

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 453**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/61** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2008 PCT/EP2008/005155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2008 WO09000522**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008 E 08759334 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2173383**

54 Título: **Conector Fmoc polimérico hidrolizable**

30 Prioridad:

**26.06.2007 US 937169 P**  
**07.04.2008 US 123263 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2017**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**  
**Zählerweg 4**  
**6300 Zug , CH y**  
**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TURECEK, PETER y**  
**SIEKMANN, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 644 453 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

Conector Fmoc polimérico hidrolizable

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la preparación de un conector hidrolizable, que está unido a al menos un hidrato de carbono. Estos conectores hidrolizables son útiles para prolongar la circulación *in vivo* de fármacos proteicos y peptídicos.

10

**Antecedentes de la invención**

La mayoría de los fármacos proteicos o peptídicos tienen una vida corta y a menudo tienen una semivida circulatoria corta *in vivo*. Teniendo en cuenta que los fármacos proteicos o peptídicos no se absorben por vía oral, el mantenimiento prolongado o fármacos terapéuticamente activos en la circulación es una característica deseable de importancia clínica obvia.

15

Una estrategia atractiva para mejorar las propiedades clínicas de los fármacos proteicos o peptídicos es una modificación de los fármacos con polímeros, por ejemplo, poli(óxidos de alqueno) (Roberts *et al.*, *Advan. Drug Rev.* 54, 459-476 (2002)) o polisacáridos como el poli(ácido siálico) (Fernandes *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1341, 26-34 (1997)), dextranos o hidroxialquilalmidón.

20

La modificación con polietilenglicol (PEG) se conoce desde hace un tiempo. Sin embargo, la modificación de proteínas con PEG a menudo conduce a la reducción de la actividad de la proteína.

25

El poli(ácido siálico) (PSA), también conocido como ácido colomínico (CA), es un polisacárido que se produce de manera natural. Es un homopolímero de ácido N-acetilneuramínico con unión cetosídica  $\alpha(2\rightarrow8)$  y contiene grupos diol vecinales en su extremo no reductor. El PSA está cargado negativamente y es un constituyente natural del cuerpo humano. Puede producirse fácilmente a partir de bacterias en grandes cantidades con características físicas predeterminadas (documento U.S. 5.846.951). Al ser química e inmunológicamente idéntico al poli(ácido siálico) en el cuerpo humano, el poli(ácido siálico) bacteriano no es inmunogénico ni siquiera cuando se acopla a proteínas. Al contrario que otros polímeros (por ejemplo; PEG), el poli(ácido siálico) es biodegradable.

30

Sin embargo, hasta la fecha, ningún compuesto terapéutico que comprenda un polipéptido conjugado con un monosacárido ácido tal como PSA está comercialmente disponible.

35

También se han sintetizado cadenas poliméricas de PSA cortas con solo 1-4 unidades de ácido siálico (Kang *et al.*, *Chem. Commun.*, 227-228 (2000); Ress *et al.*, *Current Organic Synthesis* 1, 31-46 (2004)).

40

Se han sugerido varios conectores hidrolizables o degradables que comprenden restos de PEG.

El documento U.S. 6.515.100, describe derivados de PEG y de polímeros relacionados, que tienen uniones débiles, hidrolíticamente inestables.

45

El documento U.S. 7.122.189 describe conectores de PEG liberables basados en grupos bis-N-2-hidroxietilglicina (bicina).

Los documentos WO 04/089280 y WO 06/138572 describen constructos de PEG a base de fluoreno hidrolizables.

50

Tras la conjugación de estos conectores a fármacos proteicos, el conjugado de proteína-polímero puede considerarse como profármaco y puede liberarse la actividad de la proteína del conjugado mediante un mecanismo de liberación controlada. Al usar este concepto, pueden obtenerse propiedades farmacocinéticas mejoradas del fármaco (Zhao *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 17, 341-351 (2006)).

55

**Sumario de la invención**

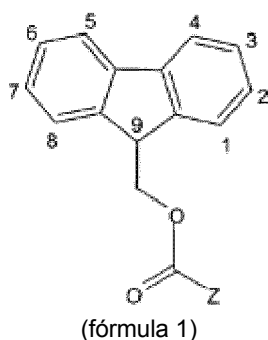
Según la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula 1 según la reivindicación 1, un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (2) según la reivindicación 9; y un conjugado según la reivindicación 13.

60

La presente invención proporciona un conector hidrolizable, que está unido a al menos un hidrato de carbono, en el que el conector hidrolizable está conjugado con un fármaco proteico o peptídico con el fin de mejorar sus propiedades *in vivo* tales como la circulación *in vivo*.

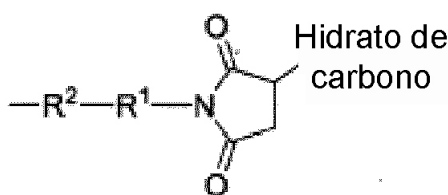
65

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula general 1:



en la que Z es un grupo saliente y al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida al radical Y;

Y es



- 10  $R^1$  es independientemente, en cada aparición, un alquilo ( $C_1-C_8$ );
- $R^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en  $-C(O)NR-$ ,  $-C(O)NR$ -alquil ( $C_1-C_8$ )- $NR-$ ,  $-NRC(O)-$  y  $-NRC(O)$ -alquil ( $C_1-C_8$ )- $NR$ ;
- 15 R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo ( $C_1-C_8$ );
- al menos una de una posición disponible 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida opcionalmente al radical X;
- 20 X es  $-SO_3-R^3$ ;
- $R^3$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_8$ ) y alquil ( $C_1-C_8$ )- $R^4$ ;
- y
- 25  $R^4$  es un polímero.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la hidrólisis *in vitro* de un conjugado de FVIIa-PSA a pH 8,3. Se midió la liberación de la actividad de FVIIa con el ensayo Staclot (Diagnostica Stago, Asnières, Francia).

La figura 2 muestra la hidrólisis *in vitro* de un conjugado de FVIIa-trímero-PSA a pH 8,3. Se midió la liberación de la actividad de FVIIa con el ensayo Staclot (Diagnostica Stago, Asnières, Francia).

La figura 3 muestra la actividad de FVIIa en plasma medida con un ensayo de coagulación (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia). Para la actividad de coagulación de FVIIa, el área bajo la curva (AUC) ajustada a la dosis fue de 0,014 para rFVIIa no modificado y aumentó hasta 0,015 para el conjugado de rFVIIa (0-infinito). La semivida terminal aumentó desde 2,3 hasta 4,4 horas y el tiempo de residencia medio (MRT) desde 1,4 hasta 2,4 horas.

La figura 4 muestra la determinación del antígeno de FVIIa mediante ELISA con un anticuerpo policlonal anti-FVII humano. Para el antígeno, el AUC ajustada a la dosis (0-infinito) aumentó desde 0,010 (rFVIIa no modificado) hasta 0,014 (conjugado de rFVIIa), la semivida terminal aumentó desde 1,4 hasta 2,3 horas y el MRT desde 1,5 hasta 2,2 horas.

La figura 5 muestra la actividad de FVIIa en plasma, medida con un ensayo de coagulación (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia). La farmacocinética de los conjugados de rFVIIa-trímero-PSA mejora (-o-) en comparación con rFVIIa nativo (--△--).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un conector hidrolizable, que está unido a al menos un hidrato de carbono, en el

que el conector hidrolizable puede conjugarse además con un fármaco proteico o peptídico con el fin de mejorar sus propiedades *in vivo* tales como circulación *in vivo*. La actividad del fármaco proteico o peptídico puede liberarse del conjugado mediante un mecanismo de liberación controlada.

5 Los siguientes párrafos proporcionan definiciones generales y la definición de diversos restos químicos que constituyen los compuestos según la invención y se pretende que se apliquen uniformemente en toda la memoria descriptiva y en las reivindicaciones a menos que una definición expuesta expresamente de otro modo proporcione una definición más amplia.

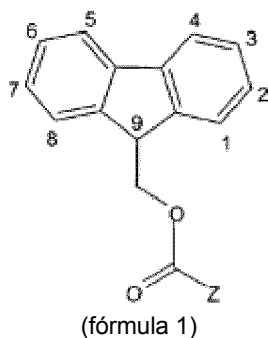
10 "Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Este término se ejemplifica por grupos tales como metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo y similares. Se incluyen alquilos lineales y ramificados.

15 "Grupos salientes" se refiere a grupos, que son capaces de reaccionar con un nucleófilo presente en el fármaco proteico o peptídico que forma el conjugado. Este término se ejemplifica por grupos tales como N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxibenzotriazolilo, halógeno, N-hidroxifalimidilo, p-nitrofenoxilo, imidazolilo, tiazolidiniltiona, O-acilureas u otros grupos salientes adecuados resultarán evidentes para los expertos. Para el fin de la presente invención, el fármaco proteico o peptídico contiene, por tanto, uno o más grupos para su desplazamiento, tales como una amina. Los fármacos proteicos o peptídicos son proteínas plasmáticas o factores de la coagulación sanguínea tales como FVIII, VWF, FVIIa y FIX.

20 Un "biopolímero semisintético" se refiere a un polímero orgánico fabricado, que se basa en un polímero que se produce de manera natural. Un biopolímero semisintético también puede funcionalizarse mediante grupos reactivos con el fin de conjugar estos biopolímeros semisintéticos funcionalizados con otros compuestos. Este término "biopolímero semisintético" se ejemplifica por polímeros lineales o ramificados tales como hidratos de carbono, específicamente tales como polisacáridos. Ejemplos de polisacáridos son PSA (poli(ácido siálico)) y HAS (hidroxialquilalmidón).

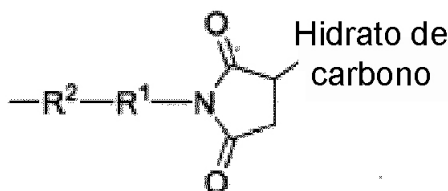
30 Conector "hidrolizable" se refiere a un sistema de conector, en el que la proteína se libera en forma nativa. La proteína se libera y el conector se separa completamente. Sinónimos de hidrolizable son conectores "degradables" o "liberables".

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula general 1:



en la que Z es un grupo saliente y al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida al radical Y;

40 Y es



45 R<sup>1</sup> es independientemente, en cada aparición, un alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>2</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -C(O)NR-, -C(O)NR-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-NR-, -NRC(O)- y -NRC(O)-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-NR;

50 R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

al menos una de una posición disponible 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida opcionalmente al radical X;

X es  $-\text{SO}_3\text{-R}^3$ ;

5  $\text{R}^3$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ ) y alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ )- $\text{R}^4$ ; y

$\text{R}^4$  es un polímero.

10 En una realización el hidrato de carbono es un polisacárido, que comprende preferiblemente al menos 3 unidades de un monosacárido.

En una realización dicho polisacárido comprende entre 2-200 unidades, preferiblemente entre 10-100 unidades de un monosacárido.

15 En una realización el polisacárido es un derivado de PSA.

En otra realización el hidrato de carbono está unido al resto succinimidilo mediante una unión tioéter.

20  $\text{R}^1$  es independientemente, en cada aparición, un alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ ).

En una realización  $\text{R}^1$  se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo y hexilo.

25  $\text{R}^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}$ -alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ )- $\text{NR}-$ ,  $-\text{NRC}(\text{O})-$  y  $-\text{NRC}(\text{O})$ -alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ )- $\text{NR}$ , en los que R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ ).

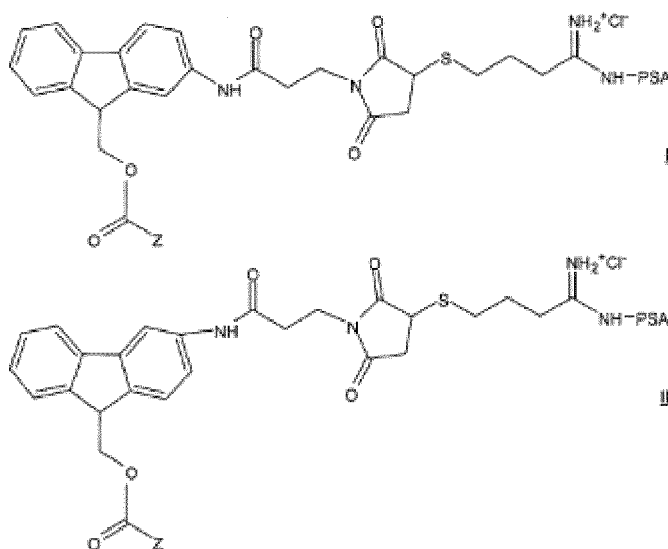
En una realización  $\text{R}^2$  es  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ .

30 En otra realización  $\text{R}^2$  es  $-\text{NHC}(\text{O})-$ .

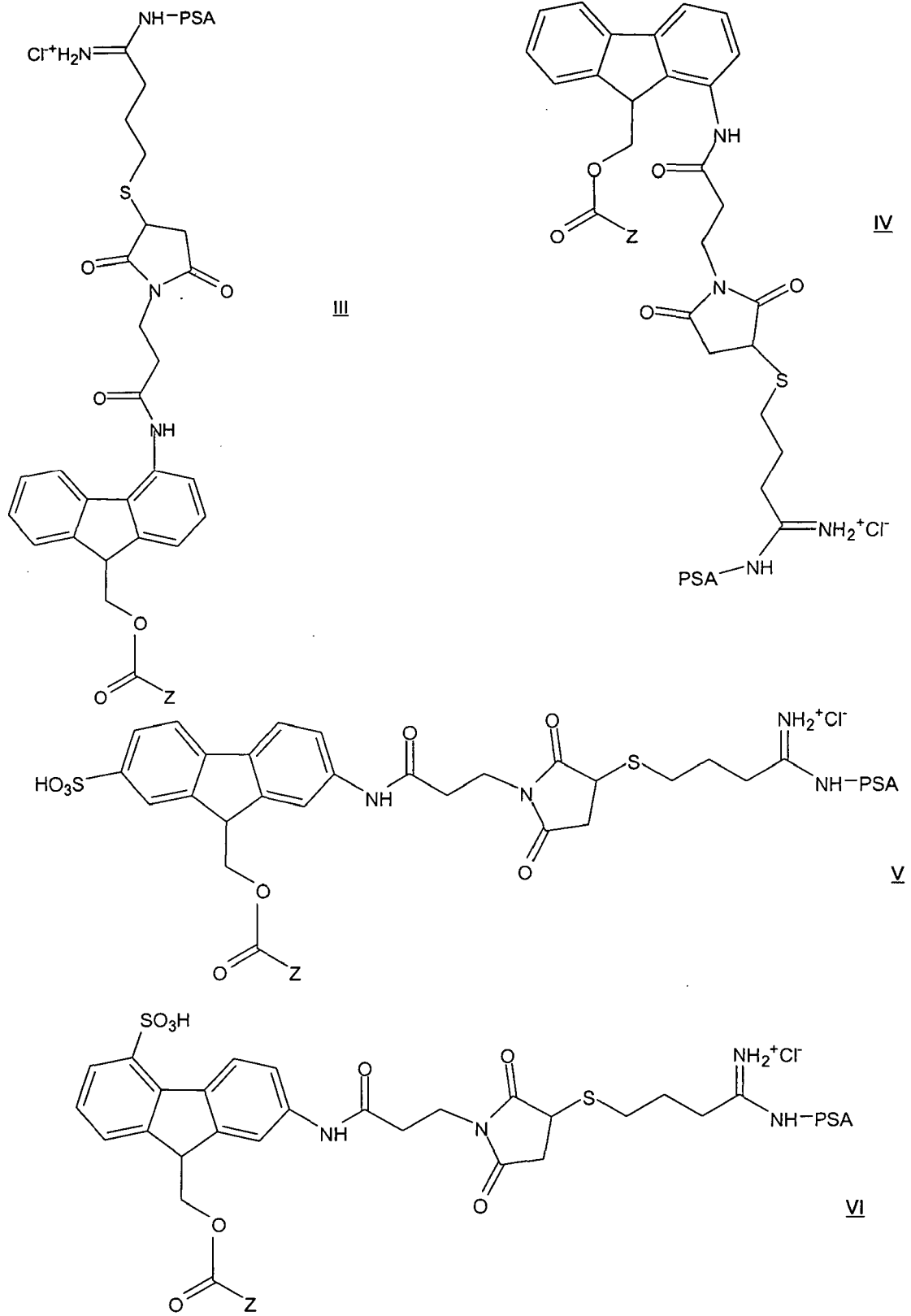
Según la presente invención el compuesto de fórmula 1 está unido al radical Y en al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

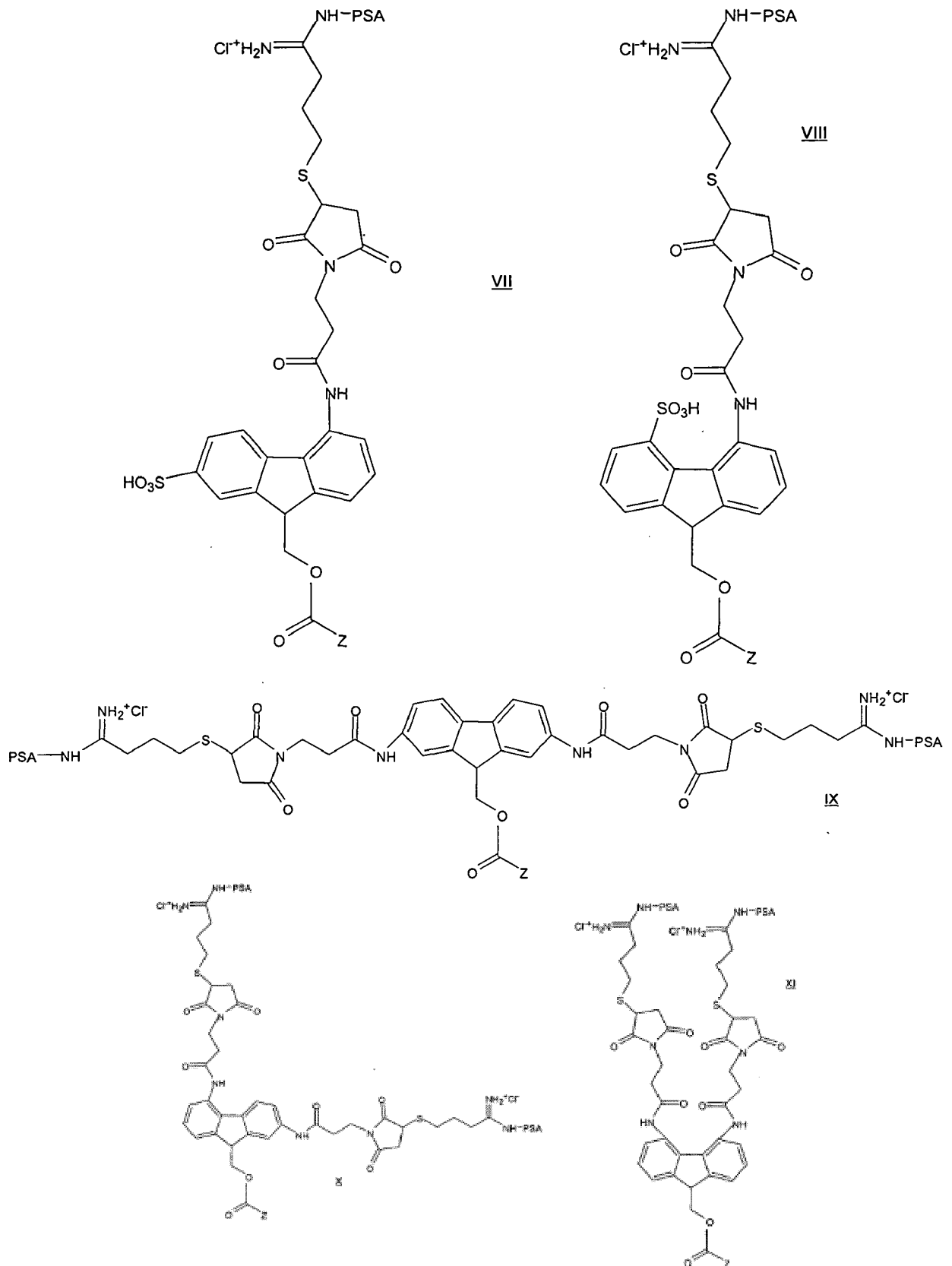
35 En otra realización el compuesto de fórmula 1 está unido al radical Y en las posiciones 2 y 7.

En otra realización el compuesto de fórmula 1 es:



40

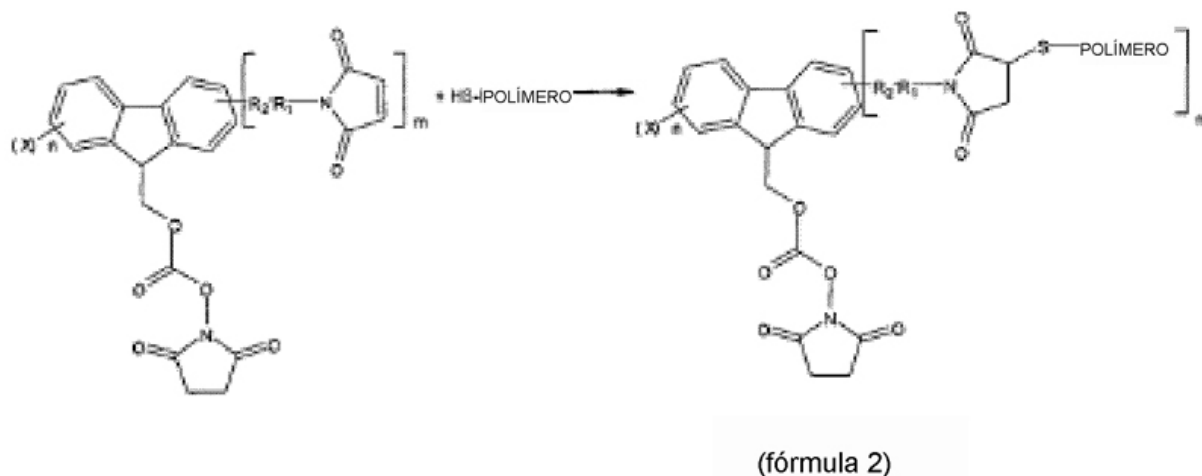




- 5 En una realización adicional, la invención se refiere a la preparación de un compuesto de fórmula 2.

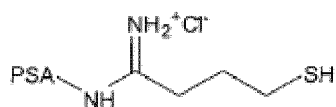
Tsubery *et al.*, J Biol. Chem. 279, 38118-38124 (2004) describieron la síntesis de un conector de PEG hidrolizable para la derivatización de proteínas basadas en el resto Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Se describe la síntesis de MAL-FMS-OSU (carbonato de 9-hidroxi metil-2-(amino-3-maleimido-propionato)-7-sulfofluoreno-N-

hidroxisuccinimidilo). El esquema de síntesis a continuación ilustra las etapas de síntesis para la preparación de un compuesto de fórmula 2 partiendo de un derivado de MAL-FMS-OSU.



- 5 en la que
- POLÍMERO es un biopolímero semisintético;
- 10  $R^1$  es independientemente, en cada aparición, un alquilo ( $C_1-C_8$ );
- $R^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en  $-C(O)NR-$ ,  $-C(O)NR$ -alquil ( $C_1-C_8$ )- $NR-$ ,  $-NRC(O)-$  y  $-NRC(O)$ -alquil ( $C_1-C_8$ )- $NR$ , en los que R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo  $C_1-C_8$ .
- 15 R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo ( $C_1-C_8$ );
- X es  $-SO_3-R^3$ ;
- $R^3$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_8$ ) y alquil ( $C_1-C_8$ )- $R^4$ ;
- 20  $R^4$  es un polímero;
- n es un número entero seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4; y
- 25 m es un número entero seleccionado de 1, 2, 3 o 4.

En una realización, HS-POLÍMERO es un biopolímero semisintético derivatizado con tiol, tal como



o también descrito en el presente documento, PSA-SH.

- 30 Un compuesto de fórmula 2 puede hacerse reaccionar fácilmente con un fármaco proteico o peptídico que contiene uno o más grupos para su desplazamiento, tales como aminas. Fármacos proteicos o peptídicos preferidos son factores de la coagulación sanguínea tales como FVIII, VWF, FVIIa, FIX.
- 35 Los fármacos proteicos y peptídicos modificados según el protocolo anterior tienen una circulación *in vivo* significativamente aumentada. La capacidad de hidrolización del conector permite que la actividad pueda recuperarse tras la hidrólisis, mediante liberación de la proteína en su forma nativa. Se muestra un ejemplo en las figuras 1 y 2. La restauración de la actividad biológica de un conjugado proteico se muestra en las figuras 3 y 4.
- 40 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1:

45



Preparación de PSA que contiene grupos SH terminales

Se oxidó poli(ácido siálico) (Sigma) con NaO<sub>4</sub> (Fernandes *et al.*, Biochim Biophys Acta 1341, 26-34 (1997)), y se formó un grupo aldehído terminal. Entonces se llevó a cabo una etapa de aminación reductora con NH<sub>4</sub>Cl tal como se describe en el documento WO 05/016973 y se redujo la base de Schiff con NaCNBH<sub>3</sub> para formar PSA-NH<sub>2</sub> que contenía un grupo amino terminal. Posteriormente, se realizó una reacción con 2-iminotiolano (Pierce 26101) según el folleto de instrucciones del fabricante para preparar un PSA modificado que contiene un grupo SH terminal. Se determinó la molaridad de los grupos SH generados usando reactivo de Ellman. Además, se usó el mismo procedimiento para introducir un grupo SH en un trímero de ácido N-acetilneuramínico, que se obtuvo de TimTec, LLC, Newark, EE. UU.

Ejemplo 2:Conjugación de rFVIIa con PSA usando el conector MAL-FMS-OSU

A 15 ml de una disolución de rFVIIa (0,7 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM pH 7,2, se le añadió el conector bifuncional MAL-FMS-OSU (preparado tal como explican resumidamente Tsubery *et al.*, J Biol Chem. 279, 38118-38124 (2004)) (concentración: 0,5 mg/mg de proteína) y se incubó a T.A. durante 30 min. Entonces, se preparó PSA derivatizado que contenía un grupo SH terminal según el ejemplo 1. Se añadió a la mezcla el derivado de PSA (concentración: 10 mg de PSA-SH/mg de proteína) y se incubó durante 2 horas adicionales. Entonces se detuvo la reacción añadiendo una disolución acuosa de glicina 0,1 M (concentración final 10 mM) y cisteína 5 mM (concentración final 0,5 mM). Se separaron los reactivos libres del conjugado de rFVIIa-PSA mediante cromatografía de intercambio iónico usando una resina de 50 µm QHyperD F (BioSeptra) y una columna XK-10 de Pharmacia (Pharmacia XK 10; h=10 cm). Se aplicó la disolución que contenía PSA-rFVIIa a la columna, que se lavó posteriormente con 10 VC de tampón de equilibrado (citrate de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,5). Entonces se eluyó el rFVIIa polisialilado con tampón de elución (citrate de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 6,1). El eluato contenía 0,06 mg/ml de proteína, se demostró la evidencia de PSA unido en el conjugado mediante el ensayo con resorcinol (Svennerholm; Biochim Biophys Acta 24: 604-11 (1957)). Para la liberación de la actividad de rFVIIa en el conjugado, se añadieron 450 µl del eluato a 50 µl de tampón TRIS 1 M pH 8,3 y se midió la liberación de la actividad de FVIIa (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia). Los resultados se ilustran en la figura 2.

Ejemplo 3:Conjugación de rFVIIa con PSA de trímero usando el conector MAL-FMS-OSU

A 15 ml de una disolución de rFVIIa (0,7 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM pH 7,2, se le añadió el conector bifuncional MAL-FMS-OSU (preparado tal como explican resumidamente Tsubery *et al.*, J Biol Chem. 279, 38118-38124 (2004)) (concentración: 0,07 mg/mg de proteína) y se incubó a T.A. durante 30 min. Entonces se derivatizó PSA de trímero (TimTec, LLC, Newark, EE. UU.) tal como se describe en el ejemplo 1 para introducir un grupo SH libre. Se añadió el derivado de PSA de trímero-SH a la mezcla (concentración: 0,43 mg de PSA de trímero-SH/mg de proteína) y se incubó durante 2 horas adicionales. Entonces se detuvo la reacción añadiendo una disolución acuosa de glicina 0,1 M (concentración final 10 mM) y cisteína 5 mM (concentración final 0,5 mM). Se separaron los reactivos libres del conjugado de rFVIIa-PSA mediante cromatografía de intercambio iónico usando una resina de 50 µm QHyperD F (BioSeptra) y una columna XK-10 de Pharmacia (Pharmacia XK 10; h=10 cm). Se aplicó la disolución que contenía PSA-rFVIIa a la columna, que se lavó posteriormente con 10 VC de tampón de equilibrado (citrate de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,5). Entonces se eluyó el rFVIIa polisialilado con tampón de elución (citrate de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 6,1). El eluato contenía 0,06 mg/ml de proteína, se demostró la evidencia de PSA unido en el conjugado mediante el ensayo con resorcinol (Svennerholm *et al.*, Biochim Biophys Acta 24, 604-11 (1957)). Para la liberación de la actividad de rFVIIa en el conjugado, se añadieron 450 µl del eluato a 50 µl de tampón TRIS 1 M pH 8,3 y se midió la liberación de la actividad de FVIIa (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia). Los resultados se ilustran en la figura 1.

Ejemplo 4:Conjugación de albúmina sérica humana con PSA usando el conector MAL-FMS-OSU

Se incubó albúmina sérica humana (HSA) con el conector bifuncional Mal-FMS-OSU (preparado tal como explican resumidamente Tsubery *et al.*, J Biol Chem. 279, 38118-38124 (2004)) en tampón acetato de sodio 25 mM, pH 6,2 durante 1 hora. Entonces se separa el exceso de conector mediante filtración en gel usando Sephadex G-25 (GE-Healthcare) usando el mismo sistema de tampón. Se recogen las fracciones que contienen proteína y se añade PSA-SH (preparado según el ejemplo 1). Se incubó la mezcla durante 2 horas a T.A. Entonces se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio aniónico usando DEAE-Sepharose FF (GE Healthcare). Se eluye el conjugado de proteína-PSA con tampón acetato de sodio 25 mM pH 4,5. Las fracciones que contienen conjugado se agrupan y se concentran mediante ultrafiltración usando una membrana de 10 K. Entonces se somete a diafiltración la disolución frente a tampón acetato de sodio 25 mM, pH 6,2.

Ejemplo 5:Farmacocinética de conjugado de rFVIIa-PSA en ratas normales

5 Se preparó un conjugado de rFVIIa-PSA según el ejemplo 2 usando una concentración de MAL-FMS-OSU de 0,05 mg/mg de proteína. Se anestesiaron 8 ratas normales (4 machos, 4 hembras) y se aplicó el conjugado de rFVIIa-PSA en tampón (glicilglicina 1,3 g/l, cloruro de sodio 3 g/l, manitol 30 g/l, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 1,5 g/l, Tween 80 0,1 g/l, pH 5,5) mediante inyección intravenosa en la vena de la cola en una dosis de volumen de 10 ml por kg (1200 µg de proteína/kg). Se usó rFVIIa no modificado en una dosis de 1200 µg de proteína/kg como control en 8 ratas normales (4 machos, 4 hembras). Se tomaron muestras de sangre de la arteria de la cola 5 minutos, 1 hora, 2, 4, 7, 10 y 24 horas tras la aplicación de la sustancia y se preparó plasma con citrato y se congeló para su análisis adicional.

15 Se midió la actividad de FVIIa en plasma con un ensayo de coagulación (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia), se determinó el antígeno de FVII con un ELISA (anticuerpo policlonal anti-FVII humano). Se evaluaron los resultados estadísticamente. Para la actividad de coagulación de FVIIa, el área bajo la curva (AUC) ajustada a la dosis fue de 0,014 para rFVIIa no modificado y aumentó hasta 0,015 para el conjugado de rFVIIa (0-infinito). La semivida terminal aumentó desde 2,3 hasta 4,4 horas y el tiempo de residencia medio (MRT) desde 1,4 hasta 2,4 horas. Para el antígeno, el AUC ajustada a la dosis (0-infinito) aumentó desde 0,010 (rFVIIa no modificado) hasta 0,014 (conjugado de rFVIIa), la semivida terminal aumentó desde 1,4 hasta 2,3 horas y el MRT desde 1,5 hasta 2,2 horas. Se llevaron a cabo todos los cálculos mediante el uso de un programa estadístico (program R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). Los resultados de farmacocinética se ilustran en las figuras 3 y 4.

Ejemplo 6:Farmacocinética de conjugado de rFVIIa-trímero-PSA en ratas normales

30 Se preparó conjugado de rFVIIa-trímero-PSA según el ejemplo 3 usando una concentración de MAL-FMS-OSU de 0,05 mg/mg de proteína. Se anestesiaron 6 ratas normales (3 machos, 3 hembras) y se aplicó el conjugado de rFVIIa-trímero-PSA en tampón (glicilglicina 1,3 g/l, cloruro de sodio 3 g/l, manitol 30 g/l, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 1,5 g/l, Tween 80 0,1 g/l, pH 5,5) mediante inyección intravenosa en la vena de la cola en una dosis de volumen de 10 ml por kg (1200 µg de proteína/kg). Se usó rFVIIa no modificado en una dosis de 1200 µg de proteína/kg como control en 6 ratas normales (3 machos, 3 hembras). Se tomaron muestras de sangre de la arteria de la cola 5 minutos, 1 hora, 2, 4, 7, 10 y 24 horas tras la aplicación de la sustancia y se preparó plasma con citrato y se congeló para su análisis adicional.

40 Se midió la actividad de FVIIa en plasma con un ensayo de coagulación (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) y se construyó la curva de eliminación. La farmacocinética mejorada del conjugado de rFVIIa-trímero-PSA se ilustra en la figura 5.

Ejemplo 7:Conjugación de rFIX con PSA usando el conector MAL-FMS-OSU

45 A 0,6 ml de una disolución de FIX recombinante (8 mg/ml) en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, se le añadió el conector bifuncional MAL-FMS-OSU (preparado tal como explican resumidamente Tsubery *et al.*, J Biol Chem. 279, 38118-38124 (2004)) (concentración: 0,07 mg/mg de proteína) y se incubó a T.A. durante 30 min. Se preparó PSA derivatizado que contenía un grupo SH terminal según el ejemplo 1. Se añadió a la mezcla el derivado de PSA (concentración: 32 mg de PSA-SH/mg de proteína – exceso molar de 100 veces) y se incubó durante 2 horas adicionales a T.A. Se detuvo la reacción añadiendo una disolución acuosa de glicina 0,1 M (concentración final 10 mM) y cisteína 5 mM (concentración final 0,5 mM). Se separaron los reactivos libres del conjugado de rFIX-PSA mediante cromatografía de interacción hidrófoba usando una columna de Butyl-Sepharose con relleno previo (HiTrap Butyl FF 5 ml, GE Healthcare). Se añadió un tampón que contenía NaCl 5 M (tampón Hepes 50 mM, NaCl 5 M, Tween 80 al 0,01%, CaCl<sub>2</sub> 6,7 mM, pH 6,9) a la disolución que contenía PSA-rFIX para dar una concentración final de NaCl 3 M. Se aplicó esta mezcla a la columna, que se lavó posteriormente con 10 VC de tampón de equilibrio (tampón Hepes 50 mM, NaCl 3 M, Tween 80 al 0,01%, CaCl<sub>2</sub> 6,7 mM, pH 6,9) y se llevó a cabo la elución del conjugado de rFIX-PSA con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4, que contenía CaCl<sub>2</sub> 6,7 mM. Tras la elución del conjugado, se ajustó el pH a pH 6,9. El eluato contenía 0,24 mg/ml de proteína tal como se mide mediante el ensayo de BCA, se demostró la evidencia de PSA unido en el conjugado mediante el ensayo con resorcinol (Svennerholm, Biochim Biophys Acta 24, 604-611 (1957)). En una etapa final, se concentró el eluato 10 veces mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) usando una membrana de 30 kD (celulosa regenerada/Millipore) frente a Hepes 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4.

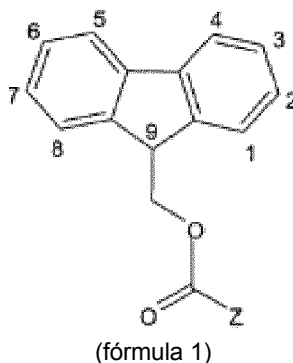
Ejemplo 8:

Conjugación de rFVIII con PSA usando el conector MAL-FMS-OSU

5 Para la preparación de conjugado de rFVIII-PSA, a 6 ml de una disolución de FVIII recombinante (4,5 mg/ml), derivado del procedimiento de fabricación de Advate, en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, se le añadió el conector bifuncional MAL-FMS-OSU (preparado tal como explican resumidamente Tsubery *et al.*, J Biol Chem. 279, 38118-38124 (2004)) (concentración: 0,315 mg/mg de proteína) y se incubó a T.A. durante 30 min. Se preparó PSA derivatizado que contenía un grupo SH terminal según el ejemplo 1. Se añadió a la mezcla el derivado de PSA (concentración: 27,8 mg de PSA-SH/mg de proteína – exceso molar de 450 veces) y se incubó durante 2 horas adicionales a T.A. Se detuvo la reacción añadiendo una disolución acuosa de glicina 0,1 M (concentración final 10 mM) y cisteína 5 mM (concentración final 0,5 mM). Se separaron los reactivos libres del conjugado de rFVIII-PSA mediante cromatografía de interacción hidrófoba usando una columna de Butyl-Sepharose preempaquetada (HiTrap Butyl FF 5 ml, GE Healthcare). Se añadió un tampón que contenía NaCl 5 M (tampón Hepes 50 mM, NaCl 5 M, Tween 80 al 0,01%, CaCl<sub>2</sub> 6,7 mM, pH 6,9) a la disolución que contenía PSA-rFVIII para dar una concentración final de NaCl 3 M. Se aplicó esta mezcla a la columna, que se lavó posteriormente con 10 VC de tampón de equilibrado (tampón Hepes 50 mM, NaCl 3 M, Tween 80 al 0,1%, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 6,9) y se llevó a cabo la elución del conjugado de rFVIII-PSA con tampón citrato, pH 7,4 (citrato de Na<sub>3</sub> 13,6 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, histidina 20 mM, Tween 80 al 0,01%). Tras la elución del conjugado, se ajustó el pH a pH 6,9. El eluato contenía 2,5 mg/ml de proteína (ensayo de BCA).

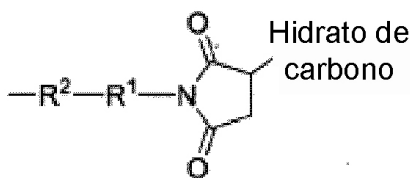
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula 1



en la que Z es un grupo saliente y al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida al radical Y;

Y es



R<sup>1</sup> es independientemente, en cada aparición, un alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>2</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -C(O)NR-, -C(O)NR-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-NR-, -NRC(O)- y -NRC(O)-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-NR;

R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

al menos una de una posición disponible 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida opcionalmente al radical X;

X es -SO<sub>3</sub>-R<sup>3</sup>;

R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) y alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-R<sup>4</sup>; y

R<sup>4</sup> es un polímero.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Z es N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxibenzotriazolilo, halógeno, N-hidroxiptalimidilo, p-nitrofenoxilo, imidazolilo, tiazolidiniltiona u O-acilurea.

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que R<sup>2</sup> es o bien -C(O)NR- o bien -NRC(O)- y en el que R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>).

4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho hidrato de carbono está unido mediante una unión tioéter.

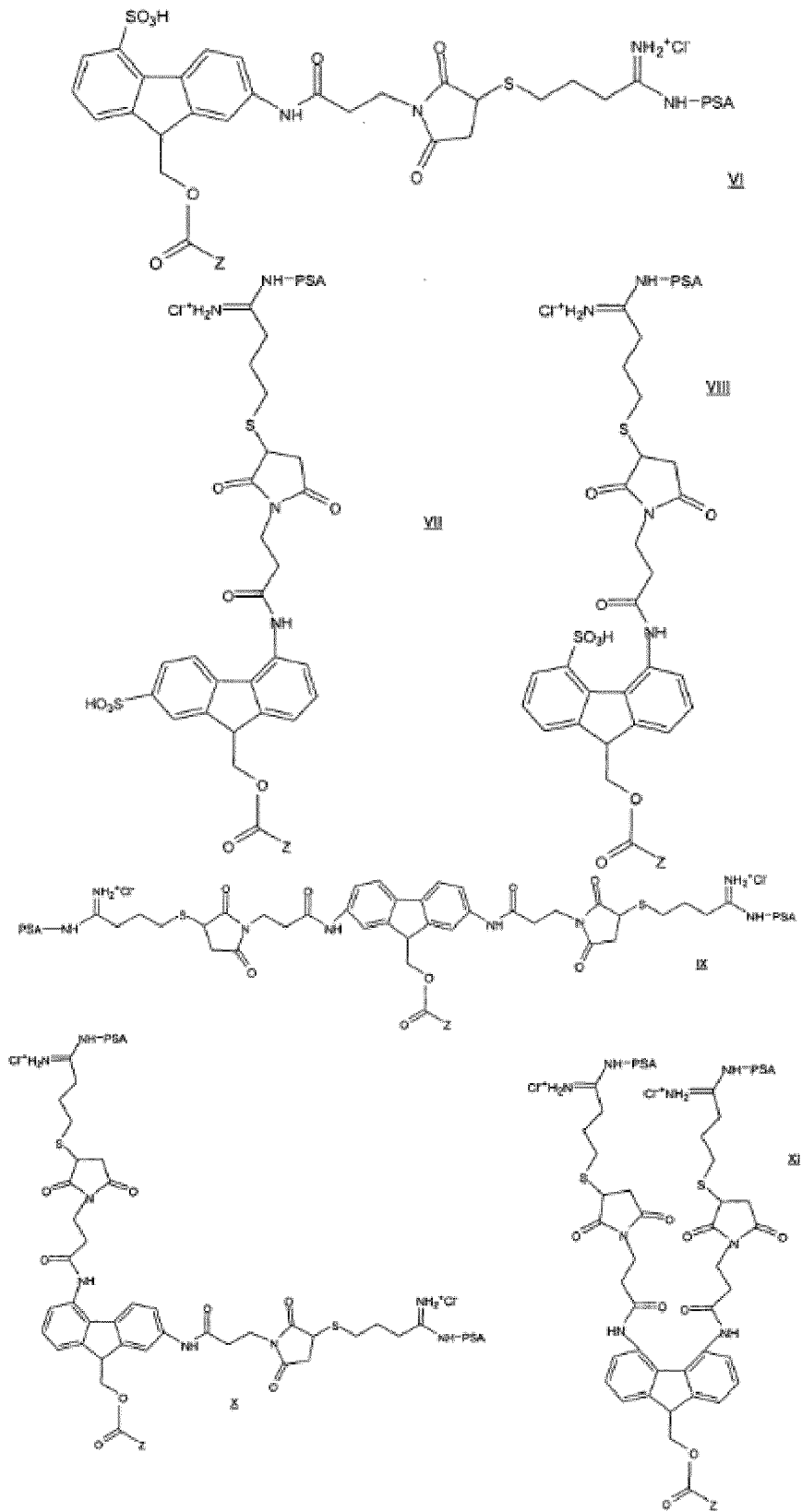
5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho hidrato de carbono es un polisacárido.

6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que dicho polisacárido es poli(ácido siálico) (PSA).

7. Compuesto según la reivindicación 5, en el que dicho polisacárido comprende al menos 3 unidades de un monosacárido.

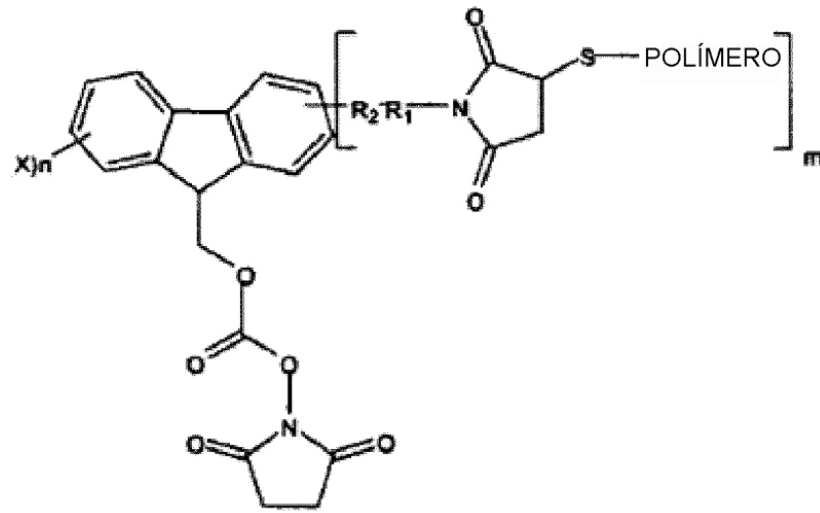
8. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y XI;





5

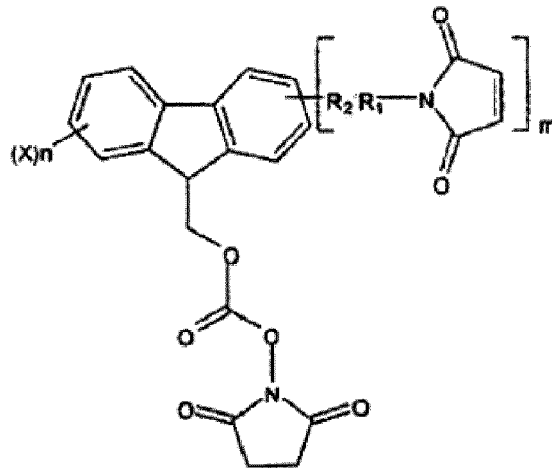
9. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (2),



(fórmula 2)

comprendiendo dicho procedimiento la etapa de someter un hidrato de carbono que tiene un grupo tiol (HS-POLÍMERO) y un compuesto intermedio que tiene la fórmula:

5



a una reacción de acoplamiento para formar el compuesto de fórmula (2):

10

en la que

POLÍMERO es un hidrato de carbono;

15

R<sup>1</sup> es independientemente, en cada aparición, un alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>2</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -C(O)NR-, -C(O)NR-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-NR-, -NRC(O)- y -NRC(O)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-NR;

20

R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

X es -SO<sub>3</sub>-R<sup>3</sup>;

25

R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-R<sup>4</sup>;

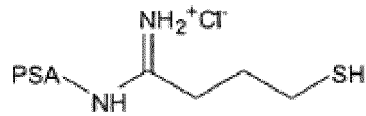
R<sup>4</sup> es un polímero;

n es un número entero seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4; y

30

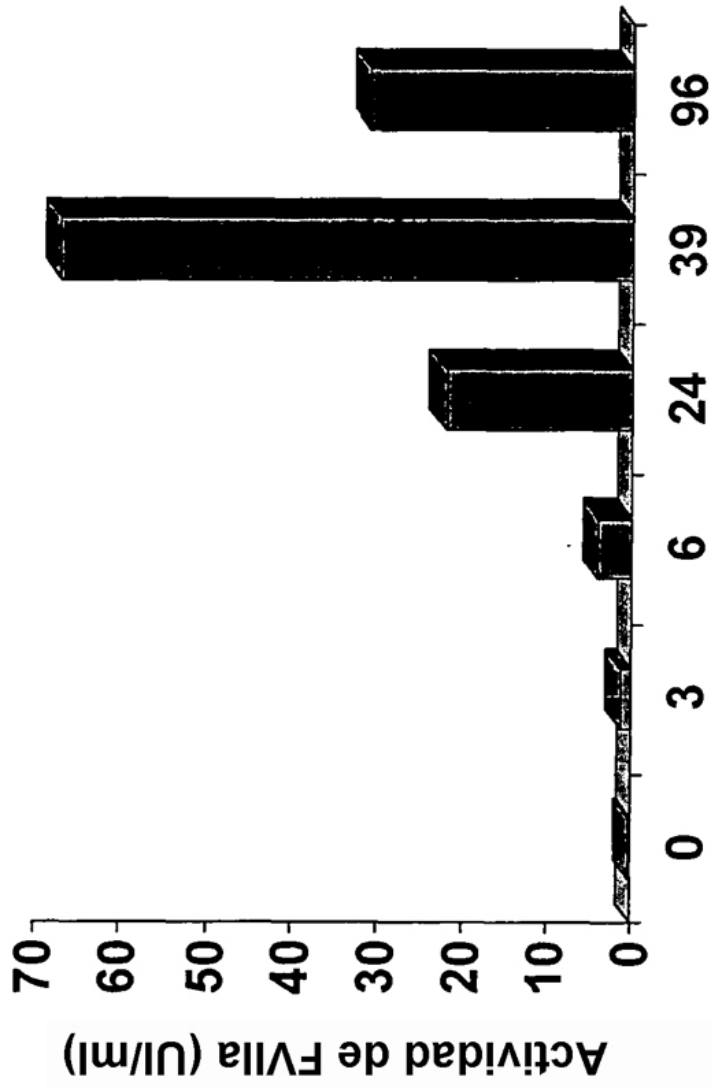
m es un número entero seleccionado de 1, 2, 3 o 4.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que HS-POLÍMERO es



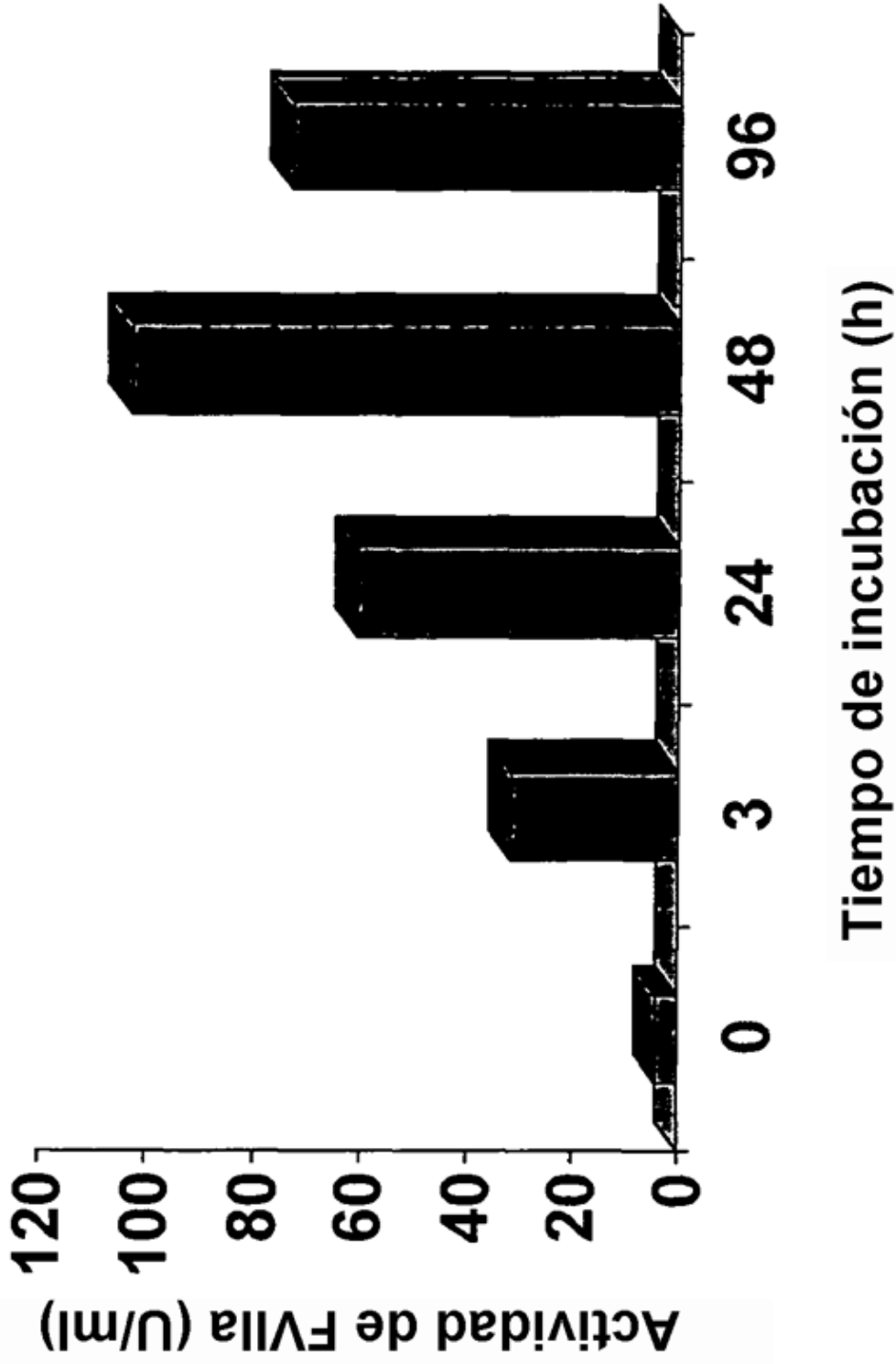
- 5
11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que R<sup>2</sup> es o bien -C(O)NR- o bien -NRC(O)- y en el que R es independientemente o bien hidrógeno o bien alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>.
- 10 12. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende además hacer reaccionar el compuesto de fórmula (2) y un fármaco proteico o peptídico.
13. Conjugado que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un fármaco proteico o peptídico.
- 15 14. Conjugado según la reivindicación 13, en el que el fármaco proteico o peptídico es una proteína plasmática o un factor de la coagulación sanguínea.





Tiempo de incubación (h)

**Figura 1**



**Figura 2**

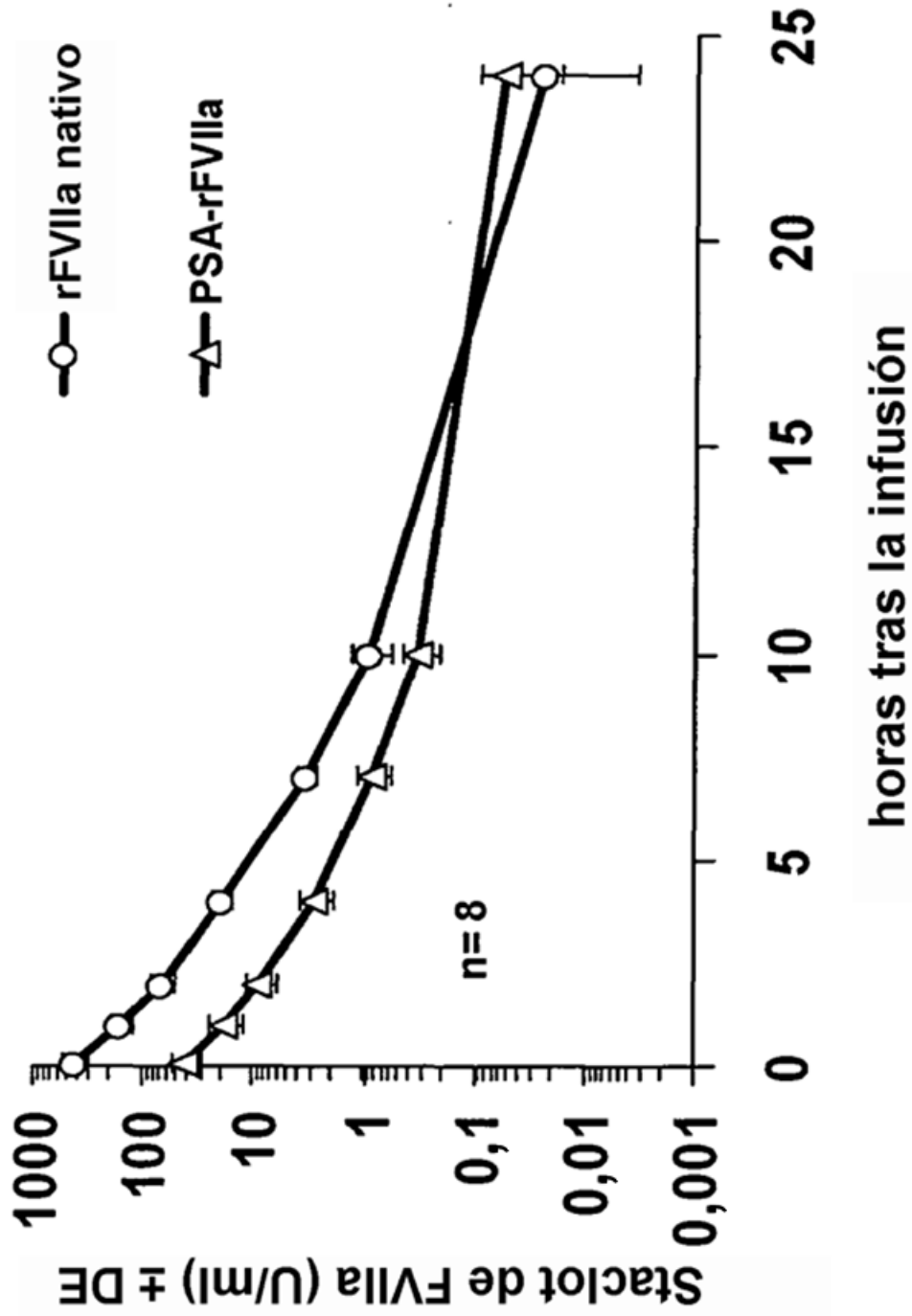
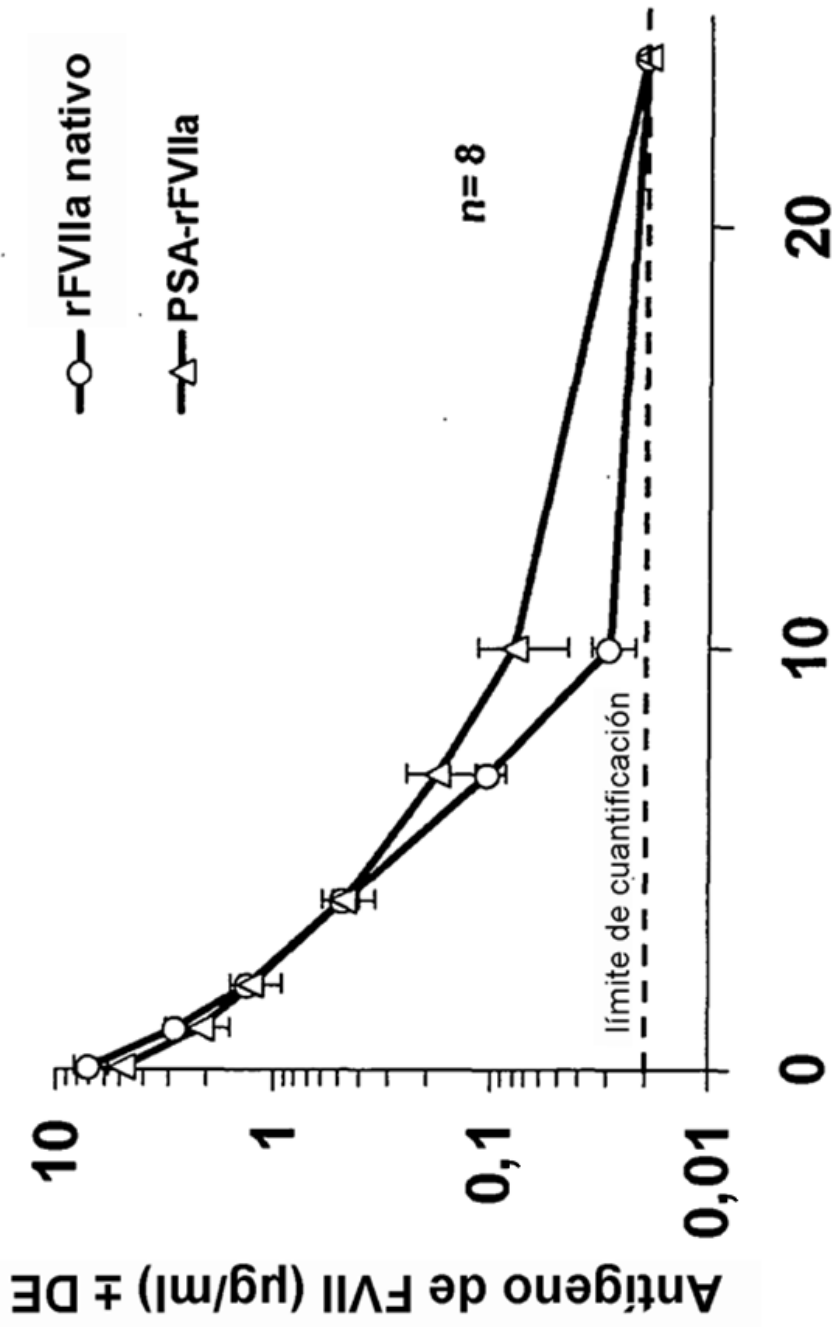


Figura 3



horas tras la infusión

Figura 4

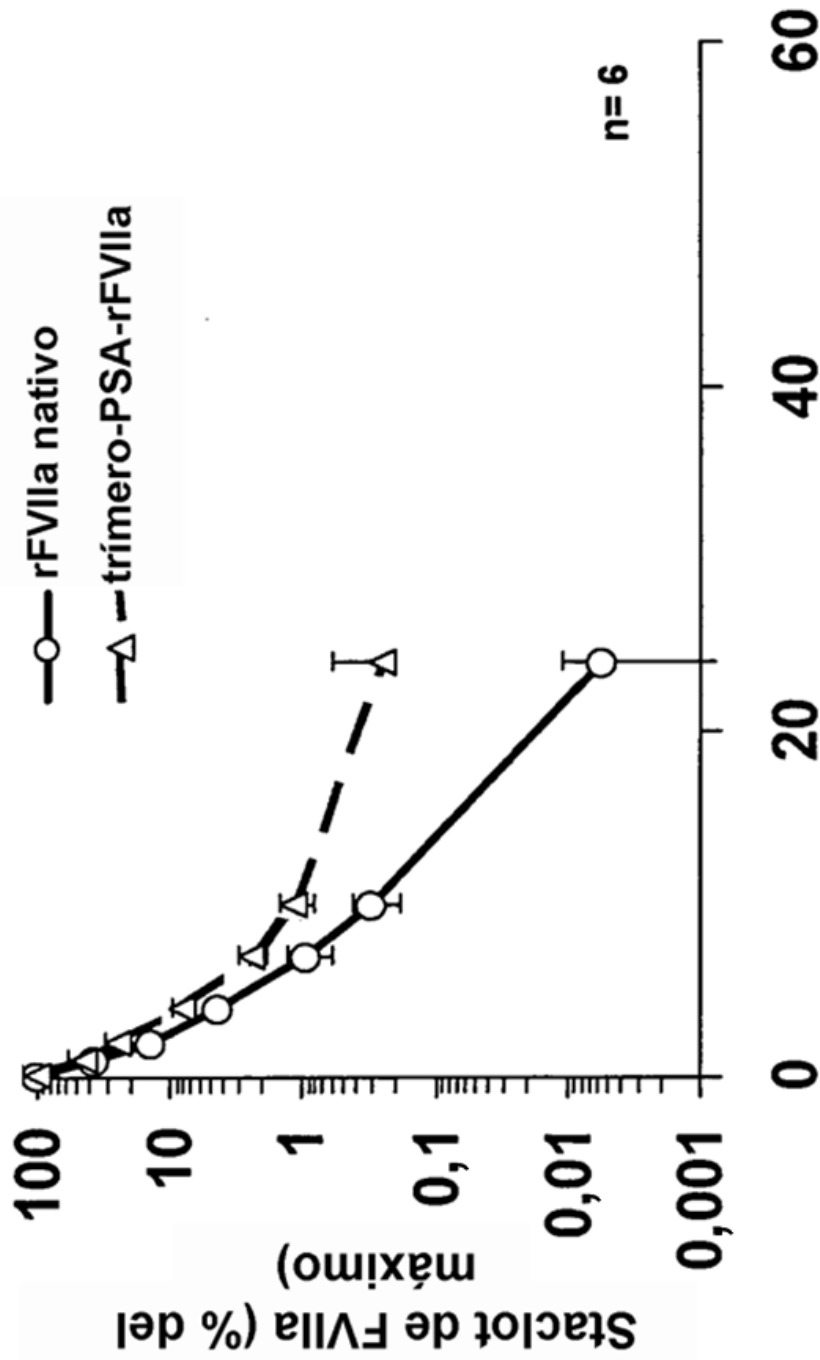


Figura 5