sodio antes de la reacción.
69. Una composición farmacéutica que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, un derivado de hidroxialquilalmidón de la realización 42, en la que se hace reaccionar el producto de reacción del compuesto (I) con el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X comprendido en el compuesto (II) con al menos un

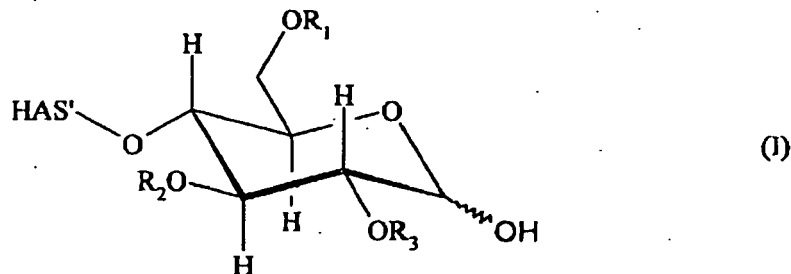
compuesto adicional o en la que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el al menos un grupo funcional X con al menos un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I) y en la que el al menos un compuesto adicional es un compuesto de reticulación y el producto de reacción del producto de reacción de los compuestos (I) y (II) con el compuesto de reticulación se hace reaccionar con un polipéptido.

5

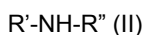
70. Una composición farmacéutica de la realización 69, en la que el polipéptido es eritropoyetina.

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un derivado de hidroxialquilalmidón que comprende hacer reaccionar hidroxialquilalmidón de fórmula (I)



en su extremo reductor que no se oxida antes de dicha reacción, con un compuesto de fórmula (II)



en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo hidroxialquilo lineal o ramificado,

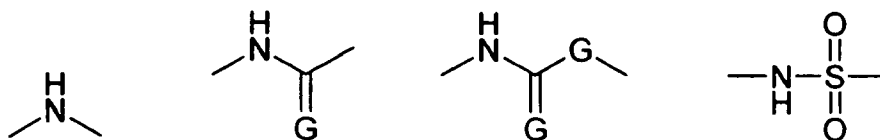
en el que se hace reaccionar el compuesto (II) mediante el grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  con el compuesto (I) en su extremo reductor que no se oxida;

en la que  $R'$  es H, o un residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo, uniéndose el residuo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, arilcicloalquilo, alcarilo o cicloalquilarilo opcionalmente mediante un puente de oxígeno al grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  del compuesto (II),

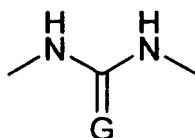
y en la que  $R''$  comprende un grupo funcional X que puede hacerse reaccionar con al menos otro compuesto antes o después de la reacción de (I) y (II), y

-- en el que el compuesto (II) es una hidroxilamina,

-- o en la que  $R''$  comprende, aparte del grupo funcional X, un grupo funcional adicional W que se une directamente al grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$ , seleccionándose dicho grupo funcional W del grupo que consiste en

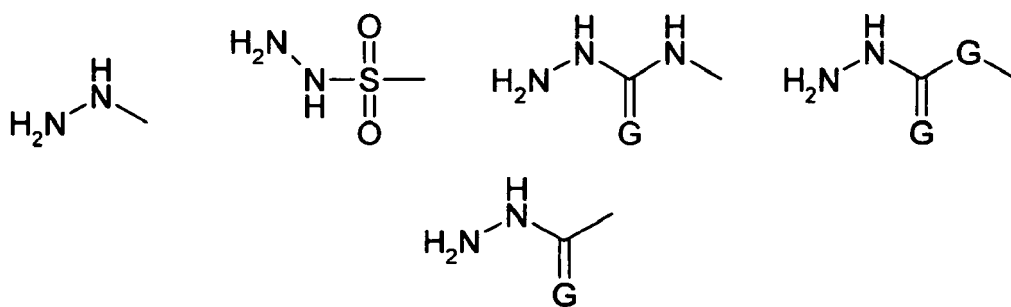


y

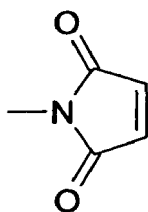


en los que G es O o S y, si está presente dos veces, G es independientemente O o S.

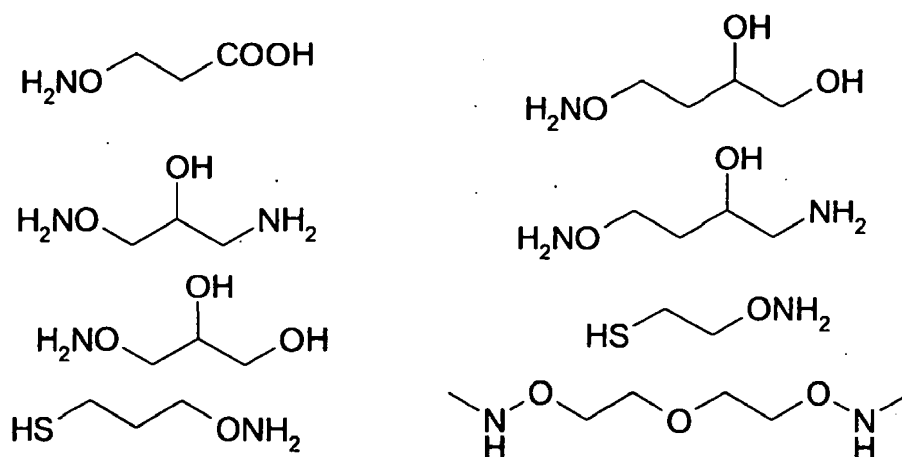
2. Método según la reivindicación 1, en el que  $R'$  es hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxilo lineal o ramificado, preferiblemente hidrógeno o un grupo metilo o uno metoxilo.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que  $R'$  es H, y en el que  $R'$  y el grupo NH que forma un puente entre  $R'$  y  $R''$  forman, junto con W, uno de los siguientes grupos:



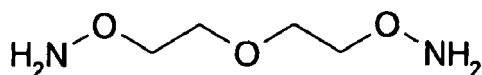
- 5 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo NH que forma un puente entre R' y R'' está separado del grupo funcional X por un grupo alquilo o cicloalquilo o arilo o aralquilo o arilcicloalquilo o alcarilo o cicloalquilarilo lineal o ramificado, en el que estos grupos pueden comprender al menos un heteroátomo tal como N, O, S, y en el que estos grupos pueden estar adecuadamente sustituidos.
- 10 5. Método según la reivindicación 4, en el que el grupo de separación es una cadena de alquilo de desde 1 hasta 20 átomos de carbono, preferiblemente de desde 1 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente de desde 2 hasta 4 átomos de carbono.
- 15 6. Método según la reivindicación 5, en el que la cadena comprende de 1 a 4 átomos de oxígeno.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el grupo funcional X es el grupo



- 20 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el grupo funcional X se selecciona del grupo que consiste en -SH, -NH<sub>2</sub>, -O-NH<sub>2</sub>, -NH-O-alquilo, -(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -G-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub>, -NH-(C=G)-NH-NH<sub>2</sub> y -SO<sub>2</sub>-NH-NH<sub>2</sub>, en los que G es O o S y, si G está presente dos veces, es independientemente O o S.
- 25 9. Método según la reivindicación 8, en el que el grupo alcoxiamino -NH-O-alquilo es el grupo metoxiamino, grupo etoxiamino o grupo propoxiamino, preferiblemente el grupo metoxiamino.
- 30 10. Método según la reivindicación 1, en el que el compuesto de hidroxilamina (II) es uno de los siguientes compuestos:

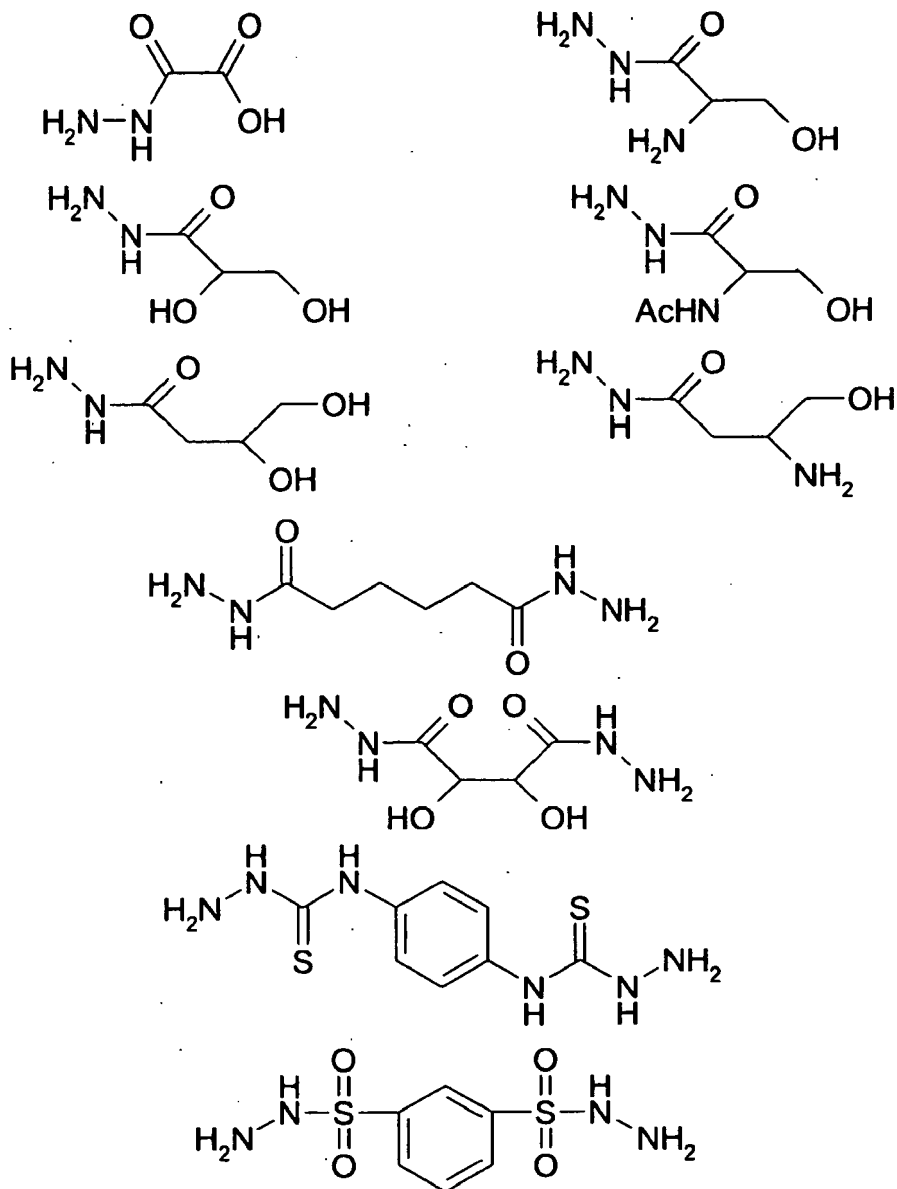






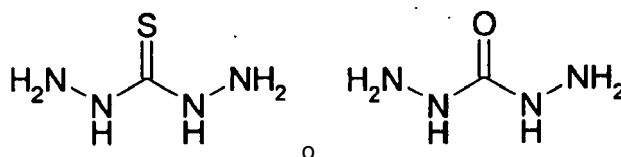
preferiblemente O-[2-(2-aminoxioxi-etoxi)-etil]-hidroxilamina.

- 5 11. Método según la reivindicación 1, en el que el compuesto (II) es uno de los siguientes compuestos:



10

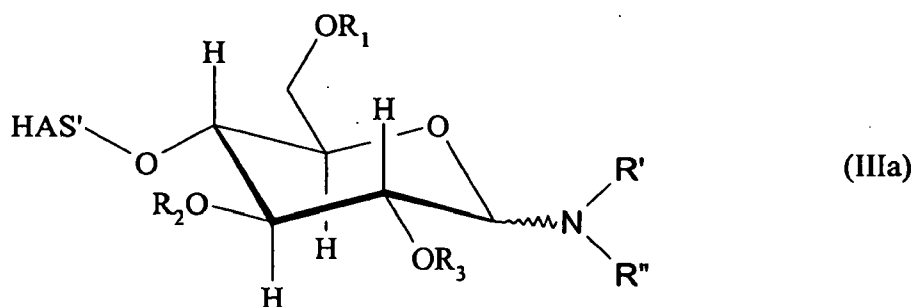
- 15 12. Método según la reivindicación 1, en el que el compuesto según la fórmula (II) es



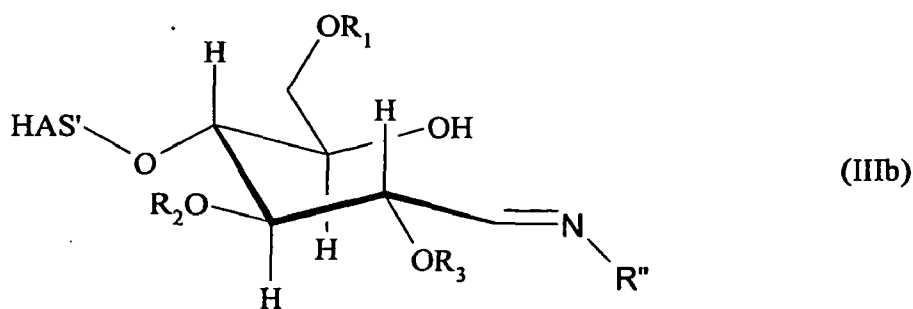
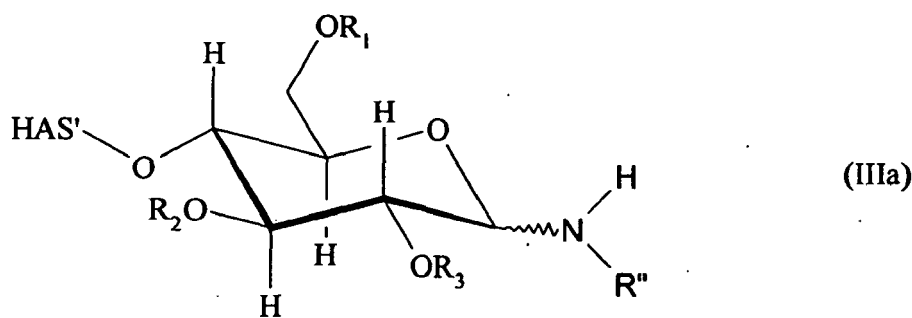
Preferiblemente, carbohidrazida.

- 20 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón.

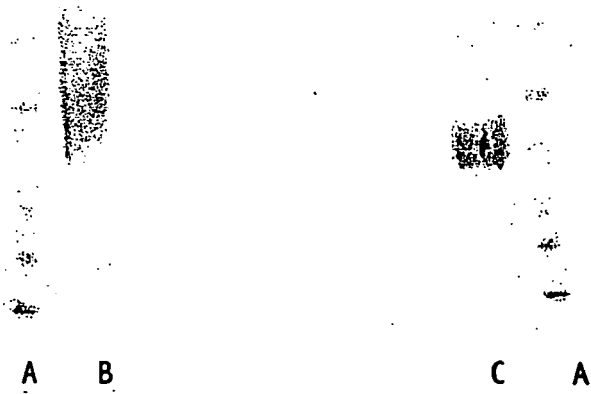
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente hidrógeno o un grupo 2-hidroxietilo.
- 5 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que se hace reaccionar el compuesto (I) con el compuesto (II) que no se hace reaccionar con un compuesto adicional antes de la reacción con el compuesto (I).
- 10 16. Método según la reivindicación 15, en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo el compuesto (II) una hidroxilamina o una hidrazida, se lleva a cabo a una temperatura de desde 5 hasta 45°C en un medio acuoso.
- 15 17. Método según la reivindicación 15, en el que la reacción del compuesto (I) y el compuesto (II), siendo dicha reacción una aminación reductora, se lleva a cabo a una temperatura de desde 25 hasta 90°C en un medio acuoso.
18. Derivado de hidroxialquilalmidón que puede obtenerse mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
- 20 19. Derivado de hidroxialquilalmidón según la reivindicación 18, en el que dicho derivado tiene una constitución según la fórmula (IIIa)



- 25 20. Derivado de hidroxialquilalmidón según la reivindicación 18, en el que  $R'$  es hidrógeno y en el que el derivado es o bien un compuesto de fórmula (IIIa) o bien un compuesto de fórmula (IIIb) o bien una mezcla de los compuestos de fórmulas (IIIa) y (IIIb)



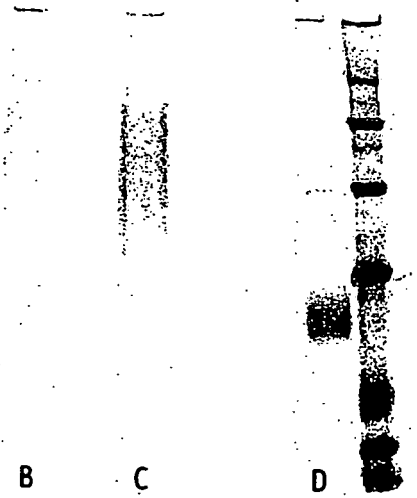
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

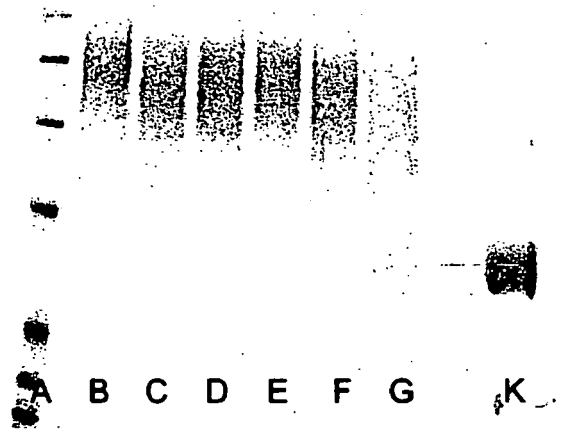


Fig. 5

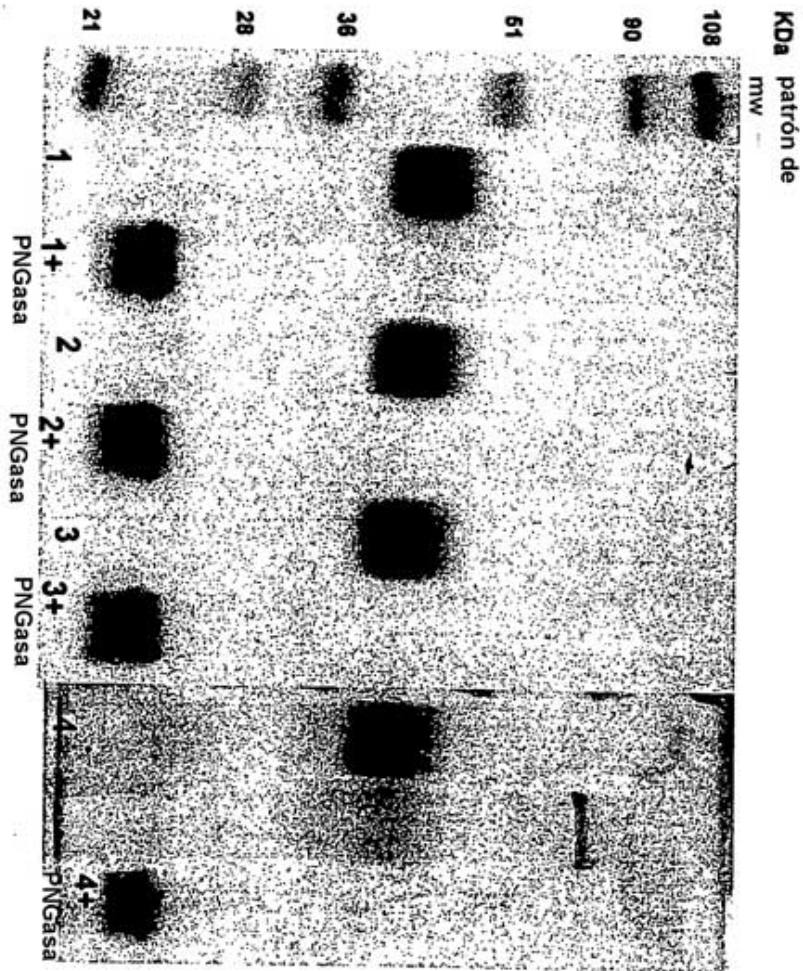


Fig. 6

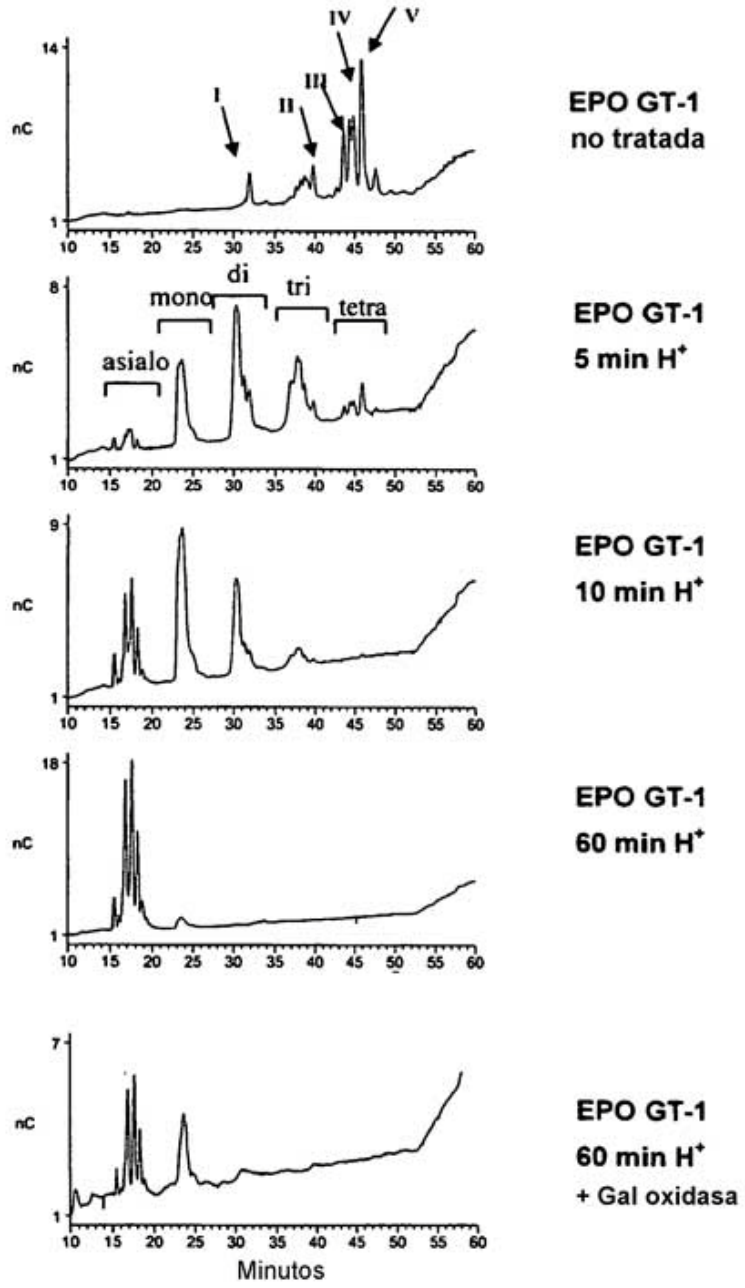




Fig. 7

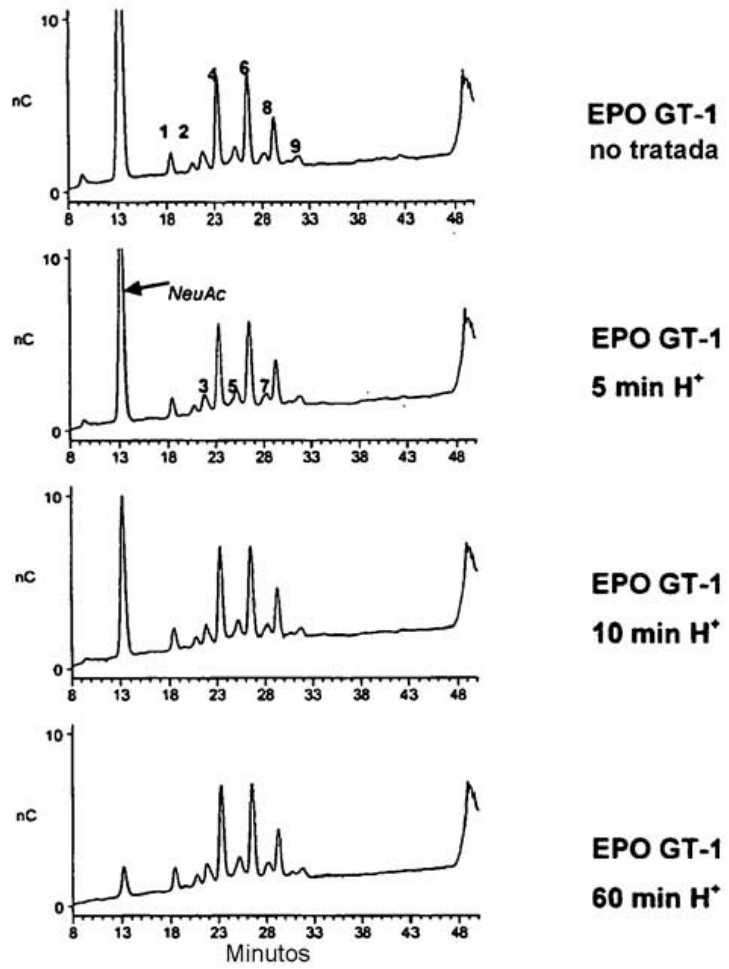


Fig. 8

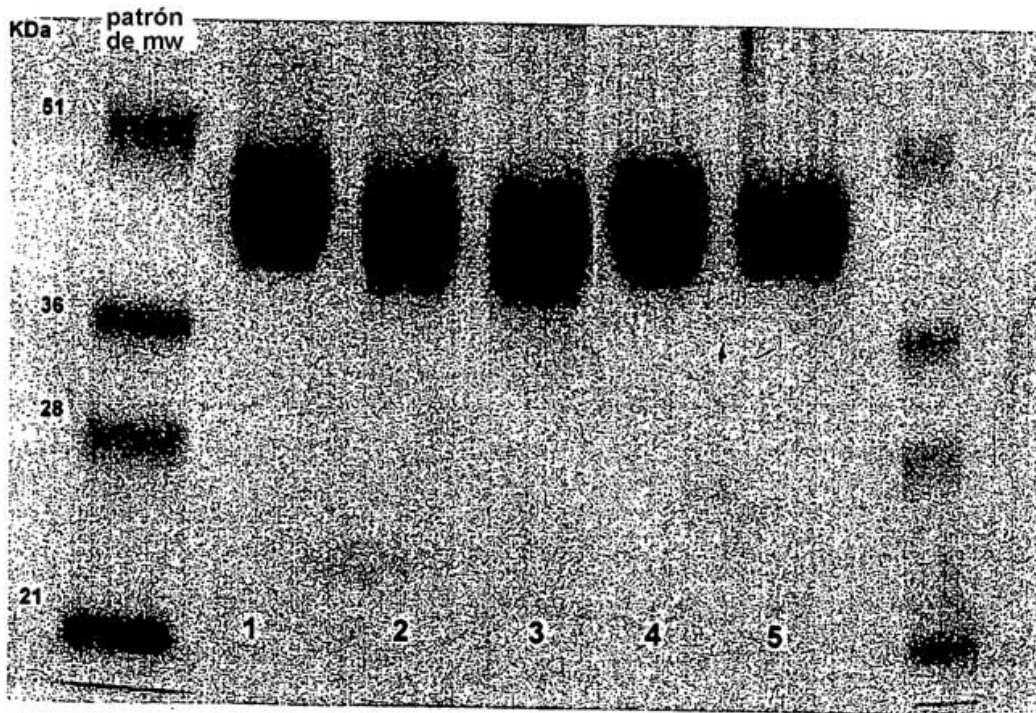


Fig. 9

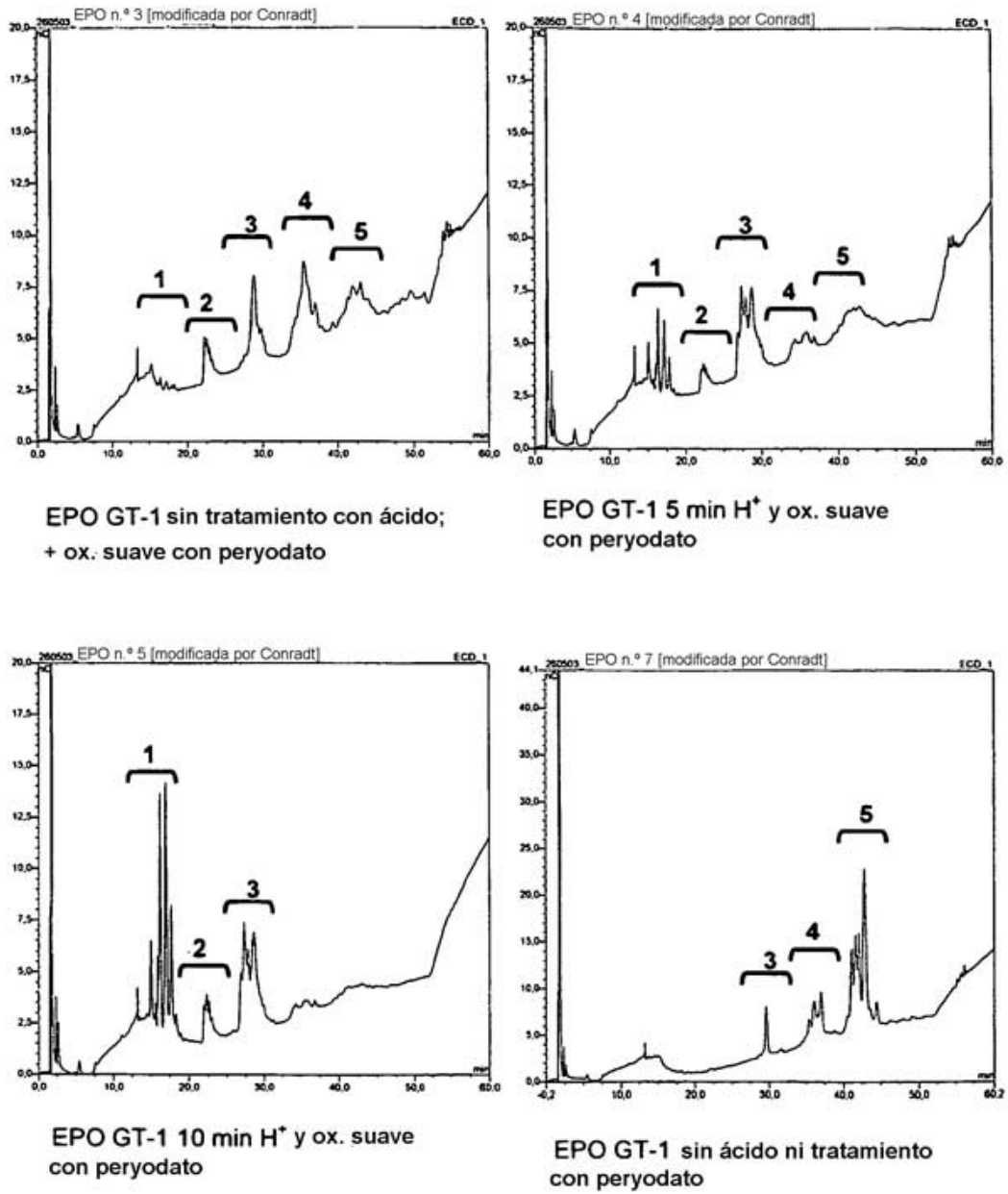


Fig. 10

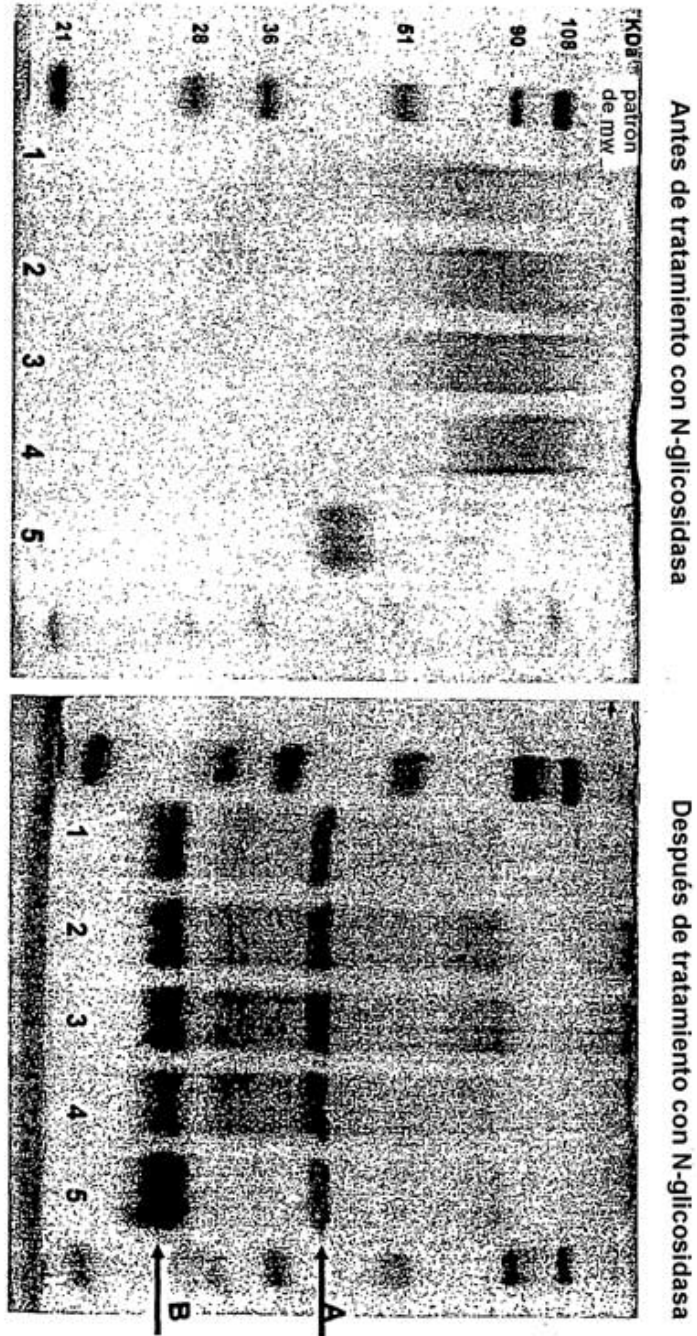


Fig. 11

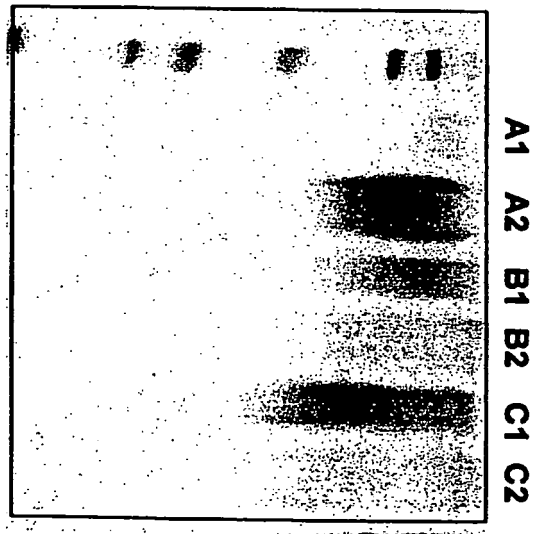
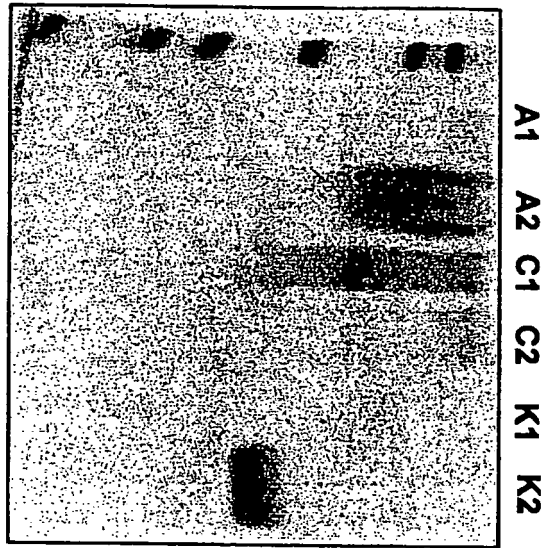


Fig. 12a

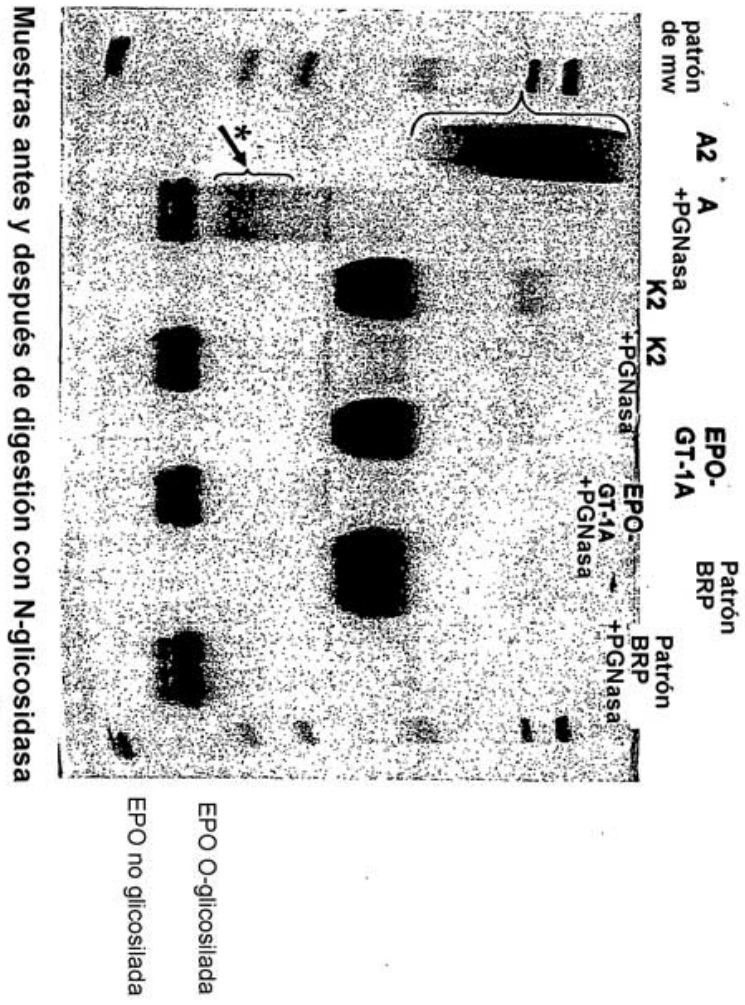
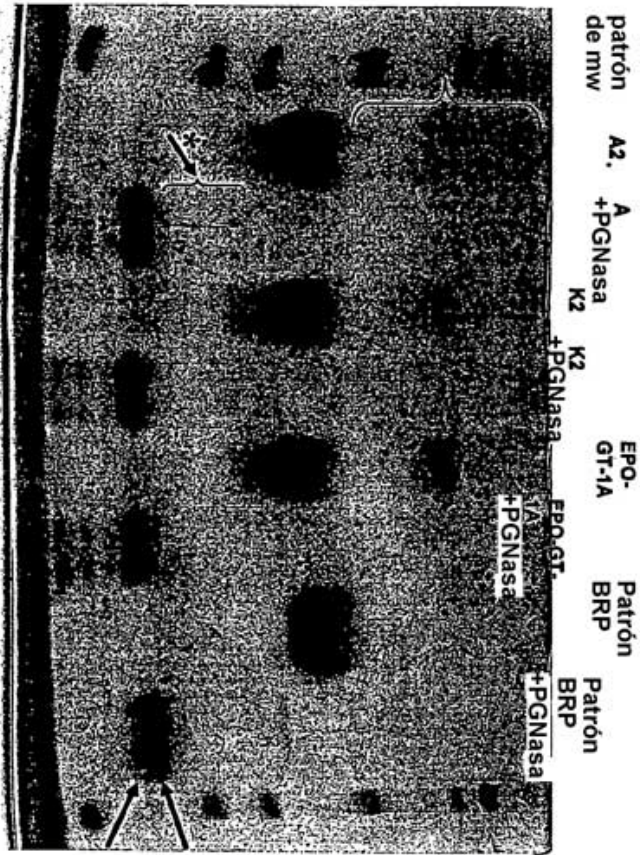


Fig. 12b

Se trataron las muestras con ácido suave antes del análisis mediante SDS-PAGE



EPO O-glicosilada  
EPO no glicosilada

Fig. 13

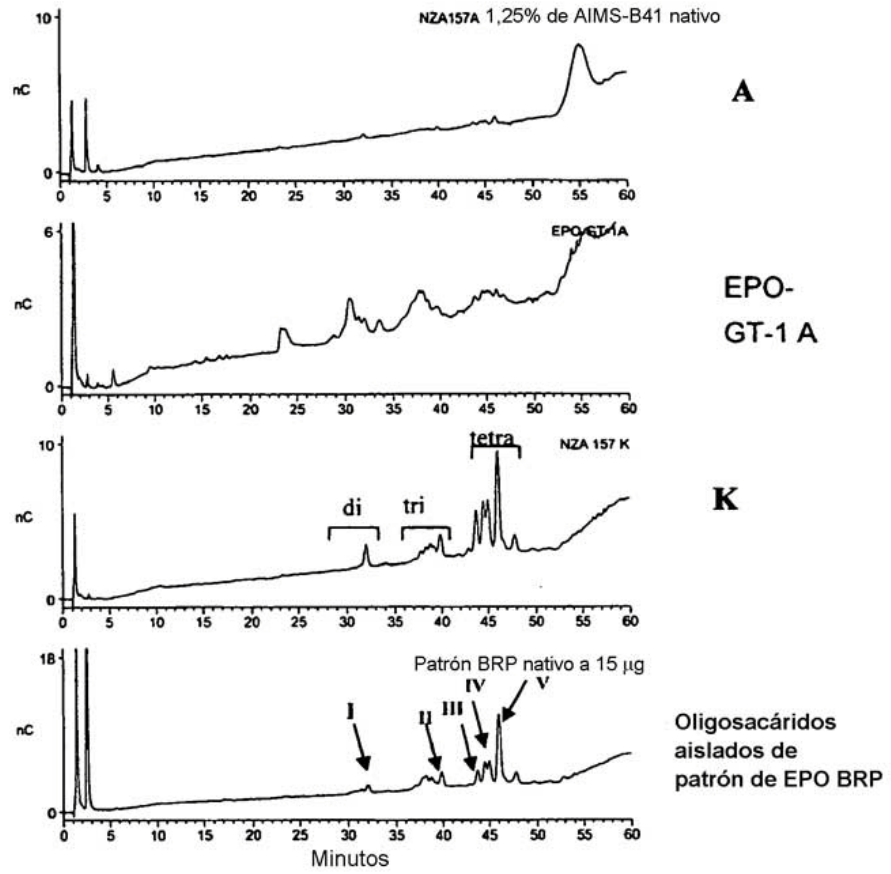




Fig. 14

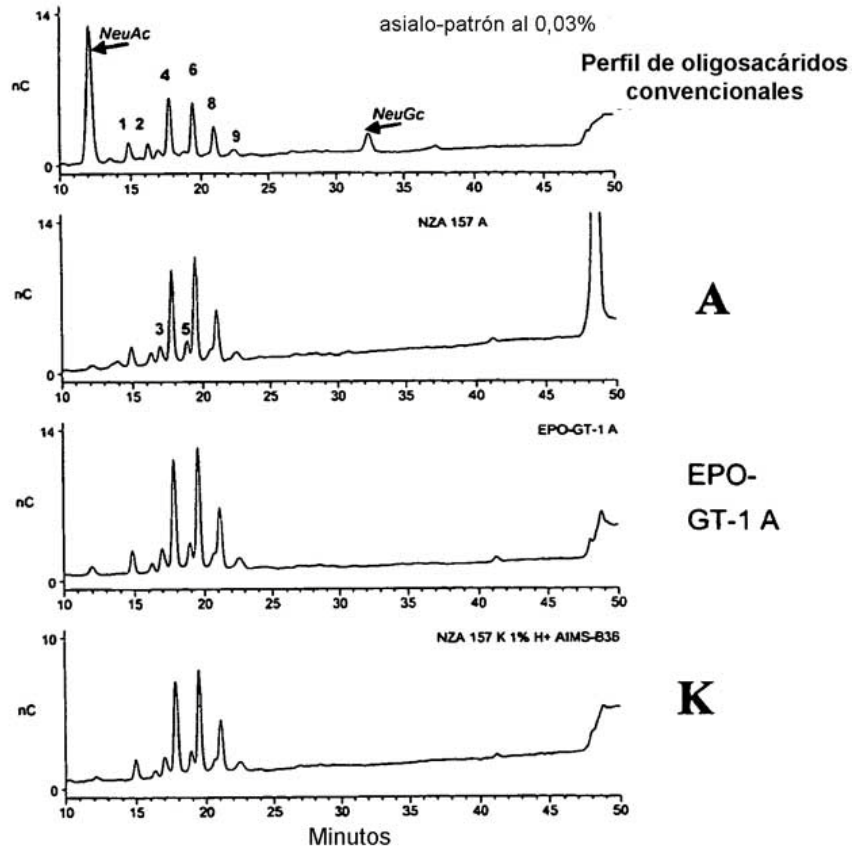


Fig. 15

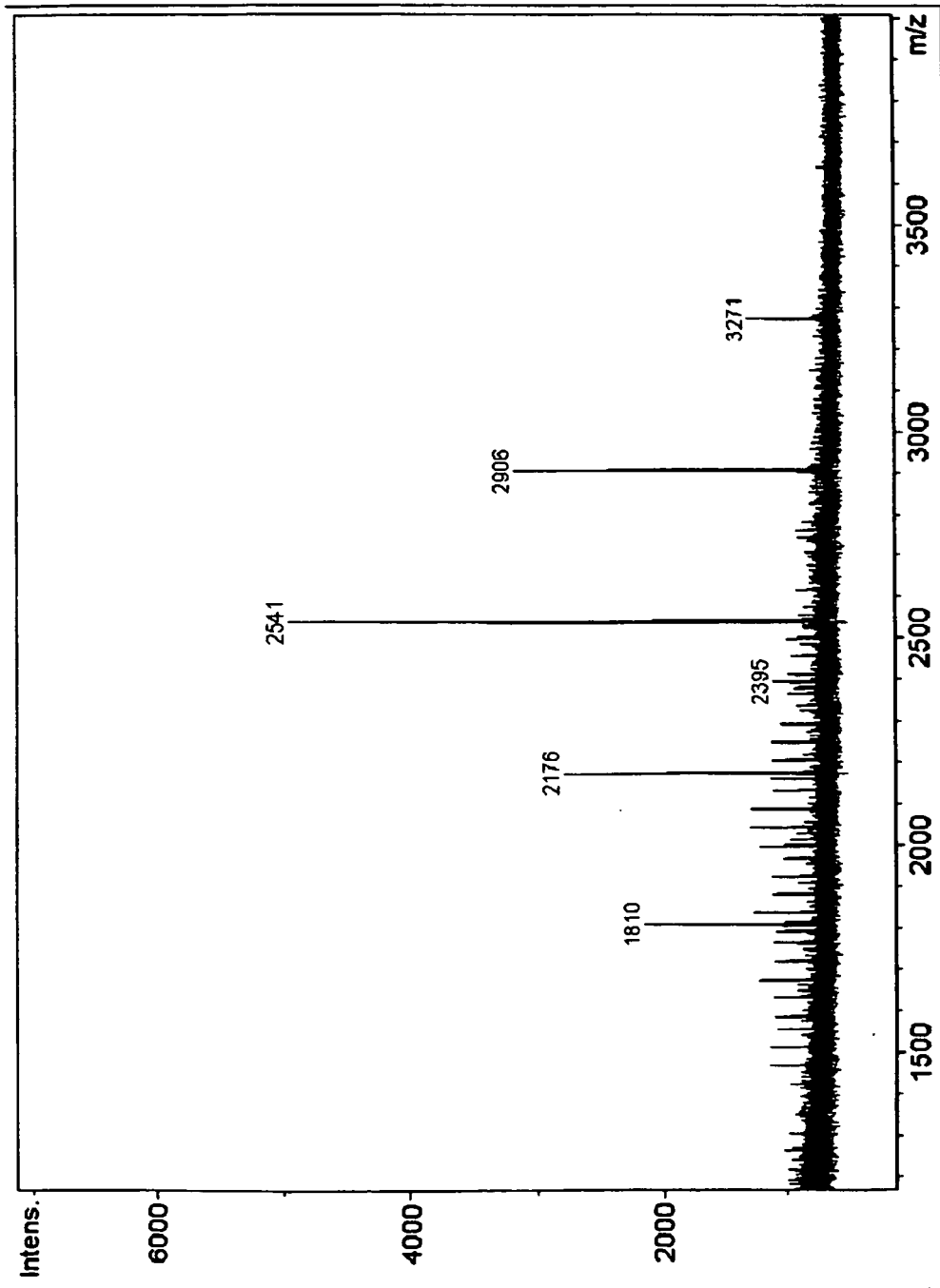


Fig. 16

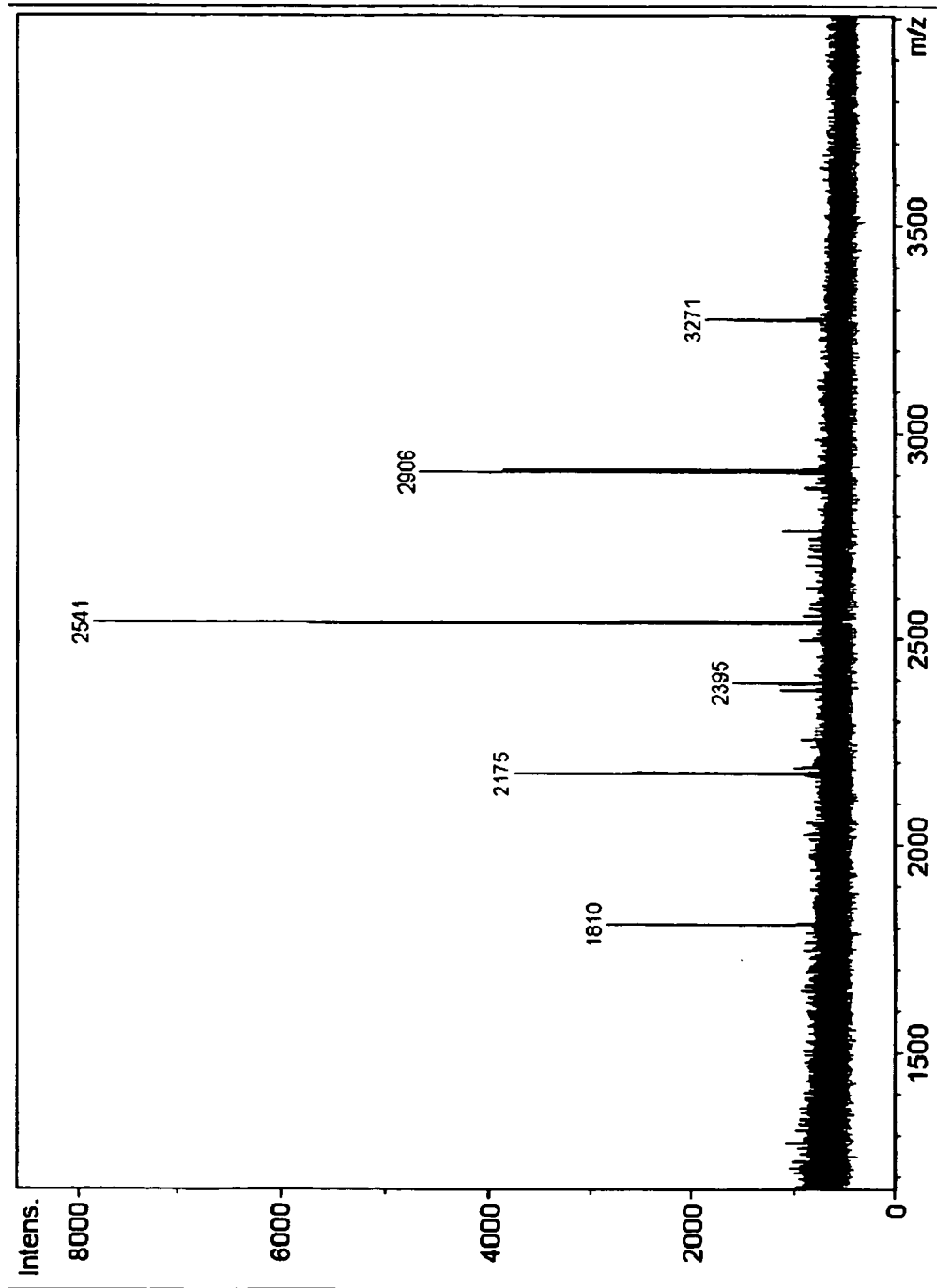


Fig. 17

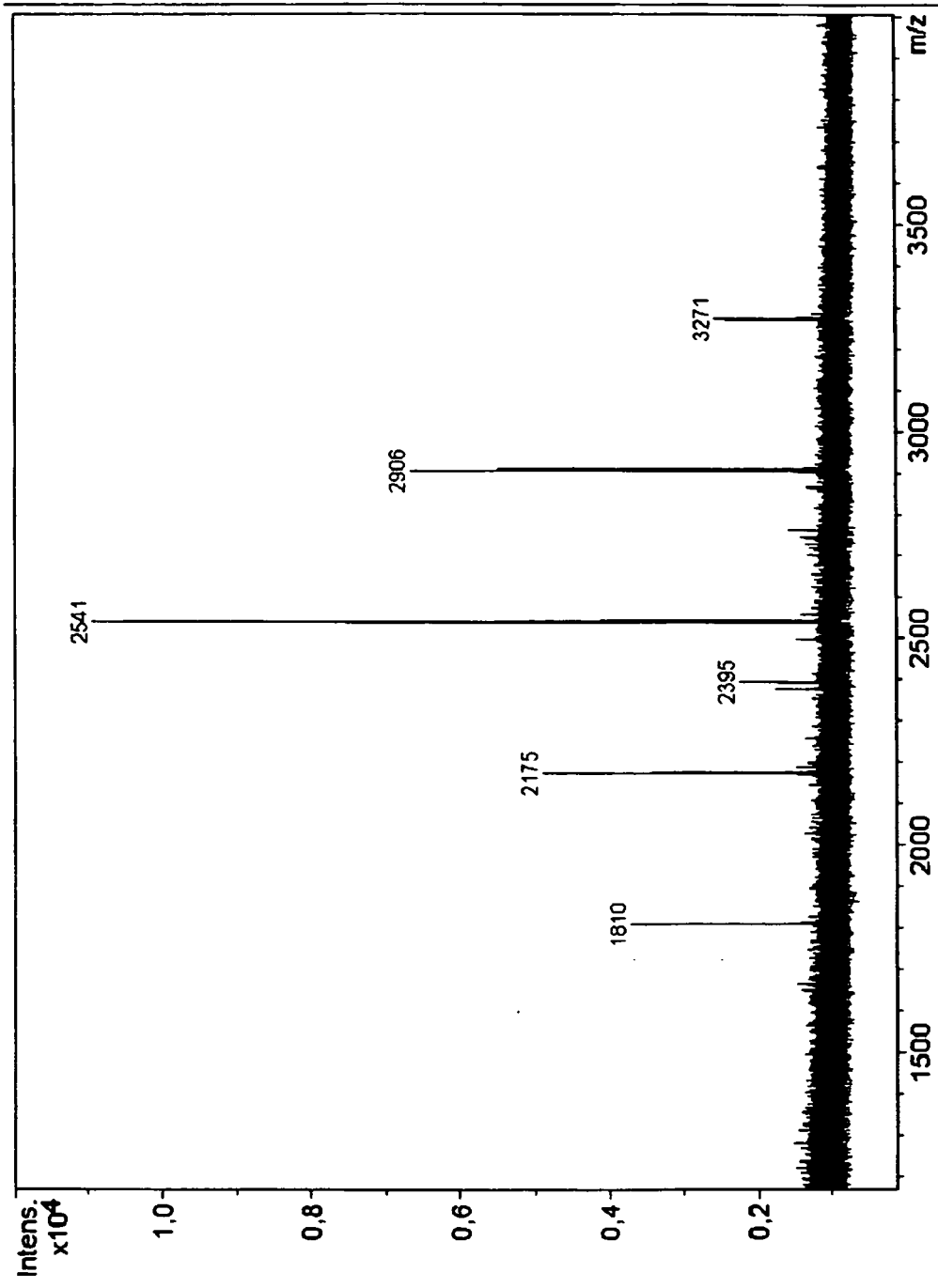


Fig. 18

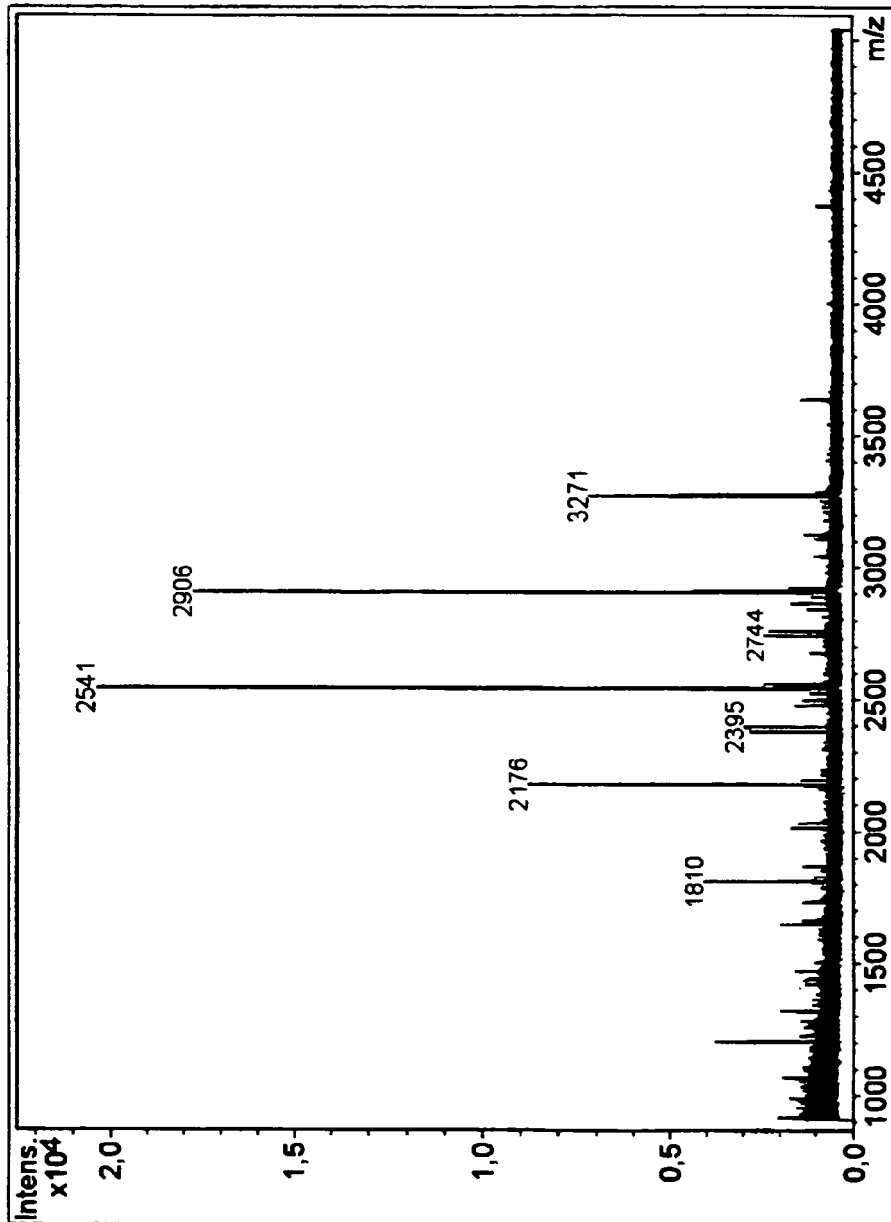


Fig. 19

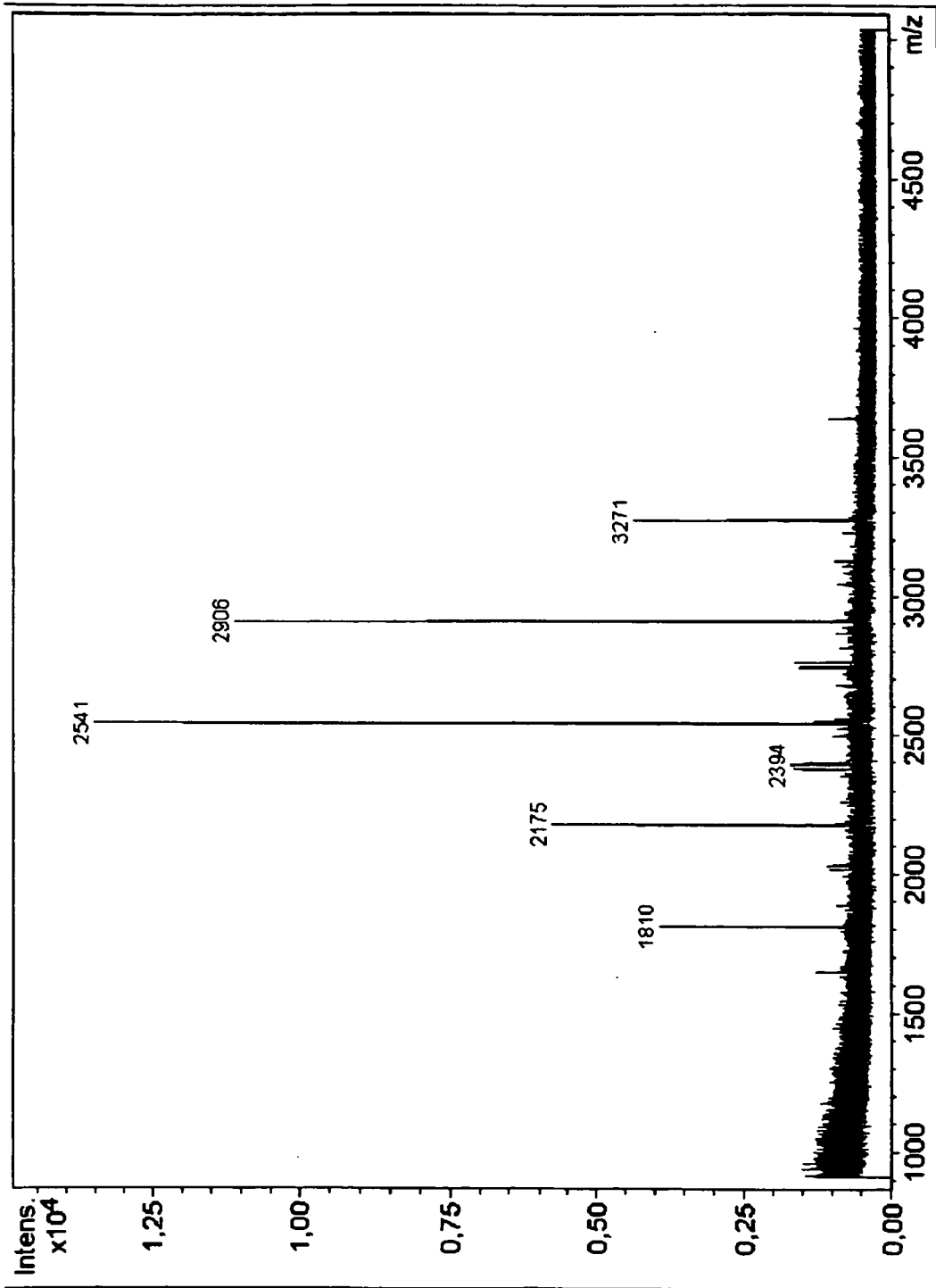


Fig. 20

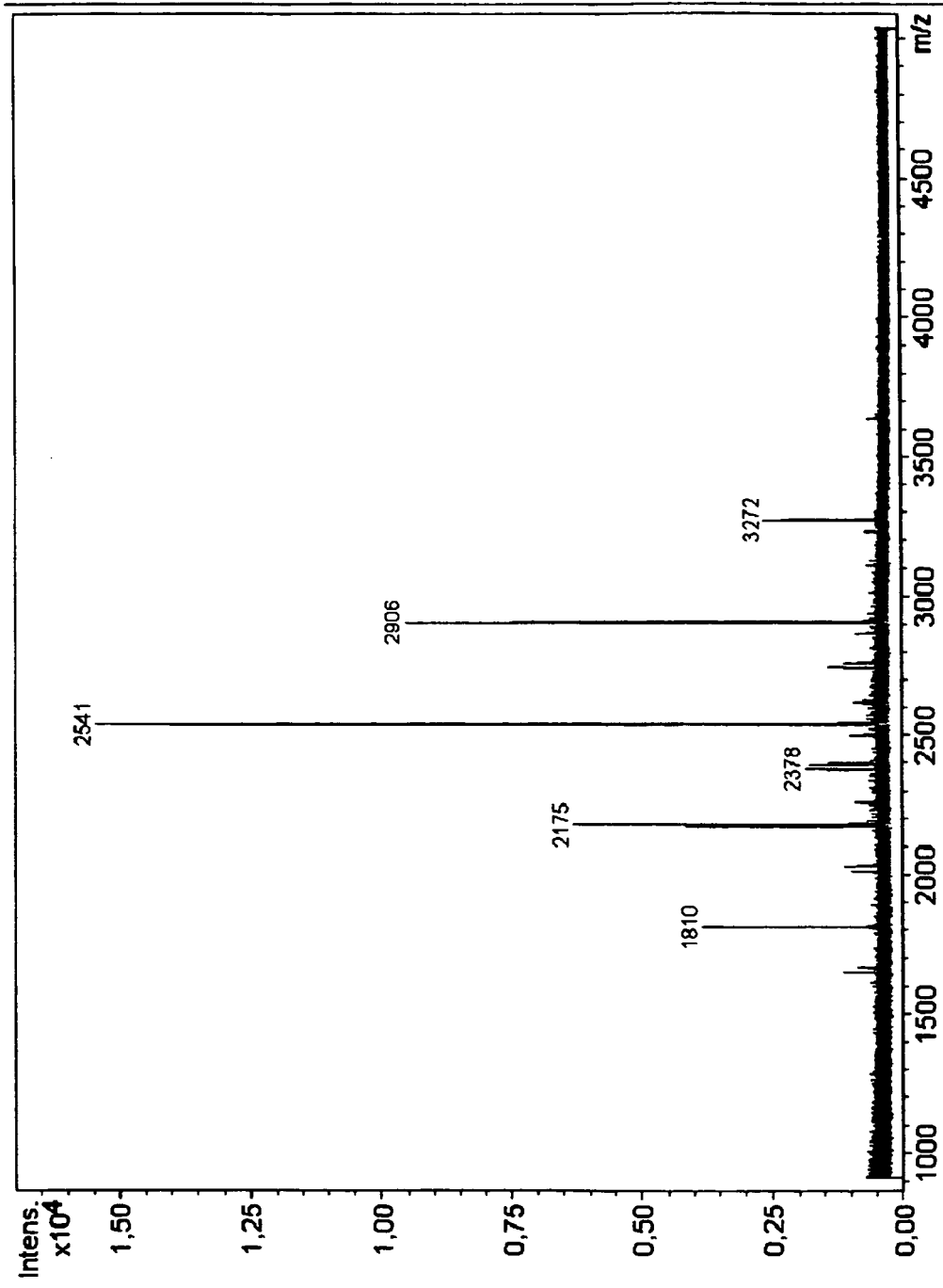


Fig. 21

