

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 358**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2010 PCT/EP2010/003634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10145821**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10725052 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2443156**

54 Título: **Procedimiento para la síntesis de conjugados de glicosaminoglicanos (GAG) con moléculas biológicamente activas, conjugados poliméricos y sus usos relativos**

30 Prioridad:

16.06.2009 IT MI20091065

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

08.02.2017

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3-A
35031 Abano Terme (Padova), IT**

72 Inventor/es:

**D'ESTE, MATTEO;
RENIER, DAVIDE;
PASUT, GIANFRANCO y
ROSATO, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 600 358 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

Procedimiento para la síntesis de conjugados de glicosaminoglicanos (GAG) con moléculas biológicamente activas, conjugados poliméricos y sus usos relativos

La presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de conjugados de glicosaminoglicanos (GAG) con moléculas biológicamente activas de diferente naturaleza, que comprende pequeñas moléculas y macromoléculas. En particular, la presente invención se refiere a la conjugación de ácido hialurónico (HA) y sus derivados con polipéptidos y proteínas con una acción biológica, tales como interferones, eritropoyetinas, factores de crecimiento, insulina, citoquinas, anticuerpos y hormonas.

El uso de polímeros en el campo biomédico cubre diversos ámbitos y está ampliamente extendido. Los hidrogeles con una base polimérica, por ejemplo, se utilizan comúnmente para reducir adherencias quirúrgicas en cirugía abdominal, en cirugía cosmética y reconstructiva, en sistemas de liberación controlada que constan de matrices gelatinosas o como biomateriales.

Otro ejemplo importante es la obtención de moléculas derivadas con acción farmacológica con cadenas poliméricas, que mejoran la solubilidad y ocultan las moléculas con respecto a los procedimientos de degradación, prolongando su acción.

El ejemplo más típico en este contexto, es el polietilenglicol (PEG) que, aunque no está presente en los organismos vivos, es totalmente biocompatible y no inmunogénico. PEG se utiliza comúnmente para la implementación del desempeño de los fármacos biológicos (proteínas terapéuticas). Cabe resaltar al alfa-interferón pegilado, o peginterferón, por ejemplo, que ha reemplazado la simple versión recombinante de la proteína, convirtiéndose en la terapia elegida para la hepatitis viral así como en una verdadera bomba (patente europea EP0809996). El límite de la adición de grupos funcionales a las proteínas con PEG está enlazado con la consecución de conjugados con adición irregular de grupos funcionales, o, en cualquier caso, con patrones polidispersos. Además, los diversos isómeros obtenidos se pueden caracterizar por una actividad biológica diferente, biodisponibilidad, vida media, poder inmunogénico.

Por esta razón, en los años noventa, se introdujeron los métodos de pegilación para obtener proteínas modificadas sólo en sitios específicos; entre ellos, el extremo N-terminal es el más accesible como resultado de su pKa considerablemente diferente con respecto a todos los demás grupos amina presentes en las proteínas.

En este sentido, Pepinsky y colaboradores (Pepinsky RB, Le Page DJ, Gill A, y colaboradores. J Pharm Exp Ther, 2001, 297 (3): 1059-1066), han estudiado específicamente la introducción de una cadena de PEG al extremo N-terminal del interferón beta 1 (que se utiliza en el tratamiento de la esclerosis múltiple) mediante la alquilación reductiva obtenida de un derivado del aldehído de PEG. El aducto obtenido mostró una mejor eficacia *in vivo* debido a una mayor vida media.

Otra proteína que ha sido modificada con PEG gracias a este enfoque, es G-CSF, un factor de crecimiento y activación de granulocitos neutrófilos que Kinstler y colaboradores modificaron con la adición de grupos funcionales en el extremo N-terminal (patente estadounidense No. 6.153.655). El producto correspondiente (Pegfilgrastim) ya está en el mercado desde 2002.

En el grupo de los polímeros en el campo biomédico, los biopolímeros son de particular interés. Algunos de estos están naturalmente presentes en los tejidos humanos y tienen propiedades de biocompatibilidad y no inmunogenicidad, lo que representa un valor añadido importante en este contexto. Entre estos biopolímeros, los glicosaminoglicanos (GAG) son de particular interés, es decir polisacáridos no ramificados que tienen un alto peso molecular, que consisten de unidades de repetición de disacáridos. Los GAG, por ejemplo, tienen una función estructural en el tejido conectivo, tendones y cartilago o pueden actuar como anticoagulantes.

El ácido hialurónico (HA) es un GAG que se puede encontrar en la matriz extracelular con una función estructural implicada en el proceso de motilidad celular pero también tiene una función viscoelástica, además de ser un agente hidratante y de proliferación. Gracias a estas características particulares, se usan el HA y sus derivados como matriz para biomateriales (documento EP 216453) y sistemas de liberación controlada (solicitudes de patente estadounidenses No. 4.582.865 y 4.636.524; K. Motokawa y colaboradores, Journal of Biomedical Materials Research, Parte A, (2006), pág. 459).

El HA participa también en el reconocimiento molecular y en mecanismos de regulación, ya que es reconocido por receptores celulares tales como RHAMM (CD168), CD44, LYVE1, Layilina. La especificidad de la interacción de HA con CD44 es de particular importancia. De hecho, este receptor es sobreexpresado en la mayoría de los cánceres sólidos de origen epitelial; al unir los fármacos con actividad anticancerígena al HA, se puede explotar el direccionamiento activo del biopolímero, lo que permite la endocitosis y la liberación del agente anticancerígeno dentro de la célula neoplásica (solicitud internacional de patente WO2009001209).

- 5 La formación de derivados de agentes terapéuticos con polímeros hidrosolubles (como, por ejemplo, GAG) es particularmente útil en el caso de polipéptidos, hormonas polipeptídicas y proteínas. Esta clase de moléculas, de hecho, tiene una estructura que es muy susceptible incluso a pequeñas modificaciones, causadas por el entorno en el que están presentes. Además, los polipéptidos y las proteínas normalmente tienen un lapso de tiempo de eficacia muy limitado por su corta vida media. Esto es porque su formación de grupos funcionales con polímeros hidrosolubles es extremadamente importante, lo que mejora también la solubilidad, biodisponibilidad y la reducción de la inmunogenicidad.
- 10 Los métodos de conjugación de GAG con proteínas a través de divinil sulfona (patente estadounidense No. 7.034.127 que se refiere particularmente a IFN), puentes disulfuro (patente estadounidense No. 7.417.021), son conocidos en la técnica. El único método que permite el control del sitio de formación de derivados es la reacción a través de la formación de puentes disulfuro; en este caso el polímero solo puede unirse por sí mismo en correspondencia con residuos de cisteína en una forma reducida.
- 15 Si la cadena de polipéptido tiene sólo un residuo de cisteína disponible, y en forma reducida, el método de formación de derivados es en realidad específico, pero este es un caso bastante raro. Las proteínas, de hecho, a menudo tienen numerosos residuos de cisteína, pero, sobre todo, a menudo ocurre que estos residuos ya están acoplados en puentes disulfuro cuya reducción implica reordenamientos significativos que pueden conducir a la pérdida de funcionalidad de la proteína.
- 20 Ninguno de los métodos del estado de la técnica permite obtener un patrón de adición de grupos funcionales unívoco, manteniendo incluso la actividad biológica de la proteína, por lo tanto un producto efectivamente monodisperso y eficiente.
- 25 Con base en lo anterior, se hace evidente la necesidad de hacer uso de un proceso de conjugación de moléculas bioactivas, tales como proteínas y polipéptidos, a GAG (es decir, HA) sin comprometer la funcionalidad de la proteína.
- 30 Los autores de la presente invención ahora han establecido un procedimiento de conjugación de glicosaminoglicanos que tienen moléculas biológicamente activas (es decir, proteínas y polipéptidos) capaces de superar los límites del estado de la técnica, ya que permite que los GAG (tal como HA) se unan sin modificación de la estructura básica de la proteína y sin poner en peligro su funcionalidad. Otra característica que distingue los conjugados entre GAG y un agente terapéutico (TA) de la presente invención con respecto a los conjugados conocidos en el estado de la técnica, consiste en el hecho de que el presente método de conjugación conduce a la formación de un aducto casi monodisperso y no a una mezcla isomérica de productos con diferentes características químicas, físicas, biológicas, cuyo comportamiento, eficacia terapéutica y perfil toxicológico son variables.
- 35 Además, variando adecuadamente algunos de los parámetros de procedimiento (es decir, el pH), también es posible seleccionar los grupos amina de la molécula biológicamente activa a la que está enlazado el glicosaminoglicano; es posible, por ejemplo, enlazar específicamente el polímero hidrosoluble HA al extremo N-terminal.
- 40 En el caso de fármacos tales como proteínas y polipéptidos, el acoplamiento al grupo amina a menudo tiene lugar a través de acilación, que conduce a la formación de amidas, cuyo nitrógeno ya no es capaz de participar en equilibrios ácido-base.
- 45 El método de la conjugación de la presente invención se caracteriza porque no implica ninguna alteración de la carga neta presente en la especie activa, lo que conduce a la transformación de una amina primaria en una amina secundaria que mantiene la capacidad de intercambio de protones. Esto es una clara ventaja en términos del mantenimiento de la actividad biológica del TA.
- 50 Incluso más sorprendentemente, los autores de la invención han descubierto que los bioconjugados de la presente invención son capaces de aumentar la eficacia del fármaco conjugado y mantenerlo con el tiempo (véase el ejemplo 10 insulina conjugada con HA).
- 55 La conjugación del agente terapéutico con el polímero hidrosoluble, mejora sus características, haciéndolo más soluble, biodisponible y más activo. A diferencia de los polímeros hidrosolubles que se describen en el estado de la técnica (tales como, por ejemplo, polietilenglicol, PEG), el uso de glicosaminoglicanos permite obtener sistemas excelentes de suministro de fármacos, que son capaces de dirigir el agente terapéutico con una especificidad inaccesible con otros tipos de polímeros. Esta especificidad es determinada por el sistema complejo de interacciones del receptor que implican GAG. Además, el uso de biopolímeros que, aunque interactúan con los receptores celulares, no promueve una respuesta inmunológica, lo que resulta en una acción sinérgica con una eficacia superior.
- 60 La presente invención describe un procedimiento para la síntesis de conjugados de glicosaminoglicanos (GAG) con moléculas biológicamente activas, que comprende las siguientes fases:
- 65

5 a) la formación de derivados del GAG con al menos un grupo aldehído (CHO), por la reacción del GAG con una molécula espaciadora (SP), en donde dicha molécula espaciadora comprende, como primer grupo funcional, uno o más grupos aldehído (SP-CHO), estando dichos grupos aldehído (SP-(CHO)) opcionalmente protegidos y, como segundo grupo funcional, un grupo nucleofílico apto para conjugación con el GAG;

5 a1) hidrólisis del compuesto intermedio activado con ácidos acuosos cuando dichos uno o más grupos aldehído están protegidos;

b) reacción del aducto obtenido en la fase a) o a1) con al menos una molécula biológicamente activa (TA), caracterizado porque comprende un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo aldehído;

10 siendo dicho agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste de fármacos antitumorales; agentes antivirales y antibióticos; inhibidores de proteasa y polimerasa; fármacos antiinflamatorios, analgésicos, anestésicos, contra el dolor; narcóticos; esteroideos; minoxidil.

15 Los hidrogeles compuestos por ácido hialurónico con adición de grupos funcionales amina o aldehído (protegidos o no protegidos) son conocidos en el estado de la técnica, sin embargo, estos derivados se entrelazan posteriormente con otras moléculas del mismo polisacárido posiblemente formando derivados con diferentes grupos funcionales de tal forma que reaccionan con el grupo amina o aldehído del ácido hialurónico de partida con adición de grupos funcionales (EP1757314; Bulpitt P, y colaboradores. J of Biomedical Materials Research, 1999 47 (2) 152-169).

20 Como ya se mencionó, los glicosaminoglicanos (GAG), son polisacáridos no ramificados que tienen un alto peso molecular, formados por unidades de repetición de disacárido. Una característica común de los GAG es la presencia de un grupo funcional carboxílico por unidad de disacárido, que puede aparecer en la naturaleza en forma de ácido o de sal, generando así polianiones. En la presente invención, el acrónimo GAG indistintamente indica la forma de ácido o la forma de sal de los polisacáridos y en este caso los contraiones más típicos son los metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio. Los polímeros clasificados como GAG, comprenden:

25 ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparano. Los GAG que se utilizan dentro de la presente invención pueden estar en forma nativa o en forma de derivados semisintéticos incluyendo sales de amonio cuaternario, ésteres carboxílicos, O-ésteres, amidas, derivados percarboxilados, derivados O-sulfatados, derivados N-desacetilados, derivados N-sulfatados o derivados mixtos

30 caracterizados por la presencia simultánea de estas modificaciones. El acrónimo GAG se utiliza en lo sucesivo para indicar tanto los polímeros mencionados en forma nativa como los derivados semisintéticos correspondientes.

Incluso si los GAG, en representaciones normales como fórmulas estructurales, no portan ningún grupo aldehído, cabe recordar que el equilibrio natural que se establece en la solución entre la forma abierta y la forma cerrada del extremo reductor, pasa a través de la formación de un grupo funcional aldehído. Sin embargo, esta presencia es cuantitativamente muy limitada, ya que la longitud de las cadenas poliméricas crea una baja cantidad de extremos de reductores. Cuando disminuye el peso molecular del GAG, por otro lado, aumenta progresivamente la cantidad relevante de extremos reductores disponibles en forma de aldehído, hasta que resulte cuantitativamente útil para los oligómeros de los GAG; este es el único caso en que los extremos reductores pueden utilizarse eficazmente para

40 efectuar el procedimiento de conjugación descrito en este documento.

En todos los demás casos, teniendo en cuenta que el grupo aldehído es bastante inestable incluso bajo condiciones moderadas, es conveniente introducirlo sintéticamente en el polímero hidrosoluble en la forma de aldehído protegido. De esta manera, es posible aislar un compuesto intermedio activado que posteriormente reacciona con el TA, sin tener que poner todos los componentes en contacto en una mezcla de reacción única.

45

Los conjugados de acuerdo con la presente invención están relacionados ya que el agente terapéutico TA está enlazado al polímero hidrosoluble como una amina secundaria o terciaria. La presencia del grupo aldehído (posiblemente protegido como se describe en la fase a)), como un medio para permitir el enlace entre el agente terapéutico y GAG y el método de síntesis preparado por el solicitante e ilustrado en el presente documento debe considerarse como el rasgo característico de la presente invención.

50

El aducto así obtenido en la fase a) es lo suficientemente estable para permitir su aislamiento, pero una vez que han sido liberados los grupos aldehído, está disponible con respecto a la reacción de formación de un derivado con el agente terapéutico de interés.

55

El conjugado obtenido puede describirse mediante la siguiente fórmula general:

60 GAG - SP - TA

en donde GAG indica el glicosaminoglicano, SP un brazo espaciador y TA el agente terapéutico.

Traduciendo la simbología de este método de formación de derivados, se obtiene lo siguiente:

65 Fase a. $GAG + SP-(CHO) \rightarrow GAG-SP-(CHO)$
Fase a1. $GAG-SP-(CHO) \rightarrow GAG-SP-CHO$

Fase b. GAG-SP-CHO + TA → GAG-SP-TA

donde CHO indica el grupo funcional aldehído, protegido si está entre paréntesis.

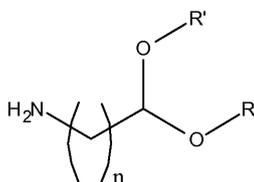
5 Esta protección puede obtenerse fácilmente con las técnicas de síntesis orgánica conocidas por los expertos en la materia. Una forma conveniente de protección, por ejemplo, consiste en el uso de hemiacetales o acetales, obtenidos a través de la reacción de aldehídos con alcoholes o dioles alifáticos o aril alifáticos, que comprenden, por ejemplo, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, sec-butanol, terc-butanol, iso-butanol, etilen glicol, propilén glicol, 1,3-propandiol, 1,4-butandiol y moléculas estructuralmente similares y es capaz de reaccionar con los
10 aldehídos para formar acetales que pueden ser aislados. El producto de la fase (a) representa lo que se define como un "compuesto intermedio activado" o un "compuesto intermedio semisintético activado pero que puede ser aislado".

15 La química que se utiliza para la adición de grupos funcionales a GAG con el brazo espaciador para obtener el compuesto intermedio activado puede seleccionarse cada vez utilizando los grupos funcionales presentes en el polímero o en el correspondiente derivado semisintético, es decir, el grupo carboxílico, grupos hidroxilo (4 para cada unidad que se repite), a veces presentes en la forma de alquilo o ésteres O-sulfatados, el grupo N-acetilo, el grupo N-sulfatado. Además, las condiciones de acoplamiento entre el GAG y el brazo espaciador deben ser tales como para no alterar al grupo aldehído o eliminar su protección cuando está presente.

20 El brazo espaciador debe contener un grupo funcional adecuado para la unión covalente con el GAG, preferiblemente uno nucleofílico tal como, por ejemplo, un grupo amina o alcohol. Se prefiere el grupo amina, en forma libre o de sal con sales adecuadas por su mayor nucleofilicidad. La molécula espaciadora SP-(CHO) es preferiblemente un amino-aldehído, incluso más preferiblemente protegido como acetal.

25 Los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como brazo espaciador del tipo GAG-SP-(CHO) comprenden acetales de aminoaldehído compuestos de la siguiente forma:

- Grupo amina, libre o en forma de una sal
- Una cadena hidrocarbonada, preferentemente alifática con un número de átomos de carbono en el intervalo de
30 1 a 20
- Un grupo aldehído, preferiblemente en la forma de un acetal de acuerdo con el siguiente esquema, en el que n oscila entre 1 a 20, mientras que R y R' pueden ser residuos alifáticos o aril-alifáticos, iguales o diferentes, o la misma cadena que porta diferentes grupos hidroxilo.



35 La cadena alifática, además de ser lineal como la esquematizada, puede ser ramificada o contener grupos arilo.

40 El solicitante ha verificado que un método de acoplamiento conveniente consiste en la formación de amidas, en la que GAG participa como ácido carboxílico, y el brazo espaciador como amina. Este tipo de reacción se efectúa de acuerdo con técnicas de síntesis orgánica conocidas por los expertos en la materia y puede llevarse a cabo por ejemplo con la ayuda de agentes de condensación que promueven el ataque nucleofílico hacia los ácidos carboxílicos. Estos reactivos incluyen aquellos que pueden utilizarse en la síntesis de péptidos en fase homogénea o heterogénea. Ejemplos de estos agentes son carbonil diimidazol, carbonato de disuccinimidilo, carbodiimidas, tales como, por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); N,N'-diciclohexilcarbodiimida; N-alil-N'-(β-hidroxi-etil)carbodiimida; N-(α-dimetil-aminopropil-N'-terc-butilcarbodiimida; N-(α-dimetilaminopropil)-N'-(β-bromoalil)carbodiimida; 1-(3-dimetilaminopropil)-3-(6-benzoilaminohexil)carbodiimida; ciclohexil-β-(N-metilmorfolina)etil carbodiimida p-toluenosulfonato (CMC) y productos similares.

50 La reacción puede llevarse a cabo en un medio acuoso o en un disolvente orgánico a una temperatura de -10 a 70°C dependiendo del tipo de activación utilizada. Cuando la preparación se lleva a cabo en un medio no acuoso, es conveniente utilizar sales de GAG que son más solubles bajo estas condiciones, por ejemplo sales de tetraalquilamonio. En cualquier caso, estos contraiones deben eliminarse por medio del procedimiento de intercambio iónico, que debe efectuarse en el polímero derivado antes de su aislamiento.

55 Las sales de tetra-alquilamonio de GAG (en particular de HA) son normalmente solubles en disolventes polares apróticos, tales como N-metil-pirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), que son adecuados como medio de reacción. El uso de estos disolventes está convenientemente acoplado con el uso de carbonil diimidazol como agente de condensación, cuya acción se ve favorecida por un ambiente ligeramente ácido para pequeñas cantidades de ácidos fuertes, por ejemplo ácido clorhídrico gaseoso burbujeado en solución o ácido
60

metanosulfónico. Otros disolventes orgánicos adecuados para efectuar este tipo de síntesis del compuesto intermedio activado son carbonatos orgánicos, que comprenden carbonato de propileno, carbonato de dietilo, y en general carbonatos orgánicos sustituidos por cadenas alifáticas, aromáticas o arilalifáticas.

5 La reacción es interrumpida por la adición de una solución saturada de un haluro alcalino, por ejemplo NaCl, NaBr, KCl, KBr. La hidratación de la mezcla de reacción desactiva los promotores de la formación de enlaces amida, mientras que la sal, agregada en tal cantidad para que esté en gran exceso con respecto a las moles de la unidad repetitiva de GAG, provoca un intercambio efectivo de iones. El requerimiento estequiométrico del gran exceso se obtiene mediante la adición de una cantidad de solución saturada de haluro alcalino que va desde 0,5% a 30% en volumen y preferiblemente de 5 a 15% en volumen.

10 La correspondiente sal alcalina del compuesto intermedio activado es purificada posteriormente por diálisis y después liofilizada. Aunque este producto puede ser aislado y es estable, es activo con respecto a la posterior reacción de adición de grupos funcionales con agentes terapéuticos que contienen grupos funcionales sensibles a la reacción hacia los aldehídos.

15 Un método alternativo de purificación/aislamiento del compuesto intermedio activado consiste en la aplicación de ciclos de precipitación-lavado con mezclas de disolventes que tienen una polaridad adecuada. La precipitación-lavado puede realizarse, por ejemplo, con alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y homólogos superiores, posiblemente mezclados con agua; otros disolventes adecuados son acetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo, disolventes polares apróticos (por ejemplo dimetilformamida o dimetilsulfóxido, n-metil pirrolidona, n-metilacetamida), carbonatos orgánicos. Cada uno de los disolventes mencionados puede utilizarse solos o en combinación con cualquier otro disolvente o con agua a fin de obtener la polaridad y otras características fisicoquímicas con mayor precisión. Las mezclas que comprenden los alcoholes anteriores, acetona y agua son los preferidos.

20 La fase (b) que describe el acoplamiento entre el GAG-SP-(CHO) y TA tiene lugar a través de una primera fase a1) para liberar el grupo aldehído (cuando está protegido), que consiste en la hidrólisis del acetal que se efectúa por tratamiento con ácidos acuosos de acuerdo con las técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia.

25 Dicha fase de hidrólisis a1) con ácidos acuosos de los compuestos intermedios activados para liberar el grupo aldehído preferentemente tiene lugar en un pH que varía de 1,5 a 3,0, preferiblemente con un pH que varía de 2,0 a 2,5, a una temperatura que va desde 25 a 65°C, preferiblemente de 40 a 60°C, durante al menos 30 minutos.

30 El aldehído libre ahora es susceptible al ataque nucleofílico en la parte del agente terapéutico, activado a través del grupo amina presente en la molécula de TA, que conduce a la formación de una imina, reducida a amina a través de los hidruros inorgánicos típicamente utilizados en reacciones de aminación reductiva, por ejemplo cianoborohidruro, hidruro de aluminio y litio, hidruro de boro y sodio y similares.

35 Los principios activos con una acción farmacéutica de interés dentro del ámbito de la presente invención comprenden, por ejemplo, "pequeñas moléculas" con acción farmacológica, y/o polipéptidos, hormonas, proteínas, glicoproteínas, enzimas, citoquinas, factores de crecimiento o factores de diferenciación celular, anticuerpos, polímeros terapéuticos, ácidos nucleicos o una combinación de los mismos. De acuerdo con modalidades preferidas de la presente invención, la "especie activa" que puede ser conjugada con HA con la técnica descrita en la presente invención comprende:

Polipéptidos y/o proteínas, en particular:

40 - inmunomoduladores, en particular proteínas pertenecientes a la familia de interferones, tales como, por ejemplo, interferones de tipo I, es decir, aquellos que se unen por sí mismos al mismo receptor de IFN α , que además de IFN α comprende IFN β e IFN ω ; interferones de tipo II y tipo III, es decir, interferones que se unen por sí mismos al receptor de IFN γ e IFN λ , respectivamente.

45 - Factores de crecimiento, en particular:

50 1. Eritropoyetinas y en general moléculas identificadas como ESA (agente estimulador de eritropoyesis), que comprende epoetina α y epoetina β , epoetina ω , epoetina δ , darbepoetina, CERA y sustancias generadas o derivadas de las mismas, tal como las proteínas de fusión mediante la estimulación de la eritropoyesis,

55 2. Factores que estimulan la hematopoyesis, tales como los factores GM-CSF G-CSF, que también pueden utilizarse en el campo de la oncología;

60 3. Factores de crecimiento de huesos y cartílagos que comprenden las proteínas pertenecientes a la familia de la proteína morfogénica ósea (BMP) tal como, por ejemplo, BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 (también denominada en la literatura como OP1), BMP8a, BMP8b, BMP10, BMP15, BMP9 también conocido como GDF2 (Factor 2 de diferenciación del crecimiento), proteínas pertenecientes a la superfamilia de TGF-beta, VEGF, PDGF, proteínas pertenecientes a la familia FGF;

65

- Citoquinas y sus antagonistas receptores, tales como, por ejemplo, IL2, TNF con sus receptores solubles o anticuerpos monoclonales correlacionados; IL1-ra (antagonista del receptor de IL1, para el tratamiento de la artritis y la artritis reumatoide) y, en general, receptores solubles de citoquinas proinflamatorias;
- 5 - Glicoproteínas, en particular Lubricina;
- Enzimas: en particular superóxido dismutasa (SOD); Ribonucleasa y Glucocerebrosidasa;
- Anticuerpos: en particular anticuerpos monoclonales o sus conjugados o proteínas de fusión; anticuerpos monoclonales que ejercen una acción antitumoral; anticuerpos monoclonales que ejercen una acción antiinflamatoria;
- 10 - Hormonas: hormonas proteicas o que contienen al menos parcialmente una cadena polipeptídica, en particular calcitonina, insulina y sus análogos y la hormona de crecimiento (GH o hGH).

Agentes terapéuticos que contienen grupos amina no fundamentales para el funcionamiento biológico:

- 15 - Fármacos antitumorales, en particular:
 1. Taxanos, alcaloides de la Vinca; camptotecinas;
 2. Ureas sustituidas;
 3. Complejos de platino, oro, plata y otros metales utilizados por ejemplo en la terapia de tumores, osteoartritis y/o artritis reumatoide o agentes bacteriostáticos/antibacterianos;
 - 20 4. Metotrexato, trimetrexato, pemetrexed, tetrahidrofolato,
 5. Análogos de pirimidina; citidina, purina;
 6. Anticuerpos oncológicos y análogos; antracenedionas;
- 25 - Agentes antivirales y antibióticos;
- Inhibidores de proteasa y polimerasa;
- Fármacos antiinflamatorios, analgésicos, anestésicos, contra el dolor con una acción central o periférica;
- Narcóticos opiáceos o no opiáceos;
- Esteroides;
- 30 - Minoxidil (normalmente utilizado en dermatología).

Ácidos nucleicos, en particular

- 35 1. ARN pequeño de interferencia (o ARN corto de interferencia, comúnmente conocido como ARNpi, esto es, una molécula de ARN entre 20 y 25 nucleótidos de longitud. Más específicamente, los ARNpi están involucrados en la inhibición de la expresión de genes individuales, su uso para el tratamiento de la degeneración macular está actualmente en fase experimental).
2. Los microARN (microARN, ARNmi, son pequeñas moléculas de ARN no codificadoras que modulan la expresión de genes objetivo específicos. Pueden, por tanto, funcionar como supresores tumorales de formas hematopoyéticas malignas específicas).
- 40 3. ARN antisentido

Las sustancias enumeradas anteriormente se indican en lo sucesivo como "agentes terapéuticos" (TA en forma abreviada) o "especies activas".

45 La estructura molecular del TA debe portar un grupo funcional capaz de reaccionar con aldehídos, por ejemplo un grupo amina. Si este grupo no está presente en el TA, puede introducirse mediante técnicas de química orgánica sintética conocidas por los expertos en la materia. De esta manera, es posible enlazar prácticamente cualquier molécula a GAG.

50 Dentro del alcance de la presente invención, el uso de ácido hialurónico (HA) y sus sales indicadas anteriormente, es de particular interés. El HA utilizado en la presente invención puede derivarse de cualquier fuente; puede ser producido, por ejemplo, por extracción de la planta cresta de gallo, en forma fermentativa, o biotecnológicamente y tiene un peso molecular de 400 a 3×10^6 Da, preferiblemente de 1×10^3 Da a 1×10^6 Da, incluso más preferentemente de 10.000 a 750.000 Da.

55 La reacción de formación de derivados de la invención puede aplicarse tanto al polisacárido como tal como al mismo previamente modificado. Las redes moleculares se obtienen por lo tanto a partir de ácido hialurónico modificado de diferentes maneras conforme a métodos conocidos y en particular:

- 60 - HA convertido en sal con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 138572 B1);
- HYAFF®: ésteres de HA con alcoholes de la serie alifática, aril-alifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de esterificación, que puede variar de acuerdo con el tipo y la longitud del alcohol utilizado, preferentemente de 20 a 80%, mientras que el porcentaje restante de HA no esterificado se puede convertir en sal con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 216453);

- HYADD®: amidas de HA con aminas de la serie alifática, aril-alifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación de 0,1 a 50%, mientras que el porcentaje restante de HA no sometido a amidación puede ser convertido en sal con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 1095064);
- Derivados O-sulfatados de HA hasta el cuarto grado de sulfatación (EP 702699);
- ACP®: ésteres internos de HA con un porcentaje de esterificación no superior al 20%, preferiblemente de 0,05 a 10% de esterificación, mientras que el porcentaje restante de HA no esterificado puede formar sales con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 341745);
- desacetilados de HA: estos se derivan de la desacetilación de los residuos de N-acetil-glucosamina presentes en HA, con un porcentaje de desacetilación preferentemente en el intervalo de 0,1 a 30%, mientras que todos los grupos carboxílicos de HA pueden formar sales con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 1313772);
- HYOXX^{MR}: derivados de percarboxilato de HA obtenidos de la oxidación del hidroxilo primario de la fracción de N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación de 0,1 a 100% y preferiblemente de 25 a 75%. Todos los grupos carboxílicos de HA pueden formar sales con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 1339753).

De acuerdo a una modalidad preferida de la invención, el proceso de conjugación entre HA y agentes terapéuticos comprende las siguientes fases:

a) reacción de formación de derivados de HA con amino aldehídos protegidos SP-(CHO) en donde HA participa en la reacción con el grupo carboxílico que forma una amida con la amina del amino-aldehído. Este pasaje se realiza preferentemente a partir de HATBA (sal tetrabutilamonio de HA) u otra sal soluble en un disolvente orgánico aprótico polar (DMSO, NMP, DMF, carbonatos orgánicos). El compuesto intermedio activado pero que puede ser aislado se obtiene de este pasaje.

a1) hidrólisis del compuesto intermedio activado, es decir, HA-SP-(CHO) → HA-SP-CHO para liberar el grupo aldehído: reacción con ácido fosfórico dentro de un intervalo de pH de 1,5-3, preferiblemente con un pH que varía entre 2,0 y 2,5, a una temperatura que va desde 25 a 65°C, preferiblemente de 40°C a 60°C, durante al menos 30 minutos;

b) reacción de conjugación del compuesto intermedio activado con la molécula de TA, preferentemente una proteína. Mediante la adición de la proteína bajo condiciones reductoras con cianoborohidruro de sodio, ocurre la formación de imina y por lo tanto una amina. Si el agente terapéutico seleccionado es un compuesto polifuncional, existe la posibilidad de crear diferentes isómeros posicionales con diferentes características químicas, físicas y biológicas. Esta condición típicamente se verifica en el caso de proteínas, de las cuales el interferón, que cuenta con 12 sitios potenciales de unión, representa un ejemplo. Cambiando el pH en el que se efectúa esta reacción, se genera preferentemente una adición de grupos funcionales en el N-terminal (pH 6,0) con todas las ventajas que esto implica o una adición de grupos funcionales con HA unido a la proteína en diferentes puntos, con un esquema no reproducible ($\text{pH} \geq 7,5$).

La química utilizada para preparar los conjugados de acuerdo con la presente invención permite seleccionar en forma efectiva el patrón de adición de grupos funcionales.

Este importante resultado se logró gracias a la utilización del grupo aldehído, cuya reactividad particular con respecto a ataques nucleofílicos permite una selectividad suficiente con respecto al poder nucleofílico del grupo entrante. Las condiciones específicas para ejercer convenientemente esta selectividad se determinan en caso a caso a través de optimizaciones progresivas. Volviendo al ejemplo de la especie activa polifuncional más importante, es decir, las proteínas, pueden encontrarse los grupos amina nucleofílicos en posiciones que tienen accesibilidades diferentes, pero sobre todo pueden distinguirse con respecto a su fuerza como bases, expresada como pKa. Los grupos amina en la posición ϵ presente en los residuos de lisina normalmente muestran un pKa en el intervalo de 9,3 a 9,5, mientras que los grupos amina en α en el carboxilo tienen un pKa normalmente de 7,6 a 8. Con el fin de favorecer la reacción de las aminas en ϵ debe realizarse el procedimiento de acoplamiento a un pH superior a 8,0, preferiblemente en el intervalo de 8,5 a 9,0; con el fin de favorecer la reactividad de las aminas en el N-terminal, por otra parte, el pH debe estar dentro del intervalo de 5,0 y 6,5 y preferiblemente entre 5,5 y 6,2. Este segundo caso es el más importante ya que las proteínas típicamente tienen sólo un grupo α -amina libre, situado en el extremo N-terminal. Estableciendo las condiciones de reacción para reaccionar predominantemente, este grupo amina conduce a la formación de un conjugado casi monodisperso entre GAG y las proteínas.

Aunque los valores de pH indicados en su mayoría representan las proteínas de interés para la presente invención, son indicativos ya que pueden cambiar ligeramente para moléculas diferentes.

Este procedimiento de síntesis permite obtener conjugados bioactivos, que tienen desempeños sustancialmente más elevados con respecto a los conjugados conocidos en el estado de la técnica. Mediante el estudio de las propiedades biológicas de estos nuevos conjugados, el solicitante ha encontrado de hecho características sustancialmente más elevadas con respecto a los conjugados poliméricos conocidos en el estado de la técnica.

En particular, los conjugados de la invención obtenidos después de la formación de derivados con ácido hialurónico mantienen las propiedades biológicas tanto del principio activo como del polisacárido de partida, pero se

caracterizan por diferentes propiedades mecánicas y reológicas. Las condiciones bajo las cuales se efectúa el procedimiento de acoplamiento son tales que no modifican la funcionalidad biológica del TA.

5 El solicitante ha aplicado en realidad el procedimiento de síntesis de acuerdo con la presente invención para sintetizar nuevos bioconjugados:

- entre ácido hialurónico (HA) e interferón (IFN α)
- entre ácido hialurónico y la hormona del crecimiento (hGH)
- entre ácido hialurónico (HA) y RNasa A
- 10 – entre ácido hialurónico e insulina,
- entre ácido hialurónico y calcitonina de salmón

(HA-sCT)

- 15 – entre ácido hialurónico e IL1-ra
- entre ácido hialurónico y Lubricina,

que son por lo tanto, un objetivo de la presente invención.

20 La preparación del conjugado HA-IFN α se describe en el Ejemplo 3. IFN alfa 2a humano recombinante es una proteína que tiene un peso molecular de alrededor de 20 kDa cuya estructura se caracteriza por 4 cisteínas que forman 2 puentes disulfuro y 12 grupos amina, de los cuales 11 en la cadena lateral de los residuos de lisina, además del extremo N-terminal. Cabe señalar que los dos puentes disulfuro presentes en la proteína nativa, que están incluidos entre los residuos 29 y 138, son fundamentales para la actividad biológica, por lo tanto las condiciones reductoras necesarias para aplicar el método de acuerdo con la patente estadounidense No. 7.417.021, serían destructivas.

25 Las condiciones de síntesis utilizadas son tales que permiten obtener un conjugado casi monodisperso, con el HA predominantemente enlazado al extremo N-terminal de la citoquina. Esta especificidad se refleja en el mantenimiento y/o aumento de la actividad biológica del IFN y/o otros bioconjugados, para los cuales se ha desarrollado el método de medición de acuerdo con el Ejemplo 4.

30 Se han efectuado experimentos de tomografía de fluorescencia sobre el mismo conjugado HA-IFN, para observar la biodistribución *in vivo* tras la administración endovenosa. A fin de permitir que se revele con esta técnica, se preparó el bioconjugado de acuerdo con el Ejemplo 6, para incluir una sonda fluorescente covalentemente enlazada. El perfil de biodistribución encontrado (Ejemplo 7) muestra que en una escala de tiempo bastante rápida, la fluorescencia se acumula predominantemente a nivel hepático y en menor medida en el área del pecho, debido al atrapamiento no específico en la microcirculación pulmonar. En períodos de tiempo más largos, también se observa una acumulación en la región pélvica, en particular en la región vesical, justificada no tanto por el mecanismo normal de excreción-absorción del bioconjugado, sino por la hidrólisis lenta y liberación de la sonda fluorescente. La evidencia de esta acumulación sustancial hepática y pulmonar revela una propiedad más interesante, que no se presenta por los conjugados conocidos en el estado de la técnica, es decir, la posibilidad de dirigir la especie terapéutica específicamente a ciertos tipos de tejido.

35 40 45 Un objetivo adicional de la invención, se refiere por lo tanto al uso en el campo médico de los conjugados de acuerdo con la invención, en particular en terapia antiviral y antitumoral. De acuerdo a una realización preferida, un objetivo de la invención se refiere a la utilización del conjugado HA-IFN como un sistema para estimular el sistema inmune con respecto a las infecciones de tipo viral, tales como hepatitis (preferiblemente por administración endovenosa) o patologías causadas por agentes virales, tales como, por ejemplo, herpes labial, genital y en infecciones causadas por el VPH (virus del papiloma humano) capaz de causar verrugas (preferiblemente por aplicación tópica) o cáncer de cuello uterino. El conjugado HA-IFN puede por lo tanto utilizarse también ventajosamente como agente antitumoral.

50 55 Como se muestra en el Ejemplo 10, el conjugado insulina-HA no sólo aumenta al doble la eficacia farmacológica del agente terapéutico, sino que también mantiene la capacidad de la insulina para controlar el nivel de glucosa basal con el tiempo. En este caso, se revela una propiedad adicional del bioconjugado, que consiste en la creación de sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos.

60 En el Ejemplo 9 que ilustra la preparación del bioconjugado HA-RNasa A, el mantenimiento de la actividad biológica de la enzima unida es aún más evidente, ya que la medición de la actividad enzimática se efectúa, directamente después de la concentración del sustrato con técnicas espectroscópicas.

65 El solicitante también verificó que, una vez conjugado con HA y administrado en forma endovenosa, el agente terapéutico muestra una rápida acumulación hepática y pulmonar cuantitativa. Este aspecto de la invención hace que su uso sea particularmente ventajoso en terapias relacionadas con patologías que interesan el hígado, como por

ejemplo, hepatopatías correlacionadas con virus, fibrosis hepática, cirrosis hepática, enfermedad de Gaucher, tumores de hígado y pulmón. La cinética y efectividad del atrapamiento hepático y pulmonar del conjugado dependen en HA, modificando su peso molecular, el perfil de acumulación puede modificarse hasta que se vuelva insignificante.

5 Por otro lado, la administración endovenosa, no es la única forma posible. El solicitante de hecho ha verificado que la administración subcutánea del conjugado es efectiva en la liberación lenta del TA (Ejemplo 10).

10 El Ejemplo 11 ilustra el procedimiento de preparación del bioconjugado HA-calcitonina: la calcitonina es una hormona polipeptídica lineal de 32 amino ácidos que se produce en los seres humanos principalmente por parte de las células parafoliculares de la tiroides, esta hormona participa en el metabolismo del calcio (Ca^{2+}) y el fósforo. Para ser específicos, la calcitonina afecta los niveles de Ca^{2+} en sangre de cuatro formas:

- 15 • Inhibe la absorción de Ca^{2+} por los intestinos
- Inhibe la actividad de los osteoclastos en huesos
- Inhibe la reabsorción de fosfato por el los túbulos del riñón
- Aumenta la reabsorción absoluta de Ca^{2+} y Mg^{2+} por los túbulos del riñón, calcitonina es una hormona renal de conservación de Ca.

20 Por lo tanto, se utiliza la calcitonina para el tratamiento de:

- Osteoporosis postmenopáusica
- Hipocalcemia
- Enfermedad de Paget
- 25 • Metástasis ósea

La calcitonina tiene vidas medias cortas de absorción y eliminación de 10-15 minutos y 50-80 minutos, respectivamente. La calcitonina de salmón se degrada principalmente y casi exclusivamente en los riñones, formando fragmentos farmacológicamente inactivos de la molécula.

30 El nuevo bioconjugado HA-calcitonina, es por lo tanto, extremadamente importante, debido al hecho de que, como se describe en el Ejemplo 11, revela una acción más prolongada de hipocalcemia con respecto a la hormona libre, permitiendo un efecto más marcado que nos permite estudiar nuevos usos clínicos tales como la administración intraarticular para la protección de los cartílagos y huesos en patologías degenerativas tales como la artritis reumatoide y la artrosis.

35 El Ejemplo 13 ilustra el procedimiento de síntesis del bioconjugado HA-lubricina: la lubricina está presente en el fluido sinovial y en la superficie del cartílago articular y por lo tanto desempeña un papel importante en la lubricación de las articulaciones y la homeostasis sinovial. Los fibroblastos sinoviales humanos han mostrado que producen lubricina.

40 El funcionamiento óptimo de las articulaciones sinoviales depende de los coeficientes extremadamente bajos de fricción entre los tejidos que se articulan. Normalmente, se mantiene una superficie contigua, bien lubricada, en el cartílago articular. Durante la osteoartritis (OA), sin embargo, una lubricación reducida contribuye a la degradación de la matriz del cartílago y de la fibrilación; esto a su vez contribuye al dolor y la disfunción de la articulación. Una lubricación reducida también conduce al dolor y la disfunción de la articulación en otras formas de artritis, incluyendo la artritis reumatoide (RA). También se ha detectado la expresión de lubricina y la proteína localizada en el tendón, menisco, pulmón, hígado, corazón, hueso, ligamento, músculo y piel.

45 Para estos tejidos, una superficie lubricada también contribuye a un funcionamiento óptimo. Además de requerir una superficie lubricada, la función normal del tendón requiere de la prevención de la adhesión celular a las superficies de los tendones.

50 Por lo tanto, el solicitante está describiendo el nuevo uso para el bioconjugado novedoso de HA-lubricina, como lubricantes, agentes antiadhesivos y/o suplementos intraarticulares, por ejemplo, para articulaciones sinoviales, meniscos, tendones, peritoneo, pericardio y pleura, permitiendo un tiempo de residencia *in situ* y una mayor efectividad que la descrita para los TA no conjugados.

55 En este contexto, los conjugados de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse ventajosamente como sistemas para la liberación controlada de los TA. Estos sistemas son extremadamente útiles para los TA, que tiene una ventana de efectividad terapéutica limitada a un período de tiempo restringido. Los ejemplos típicos de los TA con estas características son proteínas terapéuticas, que comprenden citoquinas, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, tales como por ejemplo GH, glucocerebrosidasa, SOD, IL1-ra, insulina y análogos, GM-CSF, GCSF, EPO y en general los ESA descritos anteriormente, interferones de tipo I, II, III, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión y otros. Por ejemplo, la insulina, fue el primer fármaco biotecnológico y continúa teniendo importancia

60 65

primordial ya que es fundamental para el creciente número de personas que padecen diabetes. Actualmente se encuentran disponibles formas de retardo de la insulina, pero no existen en el mercado sistemas de administración de fármacos (conjugación con polímeros, micro-nanopartículas).

5 Como se muestra en el Ejemplo 10, el método de conjugación de acuerdo con la presente invención es adecuado para la creación de sistemas de liberación controlada que son eficaces en la liberación lenta del TA en forma activa y la prolongación de la acción, multiplicando por dos su eficacia terapéutica. También debe tenerse en cuenta el aspecto adicional relacionado con el cumplimiento por parte de los pacientes que en el presente régimen terapéutico deben someterse a varias administraciones subcutáneas diarias con evidentes molestias en su vida social y en el agotamiento progresivo de los sitios adecuados para la inyección. Consideraciones análogas también son válidas para las otras sustancias terapéuticas enumeradas en el presente documento.

15 Los conjugados entre el ácido hialurónico (preferiblemente sus derivados) y agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención pueden por lo tanto ser ventajosamente utilizados para la preparación de biomateriales con mejores características de efectividad, biocompatibilidad, biodisponibilidad, la posibilidad de direccionar el TA a tipos específicos de células o tejidos de órganos y la posibilidad de mejorar el perfil farmacocinético por la liberación controlada y mayor duración del TA.

20 Pueden utilizarse ventajosamente los conjugados entre el ácido hialurónico y agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención para la preparación de composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral o no parenteral, que comprenden formulaciones para uso oral, soluciones inyectables mediante inyección intradérmica, endovenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intratecal, intracardiaca, intrasinovial, intraperitoneal, intravesical o geles, cremas, ungüentos, espumas, polvo seco, aerosoles, emplastos cutáneos o transdérmicos para uso tópico, pero también preparaciones farmacéuticas para uso rectal, intravaginal, sublingual, intraocular.

25 De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración endovenosa para una localización hepática y/o pulmonar. De acuerdo con una realización más preferida, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración subcutánea por medio de sistemas de liberación controlada.

30 Los conjugados de acuerdo con la invención mantienen la función biológica de los principios activos contenidos en ellos, pero con respecto a la forma aislada de estos, pueden utilizarse como sistemas para su direccionamiento y liberación controlada. El direccionamiento hacia tejidos específicos o tipos de células se obtiene seleccionando adecuadamente el tipo de GAG o derivado semisintético, mientras que la cinética de liberación es modulada por la naturaleza del enlace entre el GAG o el derivado semisintético y especies activas.

35 Por último, la invención se refiere a un biomaterial caracterizado por una matriz que comprende los conjugados que se definieron anteriormente.

40 A continuación se describe la presente invención para fines ilustrativos pero no limitantes, de acuerdo con sus realizaciones preferidas con especial referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en donde:

45 La Figura 1 muestra el esquema de síntesis del GAG con la función aldehído, representado para propósitos ilustrativos por el ácido hialurónico (HA), mientras que el prototipo del brazo espaciador que porta el grupo aldehído protegido representado es 4-amino-butiraldehído-diacetal.

La Figura 2 muestra el espectro de RMN H del ácido hialurónico con la función aldehído. Este es un espectro de RMN de protones registrado en agua deuterada. La señal del protón de metilo del grupo acetilo presente en HA (1,88 ppm) está flanqueada por una señal adicional que es atribuida al protón del metilo del acetal (1,05 ppm).

50 La Figura 3 muestra imágenes tomográficas de fluorescencia después de administración endovenosa del conjugado HA-IFN marcado con una sonda fluorescente en ratones.

La Figura 4 muestra los resultados de la prueba de citotoxicidad (ATPlite) en HA-IFN llevada a cabo en una línea celular primaria humana de carcinoma de ovario (pdOVCA1), sensible a la acción antiproliferativa de IFN.

La Figura 5 muestra el cromatograma del conjugado HA-IFN que muestra respectivamente IFN libre y conjugado.

55 La Figura 6 muestra el cromatograma del conjugado HA-hGH que muestra respectivamente hGH libre y conjugado.

La Figura 7 muestra el cromatograma del conjugado HA-RNasa que muestra respectivamente enzima ARNpi libre y conjugada.

La Figura 8 muestra el cromatograma del conjugado HA-insulina que muestra respectivamente insulina libre y conjugada.

60 La Figura 9 muestra la actividad biológica *in vivo* del conjugado insulina-HA administrado subcutáneamente en una dosis de 5 µg o 20 µg de insulina mediante la determinación de los niveles de glucosa en la sangre de los animales tratados con respecto a los animales de control y no tratados.

La Figura 10 muestra la eficacia *in vivo* del HA-IFN bioconjugado contra IFN contra el producto no tratado.

65 La Figura 11 muestra el análisis de exclusión dimensional de HA-sCT utilizando una columna GF-250 (Agilent, 4,6 x 25 cm) con un flujo de 0,3 mL/min. Eluyente: regulador Na₂HPO₄ 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 7,2, que contiene 20% de acetonitrilo. Se controló el efluente de la columna mediante la medición de la absorbancia a 280 nm. Se removió

completamente la calcitonina que eluye en 9,2 minutos. Se inyectó el regulador de la corrida para demostrar que el pico a los 11 minutos corresponde al final del volumen de separación de la columna utilizada.

La Figura 12 representa el perfil del nivel de calcio en la sangre después de la administración por vía endovenosa de sCT, HA-sCT, HA y solución salina. Los datos representan el promedio de tres ratas y están representados con los promedios relativos de las desviaciones estándar.

La Figura 13 muestra el análisis de exclusión dimensional de HA-IL1- α utilizando una columna GF-250 (Agilent, 4,6 x 25 cm) con un flujo de 0,3 mL/min. Eluyente: regulador de Na_2HPO_4 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 7,2 que contiene 20% de acetonitrilo. Se controló el efluente de la columna mediante la medición de la absorbancia a 280 nm. El IL-1- α que eluye en 9,75 minutos fue completamente removido.

La invención será descrita a continuación con mayor detalle en los siguientes ejemplos, con el propósito, sin limitar sus posibles aplicaciones, de proporcionar una mejor comprensión e ilustrar sus posibles realizaciones, que en cualquier caso pueden ser variadas por los expertos en el campo sin comprometer su espíritu básico.

Ejemplos

El esquema en la Figura 1 ilustra la sucesión de las reacciones del procedimiento de síntesis de conjugados GAG-TA descrito anteriormente, que describe la estructura molecular de las especies involucradas. El ácido hialurónico (HA) está representado para fines ilustrativos como GAG, mientras que el prototipo del brazo espaciador que porta el grupo aldehído protegido representado es 4-amino-butanal-diacetal.

Ejemplo 1: Síntesis de un derivado aldehído de HA que tiene un peso molecular promedio de 200 kDa

Se disuelven 5,00 g de ácido hialurónico de una fracción de hialastina de origen fermentativo de una sal de sodio (PM 200 kDa) en 250 ml de agua y la solución resultante es percolada a través de una columna de vidrio cargada previamente con 100 cm³ de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio. Se recoge y liofiliza una solución de una sal de HA eluida de TBA. Se obtienen 7,50 g de producto, que se disuelven en 400 ml de N-metil-pirrolidona (NMP).

Después de la disolución completa de la sal de HA, se añaden 300 mg de carbonil-diimidazol (CDI), 450 μ l de ácido metanosulfónico y 387 mg de dietilacetal 4-aminobutiraldehído y se deja reaccionar la mezcla a 40°C durante la noche bajo agitación suave. Se detiene la reacción mediante la adición de 0,1 volúmenes de una solución acuosa saturada de NaCl y, después de 30 minutos, se agrega la solución a 3 volúmenes de etanol absoluto para separar el derivado de HA de acuerdo con la Figura 1 de la mezcla de reacción.

Se lava nuevamente el precipitado en etanol y finalmente se seca con alto vacío a 40°C. Se obtienen 4,49 g del derivado, que contiene 13% en moles de grupos aldehído protegidos con respecto a las unidades repetitivas de HA. El espectro de RMN de este producto, cuya síntesis se ha efectuado como se indica en el presente documento, se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 2: Síntesis de un derivado de aldehído de HA que tiene un peso molecular promedio de 100 kDa

Se disuelven 4,00 g de la sal sódica del ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 100 kDa, de origen extractivo, en 500 ml de agua para preparaciones inyectables. La solución obtenida es llevada a una temperatura de 4°C y se añaden luego 290 mg (15% en moles) de EDC, 175 mg de NHS y 245 mg de 4-aminobutiraldehído dietilacetal. Después de 18 horas de reacción, se precipita el producto mediante la adición de 4 volúmenes de etanol absoluto y se lava con mezclas hidroalcohólicas con un contenido creciente de etanol hasta llegar a etanol absoluto. El producto demuestra estar sustituido con 11,9% moles/mol.

Ejemplo 3: Síntesis de un conjugado de HA-interferón

Se disuelven 3,00 g de un derivado aldehído de HA (compuesto intermedio activado) de acuerdo con el Ejemplo 1 hasta una concentración de 10 mg/ml en medio ácido por la presencia de ácido fosfórico a una temperatura de 60°C durante 2 horas. Se añaden 4×10^{-5} moles de interferón alfa 2a humano recombinante, 4×10^{-4} moles de cianoborohidruro al producto hidrolizado previamente enfriado y se regula el pH en 6,0. Después de 24 horas de reacción, se purifica el aducto por diálisis contra agua y luego se liofiliza. Se verifica la pureza por cromatografía de exclusión dimensional (GPC), con el correspondiente cromatograma ilustrado en la Figura 5.

El bioconjugado HA-IFN fue sometido a SDS-PAGE + transferencia tipo Western, con anticuerpos anti-IFN alfa humanos. Se reveló la presencia de proteína libre inferior al 5% por medio de técnicas densitométricas. Este resultado es coherente con lo que surgió de la cromatografía de exclusión dimensional (Figura 5).

Ejemplo 4: Determinación *in vitro* de la actividad biológica del conjugado HA-IFN

La determinación de la actividad biológica del conjugado HA-IFN se efectuó por medio de un método preparado con este fin.

Los experimentos se llevaron a cabo en una línea celular primaria humana de carcinoma de ovario (pdOVCA1), sensible a la acción antiproliferativa de IFN. Las células se sembraron en una concentración de 10.000 células/pozo y se incubaron solas y en presencia de:

- 5
- bioconjugado de HA-IFN preparado como en el Ejemplo 3 en una concentración de 1.000, 500, 250 U/ml como unidades equivalentes de IFN;
 - interferón alfa 2a humano recombinante en una concentración de 1.000, 500, 250 U/ml;
 - HA que tiene un peso molecular de 200 kDa, es decir, el mismo utilizado para preparar el conjugado, en una
- 10

Después de 5 días de incubación, se midió la vitalidad celular mediante el ensayo de citotoxicidad de ATPlite. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 4, donde se expresa la vitalidad de las células en porcentaje con respecto al nivel obtenido para las células incubadas solas.

- 15
- Como puede verse, el interferón alfa 2a humano recombinante ejerce una acción citotóxica marcada con respecto a esta línea celular. Esta propiedad se mantiene casi cuantitativamente en el conjugado, mientras que el HA no conjugado no es capaz de ejercer esta acción.

20

Ejemplo 5: Determinación *in vivo* de la actividad biológica del conjugado HA-IFN

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando la línea celular de carcinoma de ovario (pdOVCA1) (sensible a la acción antiproliferativa del IFN) inoculada en forma intraperitoneal en ratones pertenecientes al grupo SCID F, 3×10^6 células/ratón. El experimento se realizó utilizando 3 diferentes grupos de animales, 6 ratones por grupo:

- 25
- 1er grupo: tratamiento en el día 7, 14 y 21 con interferones alfa 2a humanos recombinantes (IFN) en una concentración de 1.000 U/ml, como control positivo;
- 2do grupo: tratamiento en el día 7, 14 y 21 con el objetivo bioconjugado de la presente invención (HA-IFN) preparado como se indica en el Ejemplo 3, en una concentración de 1.000 U/ml como unidades equivalentes de IFN;
- 3er grupo: representa el control farmacológicamente no tratado sino únicamente inoculado con pdOVCA1.
- 30

Los resultados se resumen en la Figura 10: la experimentación anterior muestra claramente la mayor eficacia *in vivo* del bioconjugado HA-IFN contra el fármaco IFN de referencia. Como una confirmación adicional del resultado, las evaluaciones estadísticas indican la considerable importancia del bioconjugado contra el control no tratado, mientras que no se revela ninguna importancia estadística del resultado obtenido a partir del control positivo contra el producto no tratado.

35

40

Ejemplo 6: Síntesis de un conjugado de HA-interferón marcado con una sonda fluorescente

Se debe tener cuidado para efectuar cada paso bajo condiciones de esterilidad, se marcan 12,5 mg de interferón alfa 2a humano recombinante con 0,5 mg de Cy5 de acuerdo con las instrucciones recibidas del proveedor (GE Healthcare). Se efectúa una reacción de acoplamiento con la proteína marcada, purificada por diálisis exhaustiva contra agua, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el Ejemplo 3. Se obtienen 90,4 mg de producto.

45

Ejemplo 7: Biodistribución *in vivo* por tomografía de fluorescencia del conjugado HA-interferón marcado con una sonda fluorescente

Se determinó la biodistribución del conjugado después de administración endovenosa *in vivo* mediante un sistema de formación de imágenes ópticas preclínicas Explore Optix (GE Healthcare). El sistema consiste en un aparato para medir la bioluminiscencia que se adapta para reconstruir tomográficamente todas las imágenes de cuerpo entero de pequeños roedores. La tecnología utilizada es "conteo de fotones individuales correlacionado con el tiempo", para medir la absorción y fluorescencia (con su tiempo de vida) de sondas fluorescentes, permitiendo su localización tridimensional. Las imágenes mostradas en la Figura 3 representan el resultado del experimento de inoculación en el ratón anestesiado del conjugado marcado de acuerdo con el Ejemplo 6. Antes de la inoculación, no se puede encontrar ninguna señal. Inmediatamente después de la inoculación, se observa una acumulación hepática, asociada con una fluorescencia menos intensa en la zona pulmonar adyacente, que es predominantemente causada por un atrapamiento no específico en la microcirculación pulmonar. Una acumulación en la región pélvica está asociada con estas señales, que en una escala de tiempo mayor conduce a una acumulación vesical.

50

55

60

Ejemplo 8: Síntesis de un conjugado HA-hGH

Se disuelve 1,00 g del derivado aldehído de HA de acuerdo con el Ejemplo 1 en una concentración de 10 mg/ml en medio ácido por la presencia de ácido fosfórico a una temperatura de 60°C durante 2 horas. Se añaden 2×10^{-5} moles de hormona de crecimiento humana recombinante, 2×10^{-4} moles de cianoborohidruro al producto hidrolizado previamente enfriado y se regula el pH a 6,0. Después de 24 horas de reacción, se purifica el aducto por diálisis contra agua y luego se liofiliza.

65

Ejemplo 9: Síntesis de un conjugado HA-ARNpi A

Se disuelve 1,00 g del derivado aldehído de HA de acuerdo con el Ejemplo 1 en una concentración de 8 mg/ml en medio ácido por la presencia de ácido fosfórico a una temperatura de 50°C durante 2 horas. Se regula el pH a 6,0 y se añaden 2×10^{-5} moles de RNasa A y 2×10^{-4} moles de cianoborohidruro al producto hidrolizado previamente enfriado. A este pH tiene lugar la reacción específicamente en el extremo N-terminal de la proteína. Después de 24 horas de reacción, se purifica el aducto por diálisis contra agua y luego se liofiliza. El correspondiente cromatograma de GPC registrado bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 14 puede encontrarse en la Figura 7. Este tipo de conjugado es óptimamente adecuado para medir *in vitro* la actividad residual de la enzima, usando un kit específico basado en la evaluación del aumento de la absorción a 287 nm con el tiempo, determinado por la hidrólisis del sustrato sintético específico de monofosfato de 2',3'-citidina cíclica (2',3'-CMC).

Una comparación de la actividad residual de la enzima, libre o unida a HA, produce los siguientes resultados:

PRODUCTO	% de Actividad enzimática relativa
ARNpi A	100
HA-Ac-ARNpi A	95,23

El mantenimiento cuantitativo de la actividad enzimática muestra que la reacción de conjugación de ninguna manera degrada la proteína.

Ejemplo 10: Síntesis y actividad *in vivo* del conjugado HA-insulina

Se disuelven 3,00 g del derivado aldehído de HA (compuesto intermedio activado) de acuerdo con el Ejemplo 1 a una concentración de 10 mg/ml en medio ácido por la presencia de ácido fosfórico a una temperatura de 60°C durante 2 horas. Se añaden 4×10^{-5} moles de insulina, 4×10^{-4} moles de cianoborohidruro al producto hidrolizado previamente enfriado y se regula el pH a 6,0. Después de 24 horas de reacción, se purifica el aducto y se analiza mediante cromatografía de exclusión dimensional; el cromatograma relativo es visible en la Figura 8. La actividad *in vivo* del conjugado se evalúa en un modelo de diabetes inducida tipo I en una rata tras la administración de estreptozocina a una dosis de 70 mg/Kg.

El conjugado HA-insulina se administra de manera subcutánea a una dosis de 5 o 20 µg de insulina equivalente. La actividad biológica del conjugado se prueba a través de la determinación de los niveles de glucosa en la sangre de animales, medida por medio de kits comerciales (OneTouch® II, LifeScan, Johnson & Johnson). El control consiste de ratas sanas (grupo 1) y ratas con diabetes inducida tratadas con insulina (grupo 2). Los resultados se ilustran en la Figura 9.

Las ratas tratadas con insulina pertenecientes al grupo 2 muestran una disminución repentina en el nivel de glucosa en sangre, que sin embargo vuelve a valores altos en un lapso de tiempo relativamente corto. El conjugado HA-insulina tiene un efecto que se ejerce más lentamente, pero tiene una duración considerablemente prolongada en el tiempo, llevando la concentración de glucosa, en un lapso de tiempo de 5 horas, a un nivel menor que el grupo tratado solo con insulina y se mantiene este efecto durante las 24 horas de duración del experimento.

Estos resultados demuestran que el bioconjugado de acuerdo con la invención es capaz de duplicar la efectividad del fármaco conjugado (en este caso específico insulina) manteniéndola con el tiempo.

Por lo tanto, el ensayo muestra que los bioconjugados de acuerdo con la presente invención o biomateriales preparados a partir de estos, son adecuados para producir sistemas para la liberación prolongada de agentes terapéuticos, incluyendo proteínas terapéuticas, debido a su capacidad para aumentar la efectividad terapéutica, manteniéndola con el tiempo.

Ejemplo 11: Síntesis y determinación de la actividad biológica del conjugado HA-calcitonina (HA-sCT)

Se disuelven 10 mg de HA-acetal en una concentración de 10 mg/ml en ácido fosfórico 10 mM, pH 2,1 a una temperatura de 60°C durante 1 hora. Después de regular el pH a 6,0 con NaOH 0,1 N y dejar enfriar la solución a temperatura ambiente, se añaden $1,25 \times 10^{-3}$ mmoles de calcitonina de salmón (sCT) al producto hidrolizado y después de 30 minutos, $5,8 \times 10^{-2}$ mmoles de cianoborohidruro de sodio. Después de 48 horas de reacción, se purifica el aducto y se analiza por diálisis contra agua (2 L) durante 24 horas utilizando una membrana con un corte de 50 kDa. Después de la diálisis, se liofiliza el producto, se determina la concentración de proteína mediante el ensayo de ácido bicinónico (BCA; Sigma Aldrich) y absorción a 280 nm.

La pureza del conjugado se verifica por medio de cromatografía de filtración de gel (GPC), el cromatograma correspondiente se muestra en la Figura 11.

La carga de calcitonina en el conjugado es de 9,1% (p/p).

La actividad *in vivo* de la calcitonina conjugada (HA-sCT) fue evaluada después del efecto hipocalcémico medido después de la administración endovenosa en ratas.

5 Se llevaron a cabo los experimentos en ratas Sprague-Dawley con un peso de 180-250 g. Las ratas fueron divididas en 4 grupos de 3 animales en cada grupo y se administraron diferentes preparaciones a cada grupo: sCT, HA-sCT, HA y solución salina. Se disolvieron sCT y HA-sCT y HA en una solución fisiológica y se filtró con un filtro de 0,22 μm . Se administraron calcitonina y conjugado en una dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (equivalente de calcitonina). Se administró HA como control en las mismas cantidades presentes en el conjugado. Después de la administración a través de la vena caudal, se tomaron muestras de sangre en tiempos preestablecidos (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 horas) y se conservaron en el refrigerador hasta el momento de usarlas. Después de centrifugación durante 20 minutos a 1.000 x g, se recolectó el plasma y se evaluó la presencia de calcio en el plasma por medio de un ensayo colorimétrico (kit de ensayo colorimétrico de calcio, Vinci-Biochem).

10 Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 12, donde se expresa el porcentaje de variación del calcio en el plasma con el tiempo. El sCT tiene su efecto máximo una hora después de la administración y, después de 6 horas, los niveles de calcio se elevan de nuevo hacia los valores básicos. El conjugado, por el contrario, muestra una acción más prolongada de hipocalcemia y un efecto más marcado. El HA y la solución salina no causan ninguna variación en el calcio en la sangre.

20 Ejemplo 12: Síntesis de un conjugado HA-IL1-ra

Se disuelven 10 mg de HA-acetal en una concentración de 10 mg/ml en ácido fosfórico 10 mM, pH 2,1 a una temperatura de 60°C durante 1 hora. Después de regular el pH a 6,0 con NaOH 0,1 N y dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente, se añaden $2,46 \times 10^{-4}$ mmoles de IL-1-ra al producto hidrolizado y después de 30 minutos, $1,16 \times 10^{-2}$ mmoles de cianoborohidruro de sodio. Después de 48 horas de reacción, se purifica el aducto por diálisis contra un regulador de fosfato 0,1 M, pH 6,5 (2 L) durante 24 horas utilizando una membrana con un corte de 50 kDa. Después de la diálisis, se determina la concentración de proteína mediante un ensayo colorimétrico (ensayo BCA; Sigma Aldrich). El conjugado es mantenido en solución a 4°C. La pureza se verifica por medio de cromatografía de filtración en gel (GPC), el cromatograma correspondiente se muestra en la Figura 13.

30 Ejemplo 13: Síntesis de un conjugado HA-Lubricina

Se disuelven 10 mg de HA-acetal en una concentración de 10 mg/ml en ácido fosfórico 10 mM, pH 2,1 a una temperatura de 60°C durante 1 hora. Después de regular el pH a 6,0 con NaOH 0,1 N y dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente, se añaden $2,50 \times 10^{-4}$ mmoles de Lubricina al producto hidrolizado y después de 30 minutos, $1,16 \times 10^{-2}$ mmoles de cianoborohidruro de sodio. Después de 48 horas de reacción, se purifica el aducto por diálisis contra un regulador de fosfato 0,1 M, pH 6,5 (2 L) durante 24 horas utilizando una membrana con un corte de 50 kDa. Después de la diálisis, se determina la concentración de proteína mediante un ensayo colorimétrico (ensayo BCA; Sigma Aldrich). El conjugado es mantenido en solución a 4°C. La pureza se verifica por medio de cromatografía de filtración en gel (GPC).

Ejemplo 14: Caracterización mediante GPC de los conjugados sintetizados

45 Para determinar la presencia de la proteína libre en los conjugados sintetizados, se someten las preparaciones de acuerdo con los Ejemplos 3, 8, 9 y 10 a cromatografía de exclusión dimensional de alta presión. Para el conjugado HA-IFN de acuerdo con el Ejemplo 3 y HA-insulina de acuerdo con el Ejemplo 9, se registró el cromatograma (Figura 5 y Figura 8) en una columna GF-250 Agilent con un eluyente formado por un regulador de fosfato 0,2 M a pH 7,0 + NaCl 10^{-1} M al 80% + acetonitrilo al 20%, con un flujo de 0,3 ml/min.

50 Los cromatogramas relativos a los otros conjugados (Figura 6, Figura 7) se registraron con una columna Superose 12, detección UV a 280 nm, con un eluyente consistente en un regulador de fosfato 10^{-1} M a pH 7,2 + NaCl 0,2 M al 80% + acetonitrilo al 20%, con un flujo de 0,8 ml/min.

55 Ejemplo 15: Síntesis del derivado aldehído de sulfato de condroitina como el compuesto intermedio activado

Se disuelven 5,00 g de sulfato de condroitina de origen extractivo (con el grupo sulfato predominantemente en la posición 4 de la unidad de N-acetil galactosamina) en 250 ml de agua y la solución resultante es percolada a través de una columna de vidrio cargada previamente con 100 cm^3 de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio. La solución de sal de TBA eluida de sulfato de condroitina es recolectada y liofilizada. Se obtienen 7,75 g de producto, que se disuelven en 400 ml de N-metil-pirrolidona (NMP).

60 Después de la disolución completa, se añaden 345 mg de carbonil-diimidazol (CDI), 460 μl de ácido metanosulfónico y 396 mg de dietilacetal 4-aminobutiraldehído y se deja reaccionar la mezcla a 45°C durante la noche bajo agitación suave.

65

ES 2 600 358 T3

El procedimiento de formación del derivado se detiene añadiendo 0,1 volúmenes de una solución acuosa saturada de NaCl. La mezcla de reacción se dializa contra una solución salina por NaCl al 0,9%, luego contra agua pura y se liofiliza. Se obtienen 4,13 g de un sólido granulado de color marrón claro.

5

Reivindicaciones

- 5 1. Un procedimiento para la síntesis de conjugados de glicosaminoglicanos (GAG) con moléculas biológicamente activas, que comprende las siguientes fases:
- 10 a) la formación de derivados del GAG con al menos un grupo aldehído (CHO), por la reacción del GAG con una molécula espaciadora (SP), en donde dicha molécula espaciadora comprende, como primer grupo funcional, uno o más grupos aldehído (SP-CHO), estando dichos grupos aldehído (SP-(CHO)) opcionalmente protegidos y, como segundo grupo funcional, un grupo nucleofílico apto para conjugación con el GAG;
- 15 a1) hidrólisis del compuesto intermedio activado con ácidos acuosos cuando dichos uno o más grupos aldehído están protegidos;
- b) reacción del aducto obtenido en la fase a) o a1) con al menos una molécula biológicamente activa (TA), caracterizado porque dicha molécula biológicamente activa (TA) comprende un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo aldehído y se selecciona del grupo que consiste de polipéptidos y proteínas, ácidos nucleicos y agentes terapéuticos que contienen al menos un grupo amina no fundamental para el funcionamiento biológico, siendo dicho agente terapéutico seleccionado de grupo que consiste de fármacos antitumorales; agentes antivirales y antibióticos; inhibidores de proteasa y polimerasa; fármacos antiinflamatorios, analgésicos, anestésicos, contra el dolor; narcóticos; esteroideos; minoxidil.
- 20 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha protección del grupo aldehído tiene lugar con el uso de hemiacetales o acetales a través de la reacción de los aldehídos con alcoholes alifáticos o aril alifáticos o dioles seleccionados de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, sec-butanol, terc-butanol, iso-butanol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol para formar acetales que pueden ser aislados.
- 25 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicha molécula espaciadora SP-(CHO) es un aminoaldehído, preferiblemente protegido como acetal.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha fase a1) para la hidrólisis del compuesto intermedio activado con ácidos acuosos para liberar el grupo aldehído, tiene lugar a un pH en el intervalo de 1,5 a 3,0, preferiblemente con un pH en el intervalo de 2,0 a 2,5, a una temperatura en el intervalo de 25 a 65°C, preferiblemente de 40 a 60°C, durante al menos 30 minutos.
- 30 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho grupo nucleofílico de la fase a) es un grupo amina, en forma libre o de sal, o un grupo alcohol.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho grupo funcional de la molécula biológicamente activa capaz de reaccionar con aldehídos, es un grupo amina que puede estar naturalmente presente o introducido por síntesis.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho GAG se selecciona del grupo que consta de ácido hialurónico (HA), sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparano, o sus derivados, seleccionados de sales con metales alcalinos y alcalinotérreos seleccionados de sodio, potasio, magnesio, calcio; sales de amonio cuaternario, ésteres carboxílicos, O-ésteres, amidas, derivados percarboxilados, derivados O-sulfatados, derivados N-desacetilados; derivados N-sulfatados.
- 45 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde cuando dicha molécula biológicamente activa es un polipéptido o una proteína, se selecciona del grupo que consiste de:
- 50 - Inmunomoduladores, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste de interferones de tipo I, interferones de tipo II, interferones de tipo III;
- Factores de crecimiento, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste de eritropoyetinas y en general moléculas identificadas como ESA, factores de estimulación de eritropoyesis tal como factores GM-CSF y G-CSF, factores de crecimiento para los huesos y cartílagos;
- 55 - Citoquinas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste de IL2, TNF y sus antagonistas del receptor con sus receptores solubles, IL1-ra, y los receptores solubles de citoquinas proinflamatorias;
- Glicoproteínas;
- Enzimas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste de superóxido dismutasas, RNasa y glucocerebrosidasa;
- Anticuerpos;
- 60 - Hormonas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste de calcitonina, insulina y sus análogos, y la hormona de crecimiento.
- 65 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde cuando dicha molécula biológicamente activa es un fármaco antitumoral, se selecciona del grupo que consiste de taxanos, alcaloides de la Vinca, camptotecinas, ureas sustituidas; complejos de platino, oro, plata u otros metales, metotrexato, trimetrexato, pemetrexed, tetrahidrolato; análogos de pirimidina, citidina, purina; antibióticos oncológicos y antracenedionas.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde cuando dicha molécula biológicamente activa es un ácido nucleico, se selecciona del grupo que consiste de: ARN pequeño de interferencia, microARN, ARN antisentido.
- 5 11. El procedimiento de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la síntesis de conjugados de ácido hialurónico o derivados de los mismos con moléculas biológicamente activas, que comprende las siguientes fases:
- 10 a) formación de derivados de HA, o de una sal soluble de HA en un disolvente polar orgánico aprótico, con al menos un grupo aldehído (CHO), a través de la reacción de HA con amino-aldehídos protegidos efectuada en un medio acuoso en EDC + NHS para formar una amida o en un disolvente aprótico;
- a1) hidrólisis del compuesto intermedio de la fase a) con el fin de liberar el grupo aldehído, efectuado en ácido fosfórico a un pH en el intervalo de 1,5 a 3,0, preferiblemente con un pH en el intervalo de 2,0 a 2,5, a una temperatura en el intervalo de 25 a 65°C, preferiblemente de 40 a 60°C, durante al menos 30 minutos;
- 15 b) reacción del compuesto intermedio obtenido en la fase a) o a1) con una molécula biológicamente activa (TA) caracterizado porque comprende un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo aldehído.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho ácido hialurónico o derivados del mismo se seleccionan de ácido hialurónico que forma una sal con bases orgánicas y/o inorgánicas; ésteres de ácido hialurónico con alcoholes de la serie alifática, arilalifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica con un porcentaje de esterificación en el intervalo de 20 a 80%; amidas de HA con aminas de la serie alifática, arilalifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación en el intervalo de 0,1 a 50%; derivados O-sulfatados del ácido hialurónico hasta el cuarto grado de sulfatación; ésteres internos de ácido hialurónico con un porcentaje de esterificación inferior al 20%; compuestos desacetilados de ácido hialurónico con un porcentaje de desacetilación de 0,1 a 30%; derivados percarboxilados de ácido hialurónico con un grado de percarboxilación de 0,1 a 100% y, preferiblemente, entre 25 y 75%.
- 20 13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde dicha molécula biológicamente activa es una proteína o polipéptido y dicho grupo funcional es un grupo amina.
- 30 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha proteína o polipéptido se añade al producto intermedio obtenido en la fase a) o a1) bajo condiciones reductoras con cianoborohidruro de sodio o hidruro de litio y aluminio o borohidruro de sodio.
- 35 15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde dicho polipéptido o proteína se selecciona del grupo que consiste de interferones, eritropoyetinas, factores estimuladores de hematopoyesis, factores de crecimiento óseo/cartílago, hormona del crecimiento, lubricina, insulina, calcitonina, IL1-ra.
- 40 16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-15 en donde dicha sal de HA es HATBA.
17. Conjugados de glicosaminoglicanos (GAG) con moléculas biológicamente activas, que se pueden obtener por medio del proceso de síntesis de acuerdo con las reivindicaciones 1-16.
- 45 18. Conjugados de ácido hialurónico (HA) con moléculas biológicamente activas, que se pueden obtener por medio de procesos de síntesis de acuerdo con las reivindicaciones 11-16.
19. Los conjugados de acuerdo con la reivindicación 18, seleccionados de el grupo que consiste de HA-IFN, HA-EPO, HA-GCSF, factores de crecimiento HA-óseo/cartílago, HA-hGH, HA-lubricina HA-insulina, HA-sCT, HA-IL1-ra.
- 50 20. Los conjugados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-19, para el uso en el campo médico.
21. Uso de los conjugados de acuerdo con la reivindicación 20, para la preparación de un medicamento que tiene una acción antiviral o antitumoral.
- 55 22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho conjugado es HA-IFN.
23. Composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, conjugados como los definidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-20, junto con uno o más excipientes farmacológicamente aceptables.
- 60 24. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 23, para uso oral, rectal, intravaginal, sublingual, intraocular; o como soluciones inyectables mediante inyecciones intradérmicas, intravenosas, intramusculares, subcutáneas, intraarteriales, intratecales, intracardiacas, intrasinoviales, intraarticulares, intraperitoneales, intravesicales, o formuladas para uso tópico, tales como geles, cremas, ungüentos, espumas,
- 65 polvo seco, aerosoles, emplastos de piel o transdérmicos.

25. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 24, formuladas como soluciones intravenosas inyectables para localización hepática y/o pulmonar, o como sistemas con liberación controlada para administración subcutánea y/o intradérmica y/o intraarticular.

- 5 26. Biomaterial caracterizado por una matriz que comprende los conjugados tal como se define de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-19.

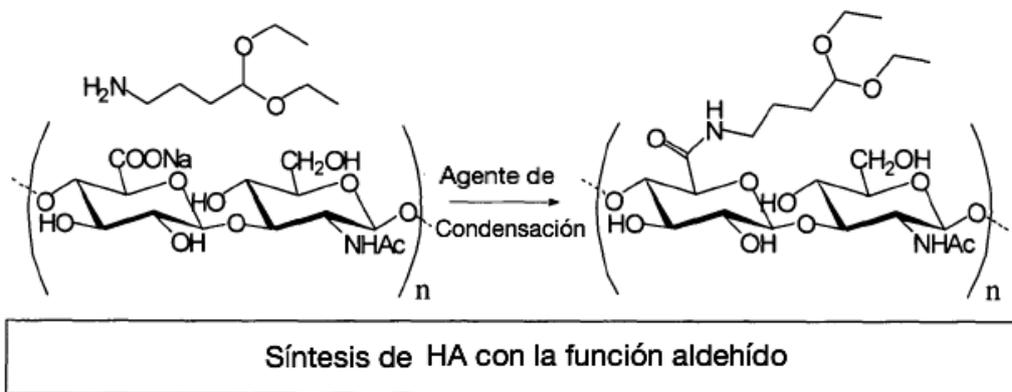
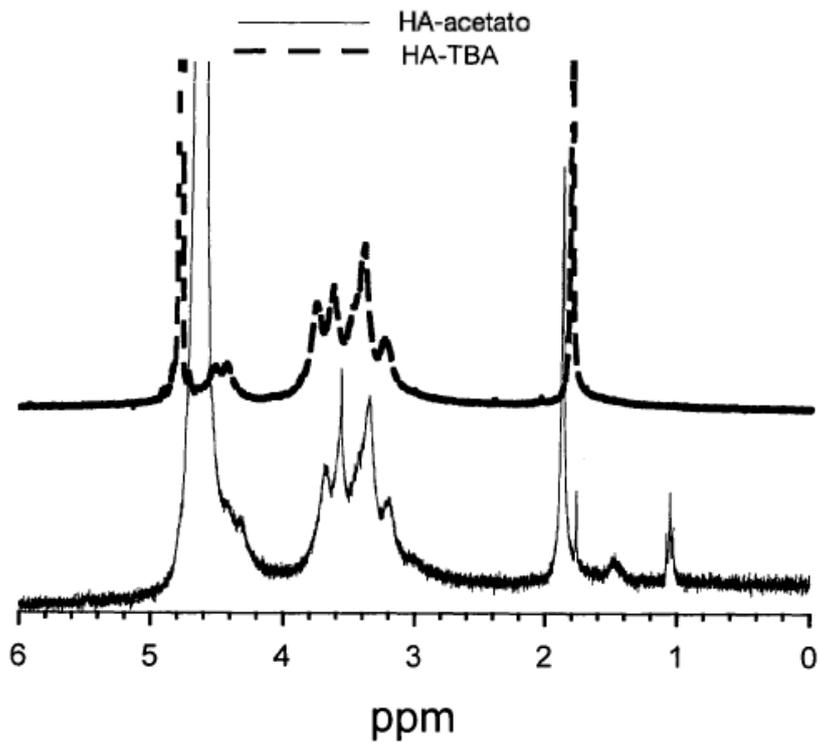


Fig. 1



RMN H de HA con la función aldehído

Fig. 2

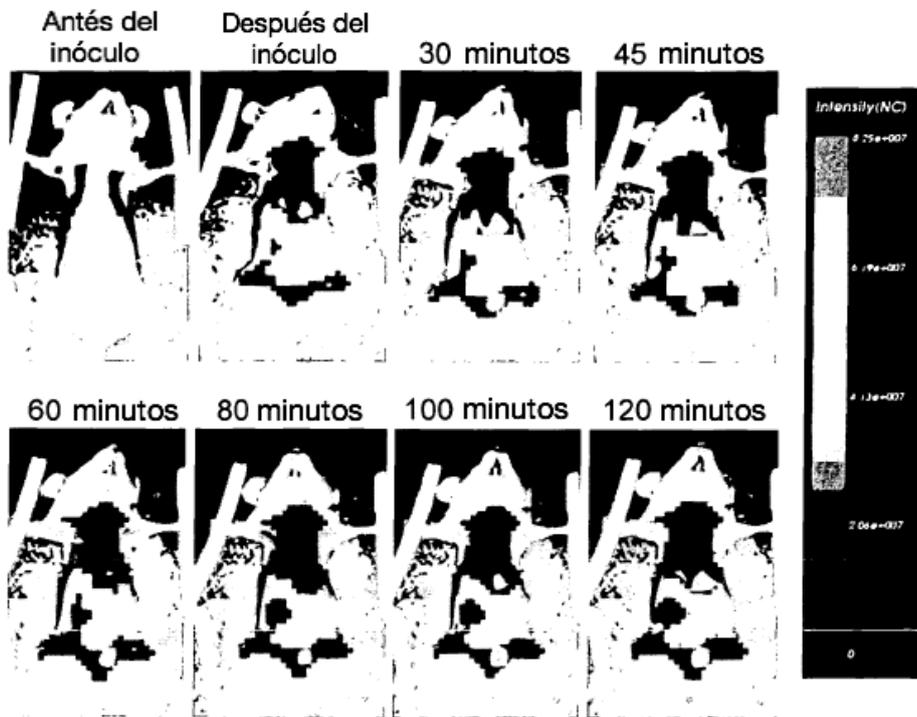


Fig. 3

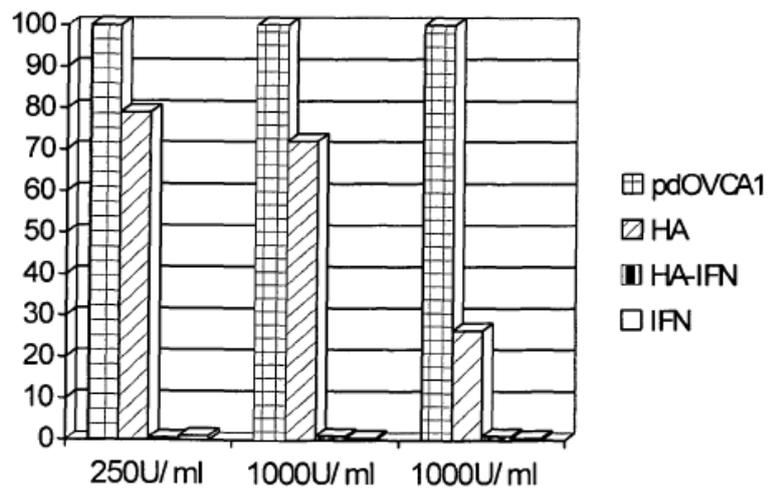


Fig. 4

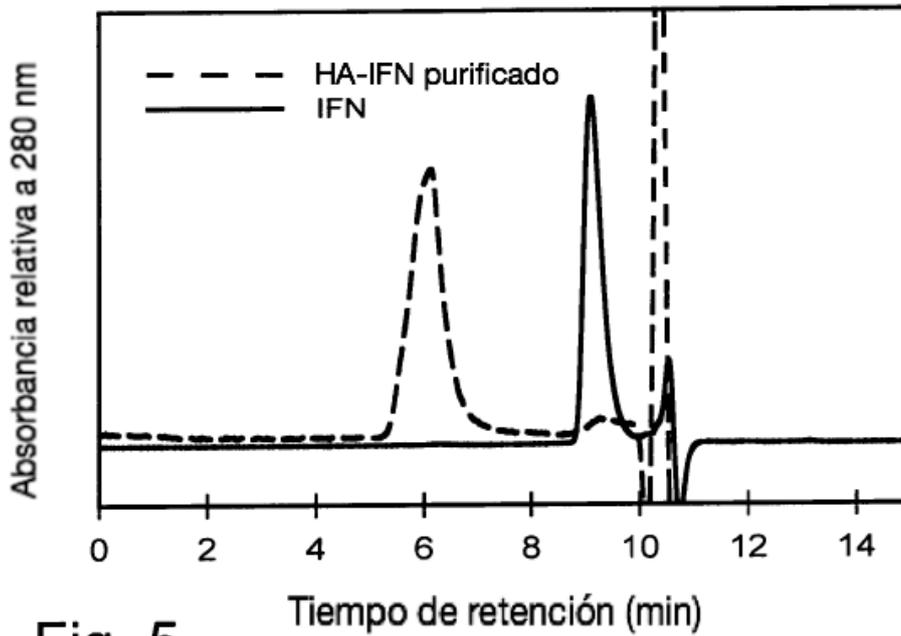


Fig. 5

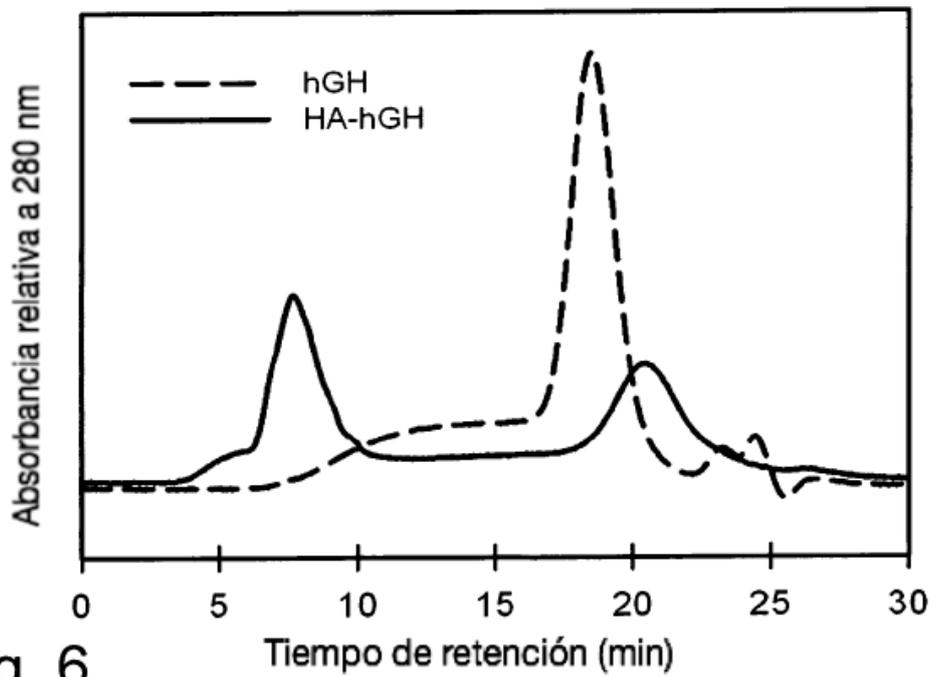


Fig. 6

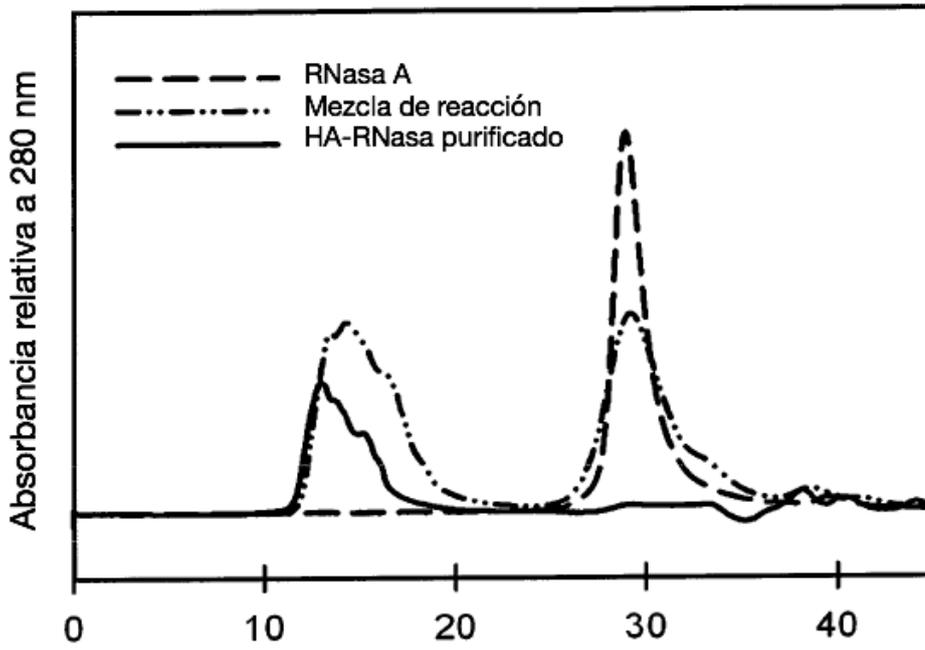


Fig. 7

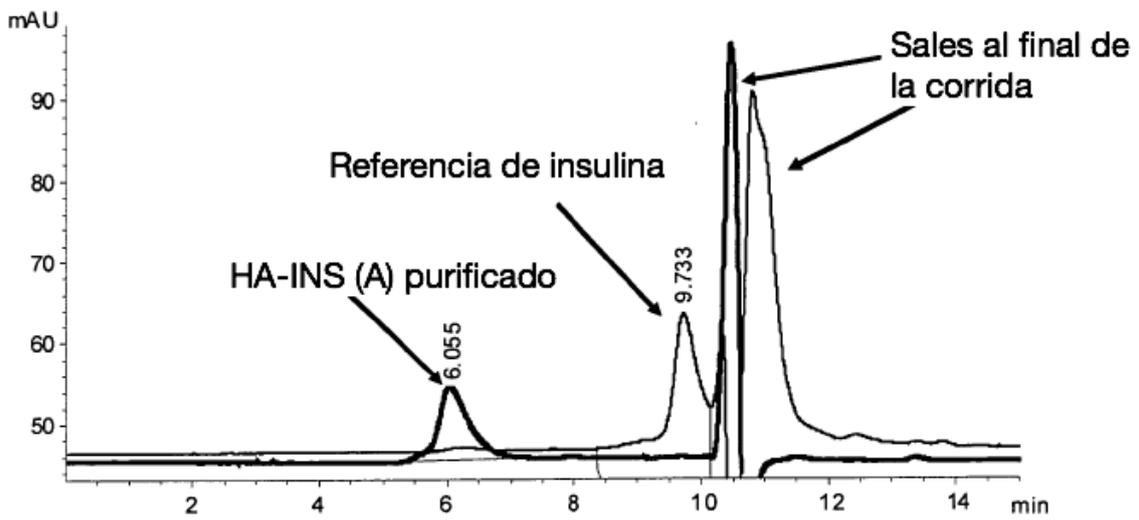
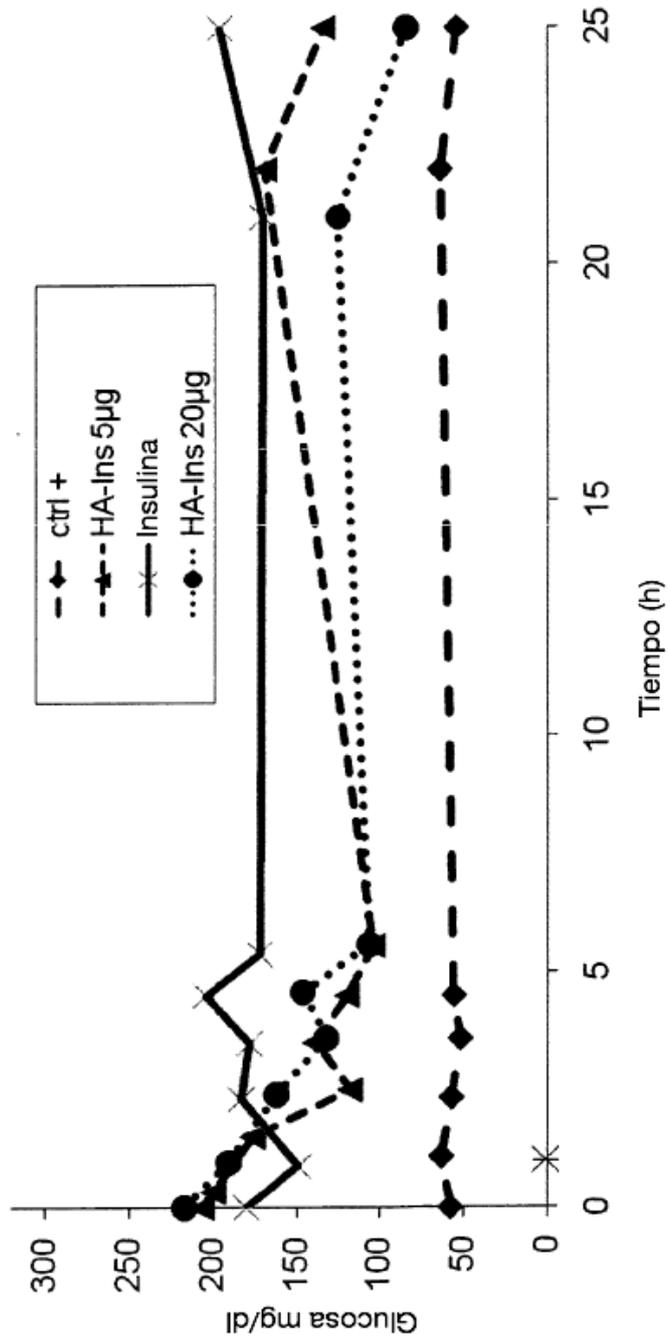
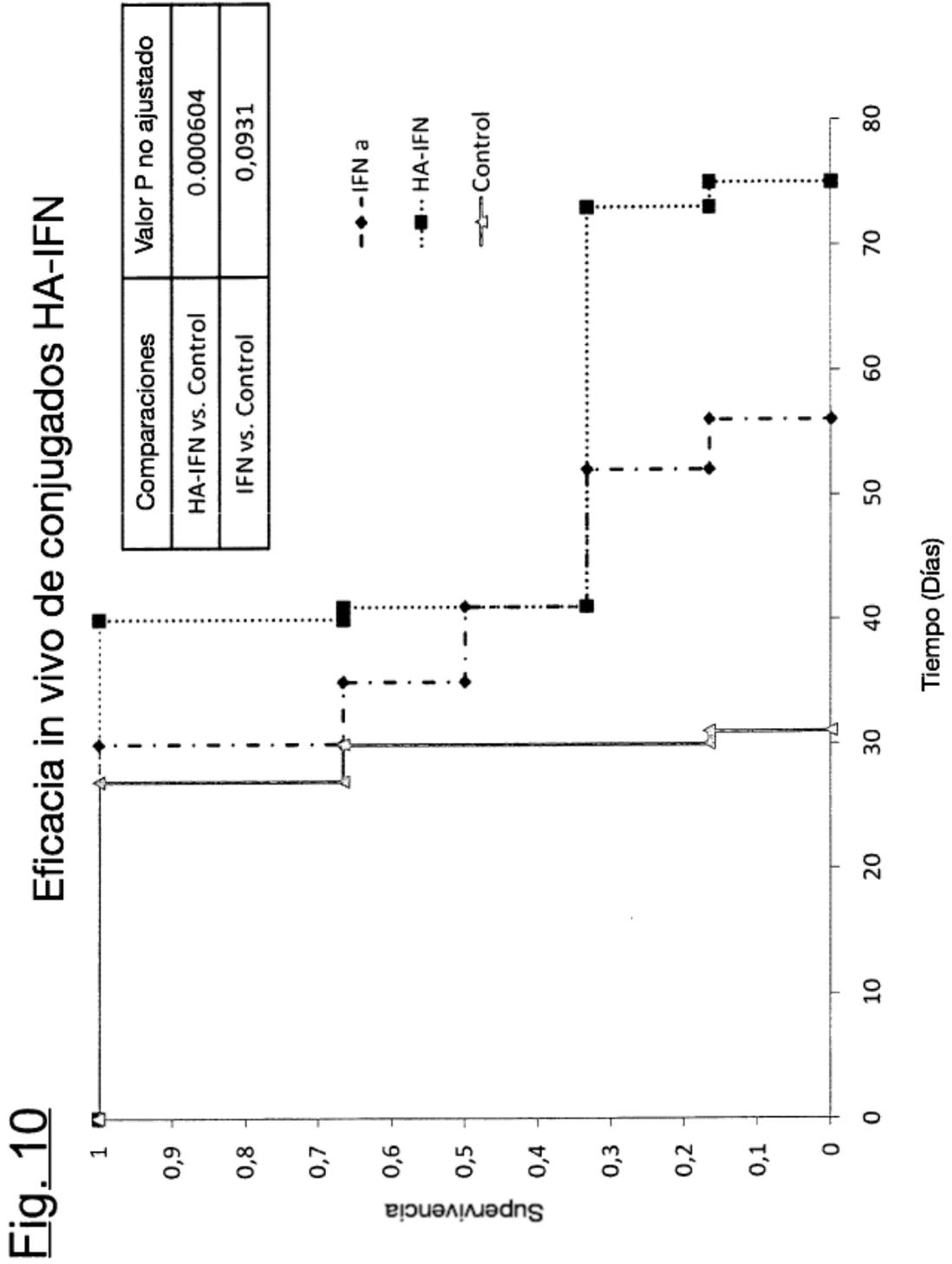


Fig. 8

Fig. 9





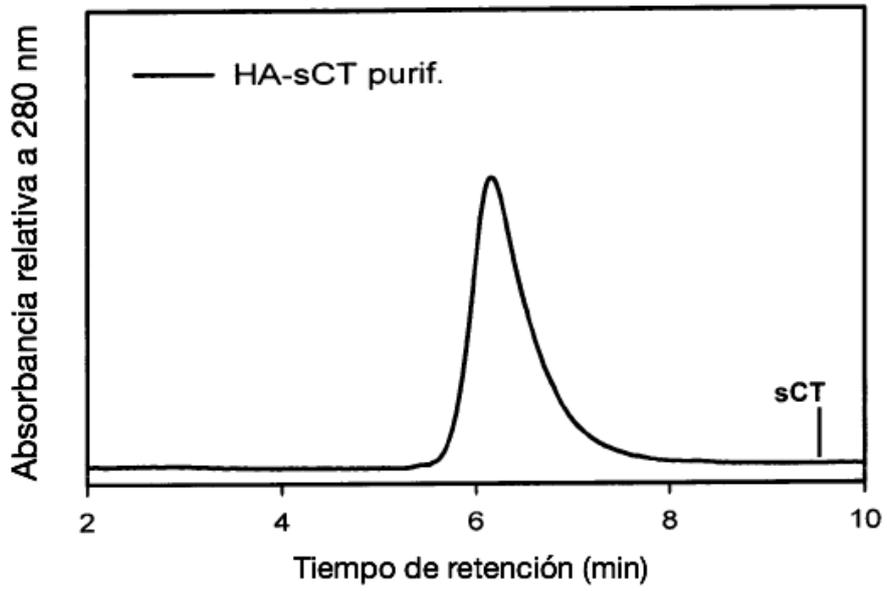


Fig. 11

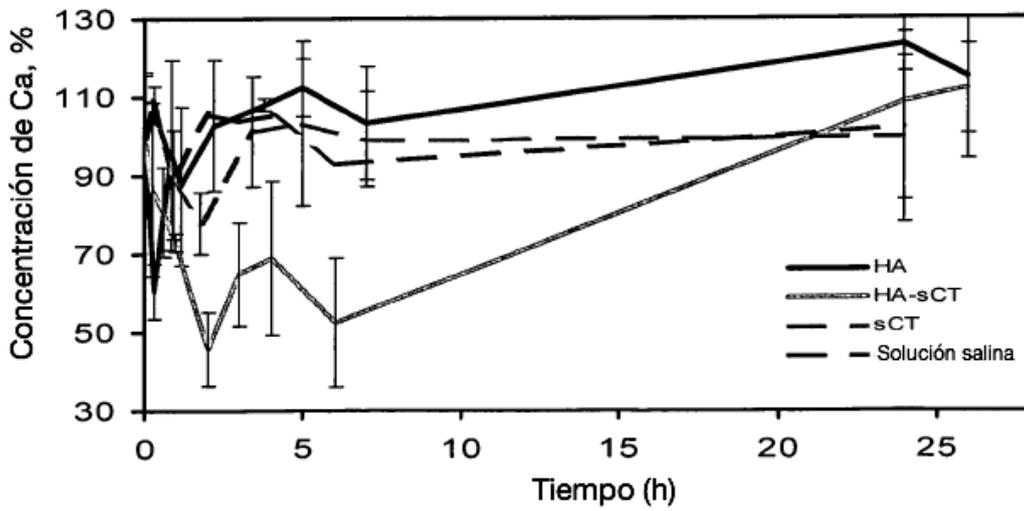


Fig. 12

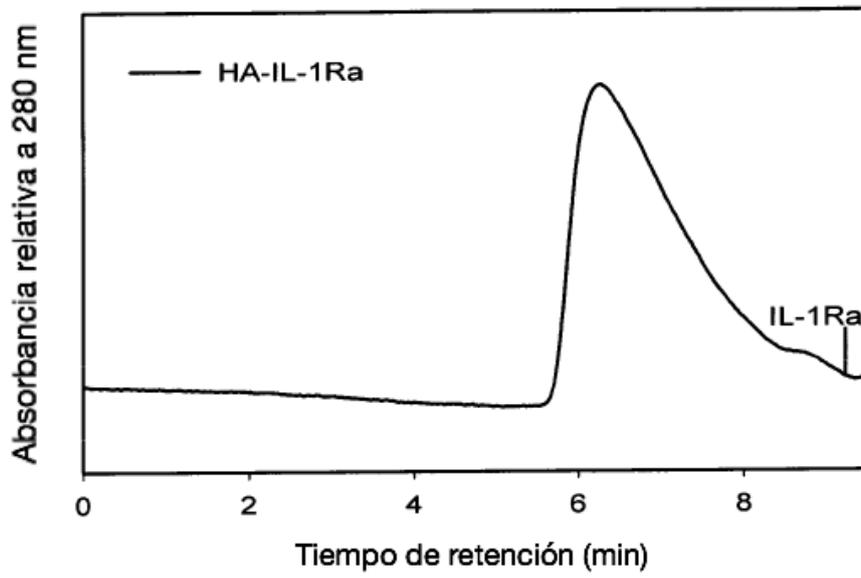


Fig. 13