



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0615732-7 A2**

(22) Data de Depósito: 12/09/2006
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 47/48 2006.01
C08B 31/00 2006.01

(54) Título: **CONJUGADOS DE AMIDO DE HIDROXIALQUILA E UMA SUBSTÂNCIA ATIVA PREPARADA POR LIGAÇÃO QUÍMICA POR MEIO DE TIAZOLIDINA**

(30) Prioridade Unionista: 12/09/2005 EP 05 019768.0

(73) Titular(es): Fresenius Kabi Deutschland GMBH

(72) Inventor(es): Helmut Knoller, Norbert Zander

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

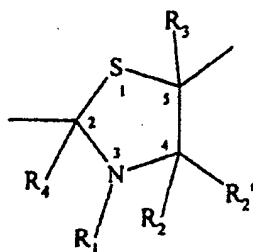
(86) Pedido Internacional: PCT EP2006008858 de 12/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/031266 de 22/03/2007

(57) Resumo: CONJUGADOS DE AMIDO DE HIDROXIALQUILA E UMA SUBSTÂNCIA ATIVA PREPARADA POR LIGAÇÃO QUÍMICA POR MEIO DE TIAZOLIDINA. A presente invenção refere-se a um método para preparar conjugados de uma substância ativa e amido de hidroxialquila e a conjugados de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, preferivelmente amido de hidroxietila, em que os conjugados são preparados ligando-se covalentemente o amido de hidroxialquila e a substância ativa por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (1) (1') (1'') em que R₁, R₂, R₃, R₄ são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo heteroaralquila, aralquila, heteroarila, arila e alquila opcionalmente adequadamente substituído, linear, cíclico e/ou ramificado, preferivelmente hidrogênio.

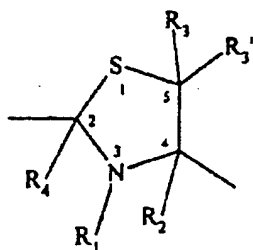
Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**CONJUGADOS DE AMIDO DE HIDROXIALQUILA E UMA SUBSTÂNCIA ATIVA PREPARADA POR LIGAÇÃO QUÍMICA POR MEIO DE TIAZOLIDINA**".

A presente invenção refere-se a um método para preparar conjugados de uma substância ativa e amido de hidroxialquila e a conjugados de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, preferivelmente amido de hidroxietila, em que os conjugados são preparados ligando-se covalentemente o amido de hidroxialquila e a substância ativa por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I)



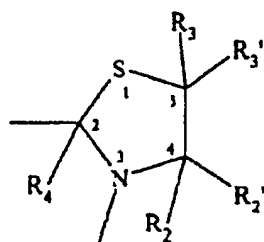
(I)

ou fórmula (I')



(I')

ou fórmula (I'')



(I'')

em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em hidrogênio, um grupo heteroalquila, aralquila, heteroarila, arila e alquila opcionalmente adequadamente substituído, linear, cíclico e/ou ramificado, preferivelmente hidrogênio.

WO nº 03/031581 A2 descreve um método de conjugação de um derivado de polímero a um polipeptídeo tendo um resíduo de histidina ou

cisteína no terminal N, em que o referido método compreende fornecer um polipeptídeo tendo um resíduo de cisteína ou histidina no terminal N, fornecendo um polímero terminado por tioéster, o polímero compreendendo uma cadeia principal de polímero não peptídico e solúvel em água, preferivelmente um polímero de polietileno glicol, e reagir o derivado de polímero e o polipeptídeo. Como polímeros, poli(alquilenoglicol), copolímero de etileno glicol e propileno glicol, poli(poliol oxetilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(ácido alfa-hidróxi), poli(álcool de vinila), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acrilomorfolina), poliacrilato, poliacrilamidas, polissacarídeos, e copolímeros, terpolímeros e misturas destes são empregados. Todos os polímeros explicitamente descritos são polímeros de polietilenoglicol.

A despeito do progresso de métodos de acoplamento e uso de moléculas de PEG monofuncionais, uma desvantagem geral de fármacos PEGuilados é que a trilha de metabolização de PEG como um polímero natural não é conhecida em detalhes.

Além disso, um método geral para formar dendrímeros de peptídeo com ligações de oxima, hidrazona e tiazolidina é conhecido de *J. Am Chem Soc.* 1995, 117, 3893-3899. Peptídeos desprotegidos como blocos de construção e ligação seletiva entre um aldeído e uma base fraca são descritos nesse ponto.

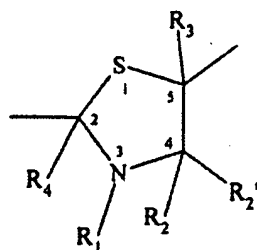
WO 99/07719 A1 descreve pró-fármacos e conjugados de compostos contendo seleanol e tiol e métodos de uso destes. Entre vários outros compostos, um pró-fármaco é descrito o qual é preparado pela reação de éster de etila de L-cisteína e uma D-ribose, um monossacarídeo, o referido pró-fármaco contendo um anel de tiazolidina. Como fórmula geral para o monossacarídeo, $(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ com $n = 1$ a 5 é descrito. Nem mesmo os dissacarídeos, muito menos compostos poliméricos moleculares elevados tal como amido, em particular amido de hidroxialquila, são descritos em combinação com a formação de anéis de tiazolidina.

Portanto, foi um objetivo da presente invenção fornecer novos conjugados de uma substância ativa e um polímero formado por ligação covalente onde nenhum polialquilenoglicol, especialmente nenhum polietileno

glicol é empregado como polímero.

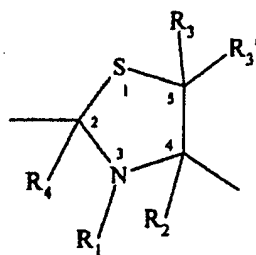
Conseqüentemente, foi outro objetivo da presente invenção fornecer um método para preparar estes conjugados.

- 5 A solução destes problemas é um método para preparar um conjugado de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, em que a substância ativa e o amido de hidroxialquila são covalentemente ligados por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I)



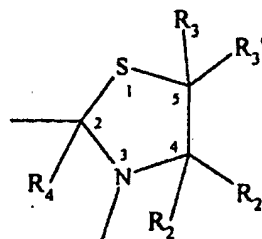
(I)

ou fórmula (I')



(I')

ou fórmula (I'')

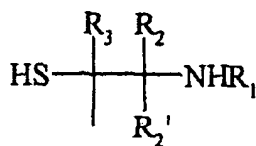


(I'')

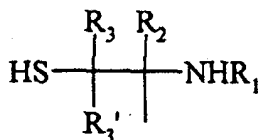
- 10 em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo heteroalquila, aralquila, heteroarila, arila e alquila opcionalmente adequadamente substituído, linear, cíclico e/ou ramificado, preferivelmente hidrogênio, o referido método compreendendo

- 15 (A) reagir um grupo aldeído, um grupo ceto ou um grupo hemiacetal de um amido de hidroxialquila ou um derivado deste compreendendo o referido grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal com um

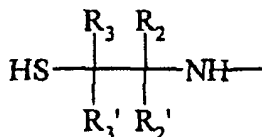
grupo alfa-SH-beta amino



- de uma substância ativa ou um derivado desta compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula (I); ou com um grupo alfa-SH-beta amino

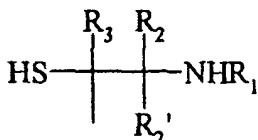


- de uma substância ativa ou um derivado desta compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I'), ou com um grupo alfa-SH-beta amino



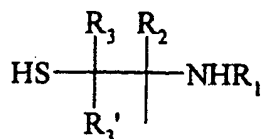
- de uma substância ativa ou um derivado desta compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula (I''), em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são como definidos acima; ou

- (B) reagir um grupo aldeído, um grupo ceto ou um grupo hemiacetal de uma substância ativa ou um derivado desta compreendendo o referido grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal com um grupo alfa-SH-beta amino



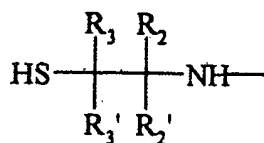
de um derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula

5 (I); ou com um grupo alfa-SH-beta amino



de um derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula

10 (I'); ou com um grupo alfa-SH-beta amino



de um derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula

15 (I''), em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são como definidos acima.

Portanto, o termo "grupo alfa-SH-beta-amino" quando empregado no contexto da presente invenção refere-se a um grupo etileno no qual um grupo SH opcionalmente protegido é ligado a um átomo de carbono e um grupo amino primário ou secundário opcionalmente protegido é ligado ao

20 átomo de carbono próximo. As ligações nas fórmulas anteriores em que, em uma extremidade destas nenhum resíduo é indicado, são aquelas ligações em que o amido de hidroxialquila ou a substância ativa é ligado.

O termo "alquila" quando empregado no contexto da invenção é preferivelmente um grupo alquila tendo 1 a 20, mais preferido 1 a 10 e em

25 particular 1 a 4 átomos de carbono, a menos que definido diferentemente em seguida.

13

O termo "arila" quando empregado no contexto da invenção é preferivelmente um grupo arila tendo 6 a 20, mais preferido 6 a 14 e em particular 6 átomos de carbono, a menos que definido diferentemente em seguida.

5 O termo "heteroarila" quando empregado no contexto da invenção é preferivelmente um grupo heteroarila tendo 6 a 20, mais preferido 6 a 14 e em particular 6 átomos de carbono e em que pelo menos um, preferivelmente 1 a 3, em particular 1, dos átomos de carbono é substituído por um heteroátomo, tal como S, N e/ou O, a menos que definido diferentemente em
10 seguida.

O termo "aralquila" quando empregado no contexto da invenção é preferivelmente um grupo arila ligado através de um grupo alquila ao restante do composto, a menos que definido diferentemente em seguida.

O termo "alcarila" quando empregado no contexto da invenção é
15 preferivelmente um grupo alquila ligado através de um grupo arila ao restante do composto, a menos que definido diferentemente em seguida.

O termo "heteroaralquila" quando empregado no contexto da invenção é preferivelmente um grupo heteroarila ligado através de um grupo alquila ao restante do composto, a menos que definido diferentemente em
20 seguida.

O termo "opcionalmente adequadamente substituído" quando empregado no contexto da invenção preferivelmente significa que 1 a 10, mais preferido 1 a 4, em particular 1 substituinte está presente, a menos que definido diferentemente em seguida.

25 O termo "substância ativa" quando empregado no contexto da presente invenção refere-se a uma substância que pode afetar qualquer propriedade física ou bioquímica de um organismo biológico incluindo, mas não limitado a, vírus, bactérias, fungos, plantas, animais e seres humanos. Em particular, o termo "substância ativa" quando empregado no contexto da
30 presente invenção refere-se a uma substância destinada para diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doença em seres humanos ou animais, ou para de outra maneira realçar o bem-estar físico ou mental de

seres humanos ou animais. Exemplos de substâncias ativas incluem, mas não estão limitados a, peptídeos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequena, tinturas, lipídios, nucleosídeos, nucleotídeos, oligonucleotídeos, polinucleotídeos, ácidos nucleicos, células, vírus, lipossomas, micropartículas, e micelas.

Exemplos de proteínas incluem, mas não estão limitados a, eritropoietina (EPO) tal como EPO recombinante humana (rhEPO), fatores estimuladores de colônia (CSF), tal como G-CSF como G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), alfa-interferon (IFN alfa), beta-interferon (IFN beta) ou gama-interferon (IFN gama), tal como IFN alfa ou IFN beta recombinante humano ou (rhIFN alfa ou rhIFN beta), interleucinas, por exemplo, IL-1 a IL-18 tal como IL-2 ou IL-3 como IL-2 ou IL-3 recombinante humano (rhIL-2 ou rhIL-3), proteínas de soro tal como fatores de coagulação II-XIII como fator VIII, alfa 1-antitripsina (AIAT), proteína ativada C (APC), ativadores de plasminogênio tal como ativador de plasminogênio tipo tecido (tPA), tal como ativador de plasminogênio de tecido humano (hTPA), AT III tal como AT III humano recombinante (rhAT III), mioglobina, albumina tal como albumina de soro bovino (BSA), fatores de crescimento, tal como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de trombócito (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado de cérebro (BDGF), fator de crescimento de nervo (NGF), fator de crescimento de célula B (BCGF), fator de crescimento neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fatores de crescimento transformadores tal como TGF alfa ou TGF beta, BMP (proteínas morfogênicas ósseas), hormônios de crescimento hormônio de crescimento humano, fatores de necrose de tumor tal como TNF alfa ou TNF beta, somatostatina (peptídeo), somatotropina, somatomedinas, hemoglobina, hormônios ou proormônios tal como insulina, gonadotropina, hormônio estimulador de melanócito (alfa-MSH), triptorrelina, hormônios hipotalâmicos tais como hormônios antidiuréticos (ADH) e oxitocina bem como hormônios liberadores e hormônios inibidores de liberação, hormônio da paratireóide, hormônios da tireóide tais como tiroxina, tirotropina, tiroliberina, prolactina, calcitonina, glucagon, peptídeos similares

a glucagon (GLP-1, GLP-2 etc.), exendinas tal como exendina-4, leptina, vasopressina, gastrina, secretina, integrinas, hormônios de glicoproteína (por exemplo, LH, FSH etc.), hormônios estimuladores de melanosídeo, lipoproteínas e apo-lipoproteínas tais como apo-B, apo-E, apo-L_a, imunoglobulinas tais como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD e fragmentos destas, hirudina, inibidor da trilha de tecido, proteínas de planta tal como lectina ou ricina, veneno de abelha, veneno de cobra, imunotoxinas, antígeno E, inibidor de alfa-proteinase, alergênio de erva-de-santiago, melanina, proteínas de oligolisina, proteínas de RGD ou receptores opcionalmente correspondentes para uma destas proteínas; ou um derivado funcional ou fragmento de quaisquer destas proteínas ou receptores. Em uma modalidade particularmente preferida, a substância ativa é EPO, em particular EPO oxidada como descrito no seguinte.

Exemplos de enzimas incluem, mas não estão limitados a, enzimas específicas de carboidrato, enzimas proteolíticas, oxidases, oxidoreductases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, cinases e ligases. Exemplos não limitantes específicos são asparaginase, arginase, arginina desaminase, adenosina desaminase, glutaminase, glutaminase-asparaginase, fenilalanina, triptofanase, tirosinase, superóxido dismutase (SOD), endotoxinase, catalase, peroxidase, calicreína, tripsina, quimiotripsina, elastase, termolisina, lipase, uricase, adenosina difosfatase, purina nucleosídeo fosforilase, bilirrubina oxidase, glicose oxidase, glicodase, gliconato oxidase, galactosidase, glicocerebrosidase, glicuronidase, hialuronidase, fator de tecido, estreptocinase, urocinase, Mapa-cinases, DNA, RNAses, lactoferrina e derivados funcionais ou fragmentos destes.

De acordo com uma alternativa da presente invenção, a substância ativa é um fármaco de molécula pequena, um peptídeo e/ou uma proteína.

Entre outros, as proteínas seguintes devem ser mencionadas explicitamente: eritropoietina (EPO) tal como EPO recombinante humana (rhEPO), fatores estimuladores de colônia (CSF), tal como EPO recombinante humana (rhEPO), fatores estimuladores de colônia (CSF), tal como G-

CSF como G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), alfa-interferon (IFN alfa), beta-interferon (IFN beta) ou gama-interferon (IFN gama), tal como IFN alfa ou IFN beta recombinante humano (rhIFN alfa ou rhIFN beta), proteínas de soro tal como fatores de coagulação II-XIII como fator VII, fator VIII, ou
5 fator IX, alfa 1-antitripsina (AIAT), proteína ativada C (APC), ativadores de plasminogênio tal como ativador de plasminogênio tipo tecido (tPA), tal como ativador de plasminogênio de tecido humano (hTPA), AT III tal como AT III humano recombinante (rhAT III).

Exemplos para peptídeos incluem ACTH, adrenomedulina, pro-
10 teína beta-amilóide, angiotensina I, angiotensina II, peptídeo natriurético atrial (ANP), fragmentos de anticorpo, bradicinina, peptídeo natriurético de cérebro tipo B (BNP), calcitonina, fator liberador de corticotropina (CRF), endorfinas, endotelinas, encefalinas, gastrina, peptídeo relacionado à gastrina, polipeptídeo inibidor gástrico (GIP), peptídeo liberador de gastrina (GRP),
15 glucagon, peptídeos similar a glucagon, fator liberador do hormônio de crescimento (GRF), fator de crescimento de hepatócito, insulinas, hormônio liberador de gonadotropina (LH-RH, GnRH), neurocininas, oxitocina, paratormônio, somatostatina, substância P, hormônio liberador de tirotropina (TRH), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), e vasopressina.

20 A substância ativa é selecionada preferivelmente a partir do grupo composto de antibióticos, antidepressivos, antidiabéticos, antidiuréticos, anticolinérgicos, antiarrítmicos, antieméticos, antitussígenos, antiepiléticos, anti-histamínicos, antimicóticos, anti-simpatotônicos, antitrombóticos, androgênio, antiandrogênios, estrogênios, antiestrogênios, antiosteoporóticos, a-
25 gentes antitumor, vasodilatadores, outros agentes anti-hipertensivos, agentes antipiréticos, analgésicos, agentes antiinflamatórios, β -bloqueadores, citoestáticos, imunossupressores e vitaminas.

Alguns exemplos adicionais, não restritivos de substâncias ativas são albuterol, alendronato, amicazim, ampicilina, amoxicilina, anfotericina B, atenolol, azatioprina, cefaclor, cefadroxil, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cilastatina, cimetidina, ciprofloxacina, clonidina, colistina, cosintropina, ciclosserina, daunorrubicina, doxorubicina, desmopressina, diidroergo-

5 tamina, dobutamina, dopamina, efedrina, epinefrina, ácido ϵ -aminocapróico, ergometrina, esmolol, famotidina, flecainida, ácido fólico, flucitosina, furose-mida, ganciclovir, gentamicina, glucagon, hidrazalina, imipenem, isoproterenol, cetamina, liotironina, LHRH, merpatricina, metaraminol, metildopa, metoclopramida, metoprolol, mexiletina, mitomicina, neomicina, netilmicina, ni-

10 modipina, nistatina, octreotídeo, oxitocina, pamidronato, pentamidina, fentolamina, fenilefrina, procainamida, procaína, propranolol, ritodrina, sotalol, teicoplanina, terbutalina, tiamina, tiludronato, tolazolina, trimetoprim, trome-tamina, tilosina, vancomicina, vasopressina e vimblastina.

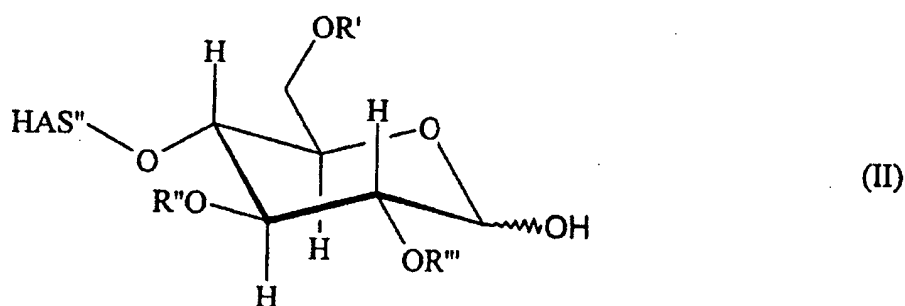
De acordo com uma alternativa, alguém pode tentar também empregar rifamicina, tetraciclina, espectomicina, estreptomicina ou eritromi-

15 cina como substâncias ativas.

Exemplos para um oligonucleotídeo são aptâmeros, DNA, RNA, PNA ou derivados destes.

No contexto da presente invenção, o termo "amido de hidroxial-

quila" (TEM) refere-se a um derivado de amido que foi substituído por pelo menos um grupo hidroxialquila. Um amido de hidroxialquila preferido da pre-sente invenção tem uma constituição de acordo com a fórmula (II)



em que R', R'' e R''' são independentemente hidrogênio, um grupo hidroxial-

20 quila linear ou ramificado ou o grupo



em que R¹, R², R³, e R⁴ são selecionados independentemente a partir do grupo, consistindo em hidrogênio e grupo alquila, preferivelmente hidrogênio e grupo metila,

m é 2 a 4, em que os resíduos R^1 e R^2 podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos m CR^1R^2 ; n é 0 a 20, preferivelmente 0 a 4; o é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de $n = 0$, o não é 0, e em que os resíduos R^3 e R^4 podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos o CR^3R^4 ,

- 5 onde o resíduo HAS" junto com a porção de glicose terminal constitui a molécula HAS, isto é, fórmula (II) mostra uma molécula HAS, a porção de carboidrato terminal da qual é mostrada explicitamente, a parte restante do amido da molécula sendo HAS".

- 10 Na fórmula (II) a extremidade de redução da molécula de amido é mostrada na forma não oxidada e a unidade de sacarídeo terminal de HAS é mostrado na forma de hemiacetal que, dependendo, por exemplo, do solvente, pode estar em equilíbrio com a forma de aldeído. A abreviação HAS" quando empregada no contexto da presente invenção refere-se a molécula HAS sem a unidade de sacarídeo terminal na extremidade de redução da
- 15 molécula HAS.

- O termo amido de hidroxialquila quando empregado na presente invenção não está limitado a compostos onde a porção de carboidrato terminal compreende grupos hidroxialquila R' , R'' e/ou R''' como descrito, devido à brevidade, na fórmula (II), mas também se refere aos compostos em que
- 20 pelo menos um grupo hidroxialquila que está em qualquer lugar presente, na porção de carboidrato terminal e/ou na parte restante da molécula de amido, HAS", é substituído por um grupo hidroxialquila R' , R'' , ou R''' .

Amido de hidroxialquila compreendendo dois ou mais grupos hidroxialquila é da mesma forma possível.

- 25 O pelo menos um grupo hidroxialquila compreendido em HAS pode conter um ou mais, em particular, dois ou mais grupos hidróxi. De acordo com uma modalidade preferida, o pelo menos um grupo hidroxialquila compreendido em HAS contém um grupo hidróxi.

- A expressão "amido de hidroxialquila" da mesma forma inclui
- 30 derivados em que o grupo alquila é mono ou polissubstituído. Neste contexto, é preferido que o grupo alquila seja substituído com um halogênio, especialmente flúor, ou com um grupo arila. Além disso, o grupo hidróxi de um

grupo hidroxialquila pode ser esterificado ou eterificado.

Além disso, em vez de alquila, da mesma forma grupos alceno não substituídos ou substituídos ramificados ou lineares podem ser empregados.

5 Amido de hidroxialquila é um derivado de éter de amido. Além dos referidos derivados de éter, da mesma forma outros derivados de amido podem ser empregados no contexto da presente invenção. Por exemplo, derivados são úteis os quais compreendem grupos hidróxi esterificados. Estes derivados podem ser, por exemplo, derivados de ácidos mono ou di-
10 carboxílicos não substituídos com 2-12 átomos de carbono ou de derivados substituídos destes. Especialmente úteis são derivados de ácidos monocarboxílicos não substituídos com 2-6 átomos de carbono, especialmente derivados de ácido acético. Neste contexto, amido de acetila, amido de butirila e amido de propionila são preferidos.

15 Além disso, derivados de ácidos dicarboxílicos não substituídos com 2-6 átomos de carbono são preferidos.

No caso de derivado de ácidos dicarboxílicos, é útil que o segundo grupo carbóxi do ácido dicarboxílico é da mesma forma esterificado. Além disso, derivados de ésteres de monoalquila de ácidos dicarboxílicos
20 são da mesma forma adequados no contexto da presente invenção.

Para os ácidos mono ou dicarboxílicos dissustituídos, os grupos substituídos podem ser preferivelmente os mesmos como mencionado acima para resíduos de alquila substituídos.

Técnicas para a esterificação de amido são conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Klemm D. e outros, Comprehensive Cellulose Chemistry Vol. 2, 1998, Wiley-VCH, Weinheim, New York, especialmente capítulo 4.4, Esterification of Cellulose (ISBN 3-527-29489-9).
25

De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, amido de hidroxialquila de acordo com a fórmula supracitada (II) é empregado. As outras estruturas de anel de sacarídeo compreendidas em HAS" podem ser iguais como ou diferentes do anel de sacarídeo explicitamente descrito, com a diferença que eles necessitam de uma extremidade de redução.
30

Até onde os resíduos R', R" e R''' de acordo com a fórmula (II) estão envolvidos não há nenhuma limitação específica. De acordo com uma modalidade preferida, R', R" e R''' são independentemente hidrogênio ou um grupo hidroxialquila, um grupo hidroxialquila ou um grupo hidroxialcarila tendo de 2 a 10 átomos de carbono no resíduo de alquila respectivo. Hidrogênio e grupos hidroxialquila tendo de 2 a 10 são preferidos. Mais preferivelmente, o grupo hidroxialquila tem de 2 a 6 átomos de carbono, mais preferivelmente de 2 a 4 átomos de carbono, e ainda mais preferivelmente de 2 a 3 átomos de carbono. Em uma modalidade preferida, amido de hidroxialquila é amido de hidroxietila em que R', R" e R''' são independentemente hidrogênio ou um grupo $(CH_2CH_2O)_n-H$, em que n é um número inteiro, preferivelmente 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

"Amido de hidroxialquila", portanto, preferivelmente compreende amido de hidroxietila, amido de hidroxipropila e amido de hidroxibutila, em que o amido de hidroxietila e amido de hidroxipropila são particularmente preferidos e amido de hidroxietila é o mais preferido.

O grupo alquila, aralquila e/ou alcarila pode ser linear ou ramificado e adequadamente substituído.

Portanto, a presente invenção da mesma forma refere-se a um método e um conjugado como descrito acima em que R', R" e R''' são independentemente hidrogênio ou um grupo hidroxialquila linear ou ramificado com a partir de 2 a 6 átomos de carbono.

Desse modo, R', R" e R''' preferivelmente pode ser H, hidroxiexila, hidroxipentila, hidroxibutila, hidroxipropila tais como 2-hidroxipropila, 3-hidroxipropila, 2-hidroxiisopropila, hidroxietila tal como 2-hidroxietila, hidrogênio e o grupo 2-hidroxietila sendo especialmente preferido.

Portanto, a presente invenção da mesma forma refere-se a um método e a um conjugado como descrito acima em que R', R" e R''' são independentemente hidrogênio ou um grupo 2-hidroxietila, uma modalidade em que pelo menos um resíduo R', R" e R''' sendo 2-hidroxietila sendo especialmente preferido.

Amido de hidroxietila (HES) é o mais preferido para todas as

modalidades da presente invenção.

Portanto, a presente invenção refere-se ao método e ao conjugado como descrito acima, em que o polímero é amido de hidroxietila e o derivado de polímero é um derivado de amido de hidroxietila.

- 5 Amido de hidroxietila (HES) é um derivado de amilopectina de ocorrência natural e é degradado por alfa-amilase no corpo. HES é um derivado substituído da amilopectina do polímero de carboidrato, que está presente em amido de milho em uma concentração de até 95% em peso. HES
- 10 de substituição de volume de sangue e na terapia de hemodiluição nas clínicas (Sommermeyer e outros, 1987, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278; e Weidler e outros, 1991, Arzneim. - Forschung/Drug Res., 41, 494-498).

- Amilopectina consiste em porções de glicose, em que na cadeia principal, ligações alfa-1,4-glicosídicas principais estão presentes e nos sítios de ramificação, ligações alfa-1,6-glicosídicas são encontradas. As propriedades físico-químicas desta molécula são principalmente determinadas pelo tipo de ligações glicosídicas. Devido à ligação alfa-1,4-glicosídica marcada, estruturas helicoidais com aproximadamente seis monômeros de glicose sucessivamente são produzidas. As propriedades físico-química como
- 15 também as bioquímicas do polímero podem ser modificadas por meio de substituição. A introdução de um grupo hidroxietila pode ser obtida por meio de hidroxietilação alcalina. Adaptando-se as condições de reação é possível explorar a reatividade diferente do grupo hidróxi respectivo no monômero de glicose não substituído com respeito a uma hidroxietilação. Devido a este
- 20 fato, a pessoa versada pode influenciar o padrão de substituição a uma extensão limitada.

- HES é principalmente caracterizado pela distribuição de peso molecular e pelo grau de substituição. Há duas possibilidades de descrever o grau de substituição:

- 30 1. O grau de substituição pode ser descrito com relação à porção de monômeros de glicose substituídos com respeito a todas as porções de glicose.

2. O grau de substituição pode ser descrito como a substituição molar, em que o número de grupos hidroxietila por porção de glicose é descrito.

5 No contexto da presente invenção, o grau de substituição, denotado como DS, refere-se à substituição molar, como descrito acima (vide da mesma forma Sommermeyer e outros, 1987, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278, como citado acima, em particular p. 273).

10 Soluções de HES estão presentes como composições polidispersas, em que cada molécula difere-se da outra com respeito ao grau de polimerização, o número e padrão de sítios de ramificação, e o padrão de substituição. HES é, portanto, uma mistura de compostos com peso molecular diferente. Por conseguinte, uma solução de HES particular é determinada por peso molecular médio com a ajuda de médias estatísticos. Neste contexto, M_n é calculado como a média aritmética que depende do número de mo-

15 léculas. Alternativamente, P_m (ou PM), o peso molecular médio ponderado, representa uma unidade que depende da massa do HES.

Preferivelmente, o amido de hidroxialquila empregado na invenção tem um peso molecular médio (média de peso) da partir de 1 a 300 kD. Amido de hidroxietila pode também exibir uma substituição molar preferida

20 de 0,1 a 3, preferivelmente 0,1 a 2, mais preferido 0,1 a 0,9 ou 0,4 a 2, preferivelmente 0,4 a 1,3, e uma relação preferida entre substituição de C2 : C6 na faixa de 2 a 20 com respeito aos grupos hidroxietila.

O termo "peso molecular médio" quando empregado no contexto da presente invenção refere-se ao peso como determinado de acordo com o método LALLS-(dispersão de luz à laser de ângulo inferior)-GPC como descrito em Sommermeyer e outros, 1987, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278; e Weidler e outros, 1991, Arzneim.- Forschung/Drug Res., 41, 494-498. Para pesos moleculares médios de 10 kD e menores, adicionalmente, o calibre foi realizado com um padrão que foi previamente qualificado por LALLS-

25

30 GPC.

De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, o peso molecular médio de amido de hidroxietila empregado é de 1 a 300

kD, mais preferivelmente de 2 a 200 kD, mais preferivelmente de 10 a 150 ou 4 a 130 kD, mais preferivelmente de 10 a 100 kD.

Um exemplo de HES que tem um peso molecular médio de cerca de 1 a 300 kD, preferivelmente 10 a 100 kD é um HES com uma substituição molar de 0,1 a 3, preferivelmente 0,4 a 1,3, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, ou 1,3, preferivelmente de 0,7 a 1,3, tal como 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, ou 1,3.

Um exemplo para HES com um peso molecular médio de cerca de 130 kD é Voluven® de Fresenius. Voluven® é um colóide artificial, empregado, por exemplo, para substituição de volume empregado na indicação terapêutica para terapia e profilaxia de hipovolemia. As características de Voluven® são um peso molecular médio de 130.000 +/- 20.000 D, uma substituição molar de 0,4 e uma relação de C2 : C6 de cerca de 9 : 1.

A presente invenção também se refere a um método e a conjugados como descrito acima em que o amido de hidroxialquila é amido de hidroxietila tendo um peso molecular médio de 10 a 150 kD, preferivelmente de 10 a 100 kD.

Faixas preferidas do peso molecular médio são, por exemplo, 10 a 150 kD, ou 10 a 130 kD, ou 30 a 130 kD, ou 50 a 130 kD, ou 70 a 130 kD, ou 100 a 130 kD, ou 10 a 100 kD, ou 4 a 100 kD, ou 10 a 100 kD, ou 12 a 100 kD, ou 18 a 100 kD, ou 50 a 100 kD, ou 4 a 70 kD, ou 10 a 70 kD, ou 12 a 70 kD, ou 18 a 70 kD, ou 50 a 70 kD, ou 4 a 50 kD ou 10 a 50 kD, ou 12 a 50 kD, ou 18 a 50 kD, ou 4 a 18 kD, ou 10 a 18 kD, ou 12 a 18 kD, ou 4 a 12 kD, ou 10 a 12 kD, ou 4 a 10 kD.

De acordo com modalidades particularmente preferidas da presente invenção, o peso molecular médio de amido de hidroxietila empregado está na faixa de mais de 4 kD e abaixo de 150 kD, tal como cerca de 10 kD, ou na faixa de 9 a 10 kD ou de 10 a 11 kD ou de 9 a 11 kD, ou cerca de 12 kD, ou na faixa de 11 a 12 kD ou de 12 a 13 kD ou de 11 a 13 kD, ou cerca de 15 kD, ou na faixa de 14 a 15 ou de 15 a 16 kD, ou cerca de 18 kD, ou na faixa de 17 a 18 kD ou de 18 a 19 kD ou de 17 a 19 kD, ou cerca de 50 kD, ou na faixa de 49 a 50 kD ou de 50 a 51 kD ou de 49 a 51 kD, ou cerca de

24/8

56 kD, ou na faixa de 55 a 56 kD ou de 56 a 57 kD.

De acordo com outra modalidade particularmente preferida da presente invenção, o peso molecular médio de amido de hidroxietila empregado está na faixa de mais de 60 kD e até 130 kD, tal como cerca de 70 kD ou na faixa de 65 a 75 kD, ou cerca de 80 kD ou na faixa de 75 a 85 kD, ou cerca de 90 kD ou na faixa de 85 a 95 kD ou cerca de 100 kD, ou na faixa de 95 a 105 kD, ou cerca de 110 kD ou na faixa de 105 a 115 kD, ou cerca de 120 kD ou na faixa de 115 a 125 kD ou cerca de 130 kD ou na faixa de 125 a 135 kD.

Quanto ao limite superior da substituição molar (DS), valores de até 3,0 tal como 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 ou 2,0 são da mesma forma possíveis, valores abaixo de 2,0 sendo preferidos, valores abaixo de 1,5 sendo mais preferido, valores abaixo de 1,3 tal como 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, ou 1,3 sendo ainda mais preferido.

Portanto, faixas preferidas da substituição molar são de 0,1 a 2 ou de 0,1 a 1,5 ou de 0,1 a 1,3 ou de 0,1 a 1,0 ou de 0,1 a 0,9 ou de 0,1 a 0,8. Faixas mais preferidas da substituição molar são de 0,2 a 2 ou de 0,2 a 1,5 ou de 0,2 a 1,0 ou de 0,2 a 0,9 ou de 0,2 a 0,8. Faixas ainda mais preferidas da substituição molar são de 0,3 a 2 ou de 0,3 a 1,5 ou de 0,3 a 1,0 ou de 0,3 a 0,9 ou de 0,3 a 0,8. Faixas ainda mais preferidas da substituição molar são de 0,4 a 2 ou de 0,4 a 1,5 ou de 0,4 a 1,3, ou de 0,4 a 1,0 ou de 0,4 a 0,9 ou de 0,4 a 0,8.

Até onde a substituição molar (DS) está envolvida, DS é preferivelmente pelo menos 0,1, mais preferivelmente pelo menos 0,2, mais preferivelmente pelo menos 0,4 e mais preferivelmente pelo menos 0,7. Faixas preferidas de DS são de 0,1 a 3, preferivelmente 0,1 a 2, mais preferida 0,1 a 1,3, mais preferida 0,1 a 0,9, mais preferivelmente de 0,1 a 0,8, mais preferivelmente de 0,2 a 0,8, mais preferivelmente de 0,3 a 0,8 e ainda mais preferivelmente de 0,4 a 0,8, ainda mais preferivelmente de 0,1 a 0,7, mais preferivelmente de 0,2 a 0,7, mais preferivelmente a partir de 0,3 a 0,7 e mais preferivelmente de 0,4 a 0,7. Valores particularmente preferidos de DS são, por exemplo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2 ou 1,3 com 0,2,

0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ou 0,8 sendo mais preferidas, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ou 0,8 sendo ainda mais preferidas, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ou 0,8 sendo ainda mais preferidas e, por exemplo, 0,4 ou 0,5 e 0,7 ou 0,8 sendo particularmente preferidas.

5 No contexto da presente invenção, um determinado valor da substituição molar tal como 1,3 pode ser o valor exato ou pode ser entendido como estando em uma faixa de 1,25 a 1,34, ou 1,0 pode ser o valor exato ou pode ser entendido como estando em uma faixa de 0,95 a 1,04, ou 0,9 pode ser o valor exato ou pode ser entendido como estando em uma faixa de 0,85
10 a 0,94 ou 0,8 pode ser o valor exato ou pode ser entendido como estando em uma faixa de 0,75 a 0,84. Portanto, por exemplo, um determinado valor de 0,1 pode ser o valor exato de 0,1 ou pode estar na faixa de 0,05 a 0,14, um determinado valor de 0,4 pode ser o valor exato de 0,4 ou na faixa de 0,35 a 0,44, ou um determinado valor de 0,7 pode ser o valor exato de 0,7
15 ou estar na faixa de 0,65 a 0,74.

 Combinações particularmente preferidas de peso molecular do amido de hidroxiálquila, preferivelmente amido de hidroxietila, e sua substituição molar DS são, por exemplo, 10 kD e 0,4 ou 10 kD e 0,7 ou 12 kD e 0,4 ou 12 kD e 0,7 ou 15 kD e 0,4 ou 15 kD e 0,7 ou 18 kD e 0,4 ou 18 kD e 0,7
20 ou 50 kD e 0,4 ou 50 kD e 0,7 ou 56 kD e 0,4 e 56 kD e 0,7 ou 70 kD e 0,4 ou 70 kD e 0,7, ou 100 kD e 0,4 ou 100 kD e 0,7 ou 130 kD e 0,4 ou 130 kD e 0,7.

 Até onde a relação de substituição de $C_2 : C_6$ está envolvida, a referida substituição está preferivelmente na faixa de 2 a 20, mais preferi-
25 velmente na faixa de 2 a 15 e ainda mais preferivelmente na faixa de 3 a 12.

 De acordo com uma outra modalidade da presente invenção, da mesma forma misturas de amidos de hidroxietila podem ser empregadas tendo pesos moleculares médios diferentes e/ou substituição molar diferente e/ou relações diferentes de substituição de $C_2 : C_6$. Portanto, misturas de
30 amidos de hidroxietila podem ser empregadas tendo pesos moleculares médios diferentes e substituição molar diferente e relações diferentes de substituição de $C_2 : C_6$, ou tendo pesos moleculares médios diferentes e substitui-

ção molar diferente e a mesma ou cerca da mesma relação de substituição de $C_2 : C_6$, ou tendo pesos moleculares médios diferentes e a mesma ou cerca da mesma substituição molar e relações diferentes de substituição de $C_2 : C_6$, ou tendo o mesmo ou cerca do mesmo peso molecular médio e substituição molar diferente e relações diferentes de substituição de $C_2 : C_6$, ou tendo pesos moleculares médios diferentes e a mesma ou cerca da mesma substituição molar e o mesmo ou cerca da mesma relação de substituição de $C_2 : C_6$, ou tendo o mesmo ou cerca dos mesmos pesos moleculares médios e substituição molar diferente e a mesmo ou cerca da mesma relação de substituição de $C_2 : C_6$, ou tendo o mesmo ou cerca do mesmo peso molecular médio e a mesma ou cerca da mesma substituição molar e relações diferentes de substituição de $C_2 : C_6$, ou tendo cerca do mesmo peso molecular médio e cerca da mesma substituição molar e cerca da mesma relação de substituição de $C_2 : C_6$.

Em conjugados diferente e/ou métodos diferentes de acordo com a presente invenção, amidos de hidroxialquila diferentes, preferivelmente amidos de hidroxietila diferentes e/ou misturas de hidroxialquila diferentes, preferivelmente misturas de amido de hidroxietila diferentes, podem ser empregados.

Em uma modalidade preferida, o amido de hidroxialquila ou derivado deste compreende 1 a 100, preferivelmente 1 a 15, em particular 1 grupo(s) aldeído, grupo(s) ceto e/ou grupo(s) hemiacetal ou em que o amido de hidroxialquila ou derivado deste compreende 1 a 100, preferivelmente 1 a 15, em particular 1 grupo(s) alfa-SH-beta amino.

Em outra modalidade preferida, a substância ativa compreende 1 a 15, preferivelmente 1 a 8, em particular 1 grupo(s) aldeído, grupo(s) ceto e/ou grupo(s) hemiacetal ou em que a substância ativa compreende 1 a 15, preferivelmente 1 a 8, em particular 1 grupo(s) alfa-SH-beta amino.

O amido de hidroxialquila, preferivelmente amido de hidroxietila, compreendendo o pelo menos um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou grupo alfa-SH-beta amino pode ser fornecido por cada método adequado.

Em uma modalidade preferida, o derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou referido grupo alfa-SH-beta amino é obtido por um método compreendendo

5 (a)(1) introduzir pelo menos um grupo aldeído no amido de hidroxialquila por uma reação de oxidação de abertura de anel, ou

(a)(2) reagir o amido de hidroxialquila com pelo menos um, pelo menos composto bifuncional, o referido composto compreendendo dois grupos funcionais M_1 e Q, um grupo funcional M_1 sendo reagido com o amido
10 de hidroxialquila e um grupo funcional Q sendo

(i) um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino; ou

(ii) um grupo funcional sendo quimicamente modificado para produzir o grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino.
15

De acordo com (a)(1) é preferido que amido de hidroxialquila seja submetido a uma reação de oxidação de abertura de anel empregando-se periodato para produzir um derivado de amido de hidroxialquila tendo pelo menos um grupo aldeído.

20 A reação de oxidação de abertura de anel de acordo com (a)(1) pode ser realizada em um meio aquoso. A reação de oxidação de abertura de anel é realizada em uma temperatura de 0 a 37°C, preferencialmente em 0 a 5°C.

Em uma modalidade preferida de (a)(2), o grupo funcional M_1 é
25 selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo carbóxi, um grupo carbóxi reativo, anidrido de ácido carboxílico, halogeneto de ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, cloroformatos, e grupos epóxido e o grupo funcional Q é um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal, grupo alfa-SH-beta amino, ou um grupo funcional sendo quimicamente modificado para
30 produzir um grupo aldeído, um grupo ceto, um grupo hemiacetal, ou um grupo alfa-SH-beta amino.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, o método-

do de acordo com (a)(2) pode compreender que o amido de hidroxialquila é reagido por meio da extremidade de redução opcionalmente oxidada do amido de hidroxialquila com o pelo menos um composto bifuncional compreendendo pelo menos dois grupos funcionais M_1 e Q.

5 O termo o qual o amido de hidroxialquila, preferivelmente amido de hidroxietila é reagido "por meio da extremidade de redução opcionalmente oxidada" quando empregado no contexto da presente invenção pode se referir-se a um processo de acordo com o qual o amido de hidroxialquila é reagido predominantemente por meio de sua extremidade de redução opcio-
10 nalmente oxidada.

Este termo "predominantemente por meio de sua extremidade de redução opcionalmente oxidada" refere-se a processos de acordo com o qual estatisticamente mais que 50%, preferivelmente pelo menos 55%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%,
15 mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 95% tal como 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% das moléculas de amido de hidroxialquila empregados para uma determinada reação
20 são reagidos por meio de pelo menos uma extremidade de redução opcionalmente oxidada por molécula de amido de hidroxialquila, em que uma determinada molécula de amido de hidroxialquila que é reagida por pelo menos uma extremidade de redução pode ser reagida na mesma determinada reação por meio de pelo menos um outro grupo funcional adequado que é compreendido na referida molécula de amido de hidroxialquila e que não é uma
25 extremidade de redução. Se uma ou mais molécula(s) de amido de hidroxialquila é(são) reagida(s) por meio de pelo menos uma redução e simultaneamente por meio de pelo menos um outro grupo funcional adequado que é compreendido nesta (nestas) molécula(s) de amido de hidroxialquila e que
30 não é um extremidade de redução, estatisticamente preferivelmente mais que 50%, preferivelmente pelo menos 55%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo

menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 95% tal como 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de todos os grupos funcionais reagidos

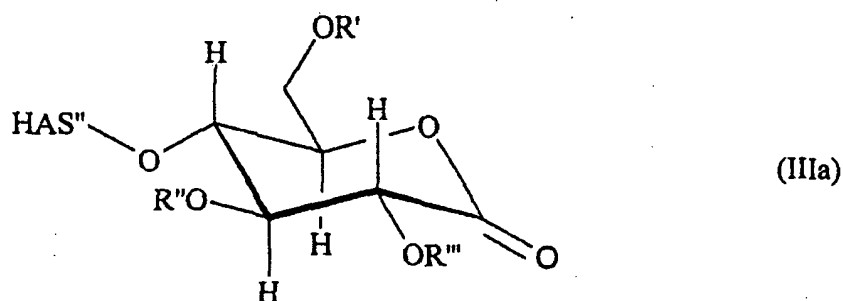
5 destas moléculas de amido de hidroxialquila, os referidos grupos funcionais incluindo as extremidades de redução, são extremidades de redução.

O termo "extremidade de redução" quando empregado no contexto da presente invenção refere-se ao grupo aldeído terminal de uma molécula de amido de hidroxialquila que pode estar presente como grupo aldeído

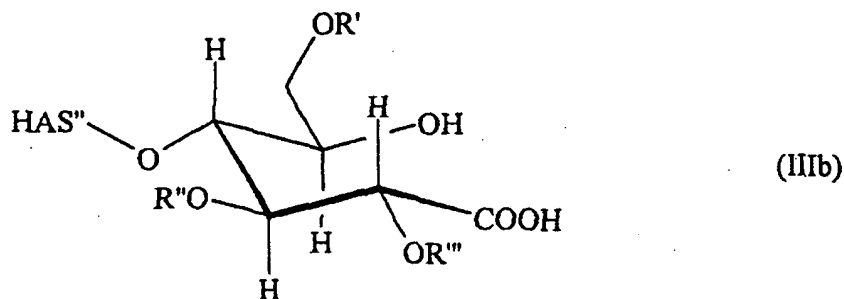
10 do e/ou como forma de hemiacetal correspondente. No caso da extremidade de redução ser oxidada, o grupo aldeído ou hemiacetal está na forma de um grupo carbóxi e/ou da lactona correspondente.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, o método de acordo com (a)(2) pode, portanto, compreender oxidar a hidroxialquila

15 em sua extremidade de redução para produzir o amido de hidroxialquila de acordo com a fórmula (IIIa)



e/ou de acordo com a fórmula (IIIb)



em que R', R'' e R''' são como definidos para fórmula II, e reagir o amido de hidroxialquila oxidado em sua extremidade de redução com pelo menos um

20 composto adequado para produzir um amido de hidroxialquila funcionalizado por aldeído, ceto, hemiacetal ou alfa-SH-beto amido.

R/

Oxidação do amido de hidroxialquila, preferivelmente amido de hidroxietila, pode ser realizada de acordo com cada método ou combinação de métodos que resultam em compostos tendo as estruturas (IIIa) e/ou (IIIb) supracitadas. Embora a oxidação possa ser realizada de acordo com todos os métodos ou método adequados que resultam na extremidade de redução oxidada do amido de hidroxialquila, é preferivelmente realizada empregando-se uma solução de iodo alcalina como descrito, por exemplo, em DE 196 28 705 A1, os conteúdos respectivos dos quais (exemplo A, coluna 9, linhas 6 a 24) são incorporados aqui por referência.

Em outra modalidade preferida, o grupo hemiacetal do amido de hidroxialquila é o grupo hemiacetal da extremidade de redução do amido de hidroxialquila em sua forma não oxidada.

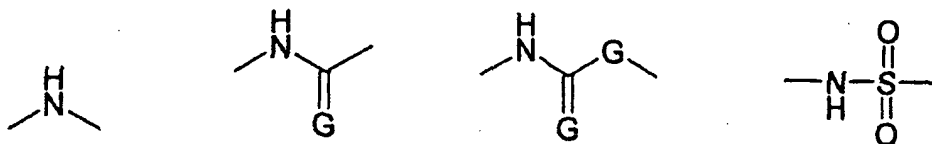
De acordo com (a)(2) é preferido que o amido de hidroxialquila, opcionalmente oxidado em sua extremidade de redução, seja reagido com um pelo menos composto bifuncional compreendendo um grupo funcional M_1 que é reagido com o amido de hidroxialquila, preferivelmente na extremidade de redução opcionalmente oxidada, e um grupo funcional Q que é um grupo aldeído, um grupo ceto, um grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino ou um grupo funcional que pode ser modificado para produzir qualquer um destes grupos.

Como grupo funcional M_1 do pelo menos composto bifuncional que é reagido com o amido de hidroxialquila, especialmente um grupo deve ser mencionado tendo a estrutura R^*-NH- onde R^* é hidrogênio ou um resíduo de alquila, cicloalquila, arila, aralquila, arilcicloalquila, alcarila ou cicloalquilarila onde o resíduo de cicloalquila, arila, aralquila, arilcicloalquila, alcarila ou cicloalquilarila pode ser ligado diretamente ao grupo NH ou, de acordo com outra modalidade, pode ser ligado por uma ponte de oxigênio ao grupo NH. Os resíduos de alquila, cicloalquila, arila, aralquila, arilcicloalquila, alcarila, ou cicloalquilarila podem ser adequadamente substituídos. Como substituintes preferidos, halogênios tal como F, Cl ou Br podem ser mencionados. Resíduos especialmente preferidos R^* são hidrogênio, grupos alquila e alcóxi, e ainda mais preferidos são hidrogênio e grupos alcóxi e alquila não substituídos.

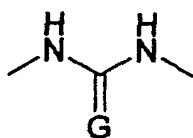
3/

Entre os grupos alquila e alcóxi, grupos com 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 átomos de C são preferidos. Mais preferidos são grupos metila, etila, propila, isopropila, metóxi, etóxi, propóxi, e isopropóxi. Especialmente preferidos são metila, etila, metóxi, etóxi, e preferência particular é dada a metila ou metóxi.

- 5 De acordo com outra modalidade da presente invenção, o grupo funcional M_1 tem a estrutura R^*-NH-R^{**} onde R^{**} preferivelmente compreende a unidade de estrutura $-NH-$ e/ou a unidade de estrutura $-(C=G)-$ onde G é O ou S, e/ou a unidade de estrutura $-SO_2-$. Exemplos específicos para o grupo funcional R^{**} são

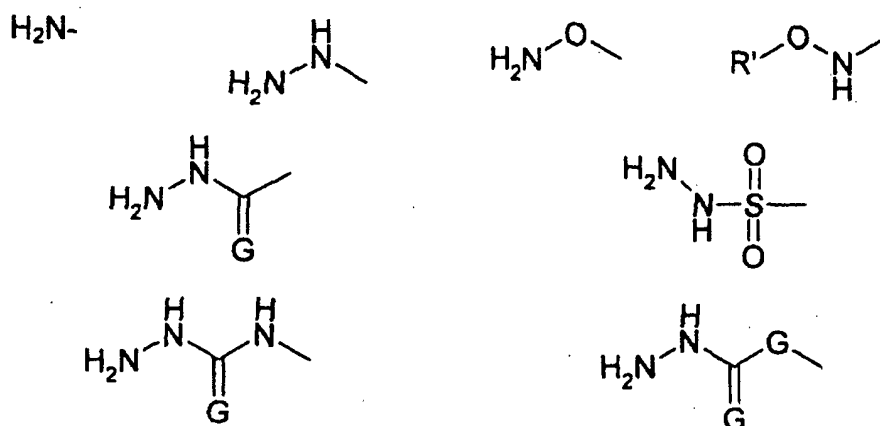


e



- 10 onde, se G estiver presente duas vezes, é independentemente O ou S.

Portanto, a presente invenção da mesma forma refere-se a um método e um conjugado como mencionado acima em que o grupo funcional M_1 é selecionado a partir do grupo que consiste em



- 15 em que G é O ou S e, se presente duas vezes, independentemente O ou S, e R' é metila.

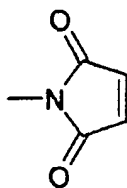
De acordo com uma modalidade particularmente preferida da presente invenção, o grupo funcional M_1 é um grupo amino $-NH_2$.

Com respeito ao caso quando o grupo Q é um grupo aldeído, um grupo ceto, um grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino ou um grupo funcional sendo quimicamente modificado para produzir um destes grupos, os seguintes grupos funcionais devem ser mencionados, entre

5 outros:

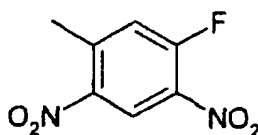
- ligações duplas de C-C ou ligações triplas de C-C ou ligações de C-C aromáticas;
- o grupo tio ou o grupo hidróxi ;
- hidrazida de ácido alquil sulfônico, hidrazida de ácido aril sulfônico;
- 10 - 1,2-dióis;
- 1,2 amino-tioálcoois;
- azidas;
- 1,2-aminoálcoois;
- o grupo amino -NH₂ ou derivados dos grupos aminos que com-
- 15 preendem a unidade de estrutura -NH- tais como grupos aminoalquila, grupo aminoarila, grupo aminoaralquila, ou grupos alcarliamino;
- o grupo hidroxilamino -O-NH₂, ou derivados do grupo hidroxilami-
- no compreendendo a unidade da estrutura -O-NH -, tais como grupos hidro-
- xilalquilamino, grupos hidroxilarilamino, grupos hidroxilaralquilamino, ou gru-
- 20 pos hidroxialcarilamino;
- grupos alcoxiamino, grupos ariloxiamino, grupos aralquioxiamino, ou grupos alcariloxiamino, cada qual compreendendo a unidade de estrutura -NH-O-;
- resíduos que têm um grupo carbonila, -Q-C(=G)-M, em que G é O
- 25 ou S, e M é, por exemplo,
- -OH ou -SH ;
- um grupo alcóxi, um grupo arilóxi, um grupo aralquilóxi, ou um grupo alcarilóxi;
- um grupo alquiltio, um grupo ariltio, um grupo aralquiltio, ou um
- 30 grupo alcariltio;
- um grupo alquilcarbonilóxi, um grupo arilcarbonilóxi, um grupo aralquilcarbonilóxi, um grupo alcarilcarbonilóxi ;

- ésteres ativados tais como ésteres de hidroxilaminas tendo estrutura de imida tal como N-hidroxissuccinimida ou tendo uma unidade de estrutura O-N onde N faz parte de um composto de heteroarila ou, com G = O e Q ausente, tais como compostos de arilóxi com um resíduo de arila substituído tal como pentafluorofenila, paranitrofenila ou triclorofenila;
- 5 em que Q está ausente ou NH ou um heteroátomo tal como S ou O;
- -NH-NH₂ ou -NH-NH-;
 - -NO₂;
 - o grupo nitrila;
 - 10 - grupos carbonila tais como o grupo aldeído ou o grupo ceto;
 - o grupo carbóxi;
 - o grupo -N=C=O ou o grupo -N=C=S;
 - grupos haleto de vinila tal como o iodeto de vinila ou o grupo brometo de vinila ou triflato;
 - 15 - -C≡C-H;
 - -(C=NH₂Cl)-OAlquila
 - grupos -(C=O)-CH₂-Hal em que Hal é Cl, Br ou I;
 - -CH=CH-SO₂-;
 - um grupo dissulfeto que compreende a estrutura -S-S-;
 - 20 - o grupo



;

- o grupo



- Em uma modalidade preferida do método desta invenção, o grupo funcional M₁ é reagido com um grupo OH no amido de hidroxialquila (ou a extremidade de redução não oxidada ou opcionalmente oxidada de amido de hidroxialquila). O grupo funcional M₁ nesta modalidade é preferivelmente um
- 25 grupo carbóxi ou um grupo carbóxi reativo e o grupo funcional Q é um grupo

aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal, em particular o composto bifuncional compreendendo M_1 e Q é selecionado a partir do grupo que consiste em ácido formilbenzóico, éster de pentafluorofenila de ácido 4-formilbenzóico, éster de N-hidroxissuccinimida de ácido 4-formilbenzóico, ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenóxi)butírico, e anidrido de ácido 4-formilbenzóico ou um composto biocompatível selecionado a partir do grupo que consiste em ácidos alfa-ceto carboxílicos, ácidos neuramínicos ou derivado destes e piridoxal fosfato.

Quanto aos ácidos alfa-ceto carboxílicos, esses são preferivelmente ácidos alfa-ceto carboxílicos derivados a partir de aminoácidos e também podem na maioria dos exemplos ser encontrados no corpo humano. Os ácidos alfa-ceto carboxílicos preferidos derivados a partir de aminoácidos são selecionados a partir do grupo que consiste em ceto-valina, ceto-leucina, ceto-isoleucina e ceto-alanina. Em uma modalidade preferida do método desta invenção, o grupo carboxi dos ácidos alfa-ceto carboxílicos é reagido com um grupo OH no amido de hidroxialquila (ou a extremidade de redução opcionalmente oxidada ou não oxidada de amido de hidroxialquila) ou é reagido com grupo Q do amido de hidroxialquila que é um grupo amino. O grupo ceto livre restante do ácido alfa-ceto carboxílico pode ser em seguida reagido para formar a tiazolidina.

Adequadamente, a presente invenção refere-se a um método de acordo com (a)(2)(i) ou (a)(2)(ii), em que o amido de hidroxialquila é reagido com um ácido alfa-ceto carboxílico. Quanto aos ácidos neuramínicos ou siálicos ou derivados destes, esses são preferivelmente biocompatíveis, em particular eles são açúcares encontrados no corpo humano, que são N- e/ou O-acetilados. Em uma modalidade preferida, os ácidos neurâmicos ou ácidos siálicos são ácidos N-acetilneurâmicos ácidos. Estes compostos mostram uma rigidez desejada por causa da estrutura de piranose a fim de cumprir a função como um espaçador. Por outro lado, pode ser possível introduzir um grupo aldeído nestes compostos através de oxidação seletiva. Ácidos siálicos são encontrados no corpo humano, por exemplo, como monossacarídeos terminais em cadeias de glicano de proteínas glicosiladas.

Em uma modalidade preferida, o ácido siálico pode ser seletiva-

mente oxidado para um grupo aldeído.

Os métodos para seletivamente oxidar ácidos siálicos ou ácidos neurâmicos são conhecidos na técnica, por exemplo, de L.W. Jaques, B.F. Riesco, W. Weltner, Carbohydrate Research, 83 (1980), 21 - 32 e T. Masuda, S. Shibuya, M. Arai, S. Yoshida, T. Tomozawa, A. Ohno, M. Yamashita, T. Honda, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 13 (2003), 669 - 673. Preferivelmente, a oxidação do ácido siálico pode ser administrada antes da reação com amido de hidroxialquila.

O ácido siálico opcionalmente oxidado pode ser em seguida reagido por meio de seu grupo ácido carboxílico com amido de hidroxialquila. Em uma modalidade preferida do método desta invenção, o grupo carbóxi do ácido siálico oxidado é reagido com um grupo OH no amido de hidroxialquila ou na extremidade de redução opcionalmente oxidada ou não oxidada de amido de hidroxialquila ou é reagido com grupo Q do amido de hidroxialquila que é um grupo amino. O grupo carbonila restante do ácido siálico oxidado pode ser em seguida reagido para formar a tiazolidina.

Conseqüentemente, a presente invenção refere-se a um método de acordo com (a)(2)(i) ou (a)(2)(ii), em que o amido de hidroxialquila é reagido com um ácido siálico oxidado.

Quanto ao piridoxal fosfato (PyP), este é um composto bifuncional altamente biocompatível e também é chamado vitamina B6. PyP é uma co-enzima que participa nas transaminações, descarboxilações, racemizações, e numerosas modificações de cadeias laterais de aminoácido. Todas as enzimas de requerimento de PyP agem por meio de formação de uma base de Schiff entre o aminoácido e a co-enzima.

Em uma modalidade preferida do método desta invenção, o grupo fosfato da PyP é reagido com um grupo OH no amido de hidroxialquila ou extremidade de redução opcionalmente oxidada ou não oxidada de amido de hidroxialquila que forma um grupo fosfato ou é reagido com grupo Q do amido de hidroxialquila que é um grupo amino que forma uma fosforamida. O grupo carbonila restante de PyP pode ser em seguida reagido para formar a tiazolidina.

No caso de PyP, o grupo funcional do amido de hidroxialquila é introduzido preferivelmente no amido de hidroxialquila por uso de um composto diamino como descrito acima.

Conseqüentemente, a presente invenção refere-se a um método de acordo com (a)(2)(i) ou (a)(2)(ii), em que o amido de hidroxialquila é reagido com piridoxal fosfato.

Em uma modalidade preferida em (a)(2)(i), o grupo funcional M_1 é selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo carbóxi, um grupo carbóxi reativo, anidrido de ácido carboxílico, halogeneto de ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, éster de ácido clorofórmico, e grupos epóxido, e o grupo funcional Q é um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal, em que o grupo funcional M_1 é reagido com grupos OH no amido de hidroxialquila.

Em uma modalidade preferida em (a)(2)(i), o grupo funcional M_1 é selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo amino e grupo alfa-SH-beta-amino, e o grupo funcional Q é um grupo alfa-SH-beta amino, em particular em que o grupo funcional M_1 é reagido com a extremidade de redução opcionalmente oxidada do amido de hidroxialquila.

Em uma modalidade preferida em (a)(2)(i), o amido de hidroxialquila que compreende o referido grupo alfa-SH-beta-amino é obtido por um método que compreende reagir amido de hidroxialquila na extremidade de redução opcionalmente oxidada com um composto que compreende um grupo funcional M_1 e um grupo funcional Q que é um grupo alfa-SH-beta-amino, em particular em que o composto que compreende M_1 e o grupo alfa-SH-beta-amino é 1,3-diamino-2-tiopropano ou 2,3-diamino-1-tiopropano.

Em uma modalidade preferida em (a)(2)(ii) o pelo menos composto bifuncional compreende M_1 que é um grupo carbóxi ou um grupo carbóxi reativo e Q que é um grupo alfa-SH-beta amino protegido, em particular em que o, pelo menos, composto bifuncional é selecionado a partir do grupo que consiste em D-, L-PG₁-Cis(PG₂)-OH, ou uma mistura racêmica deste, e o seu éster ativo, em que PG₁ pode ser qualquer grupo protetor adequado para um grupo amino, preferivelmente selecionado a partir do grupo que

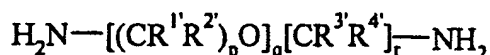
consiste em *terc*-butiloxicarbonila (Boc) ou 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc), e PG₂ pode ser qualquer grupo protetor adequado para um grupo tiol, preferivelmente selecionado a partir do grupo que consiste em tritila (Trt), p-metoxitritila (Mmt) S-*terc*-butiltio (S-t-Bu) e acetamidometila (Acm).

5 De acordo com (a)(2)(ii), o grupo funcional Q é um grupo que é também modificado para produzir um grupo aldeído, um grupo ceto, um grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino. De acordo com esta modalidade, o derivado de amido de hidroxiálquila resultante da reação de amido de hidroxiálquila, opcionalmente oxidado em sua extremidade de redução,
10 com o pelo menos composto bifuncional, é reagido com um outro pelo menos composto bifuncional que compreende um grupo funcional que é reagido com o grupo funcional Q do derivado de amido de hidroxiálquila.

No caso preferido de (a)(2)(ii), ambos M₁ e Q são um grupo amino -NH₂, M₁ e Q podem ser separados por qualquer espaçador adequado.
15 Entre outros, o espaçador pode ser um resíduo de hidrocarboneto opcionalmente substituído, linear, ramificado e/ou cíclico. Geralmente, o resíduo de hidrocarboneto tem a partir de 1 a 40, preferivelmente a partir de 1 a 20, mais preferivelmente a partir de 2 a 10, mais preferivelmente a partir de 2 a 6 e especialmente preferivelmente a partir de 2 a 4 átomos de carbono. Se
20 heteroátomos estiverem presentes, o grupo de separação geralmente compreende a partir de 1 a 20, preferivelmente a partir de 1 a 8 e especialmente preferivelmente a partir de 1 a 4 heteroátomos. O resíduo de hidrocarboneto pode compreender uma cadeia de álquila opcionalmente ramificada ou um grupo arila ou um grupo cicloálquila tendo, por exemplo, a partir de 5 a 7 á-
25 tomos de carbono, ou ser um grupo arálquila, um grupo alcarila onde a parte álquila pode ser um grupo álquila linear ou cíclico. De acordo com uma modalidade até mesmo mais preferida, o resíduo de hidrocarboneto é uma cadeia de álquila a partir de 1 a 20, preferivelmente a partir de 2 a 10, mais preferivelmente a partir de 2 a 6, e especialmente preferivelmente a partir de
30 2 a 4 átomos de carbono.

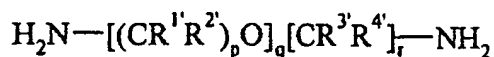
Em uma modalidade do método da invenção de acordo com (a)(2)(ii), é preferido que o, pelo menos, composto bifuncional que compre-

- ende M₁ e Q é um diaminoalcano opcionalmente substituído que tem a partir de 1 a 20 átomos de carbono, preferivelmente um composto que é selecionado a partir do grupo que consiste em 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, e 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 1,6-diaminoexano, 1,7-diaminoeptano, 1,8-diaminooctano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminodecano, 1,11-diaminoundecano, 1,12-diaminododecano, 1,13-diaminotridecano, 1,14-diaminotetradecano, 1,15-diaminopentadecano, 1,16-diaminoexadecano, 1,17-diaminoeptadecano, 1,18-diaminooctadecano, 1,19-diaminononadecano, e 1,20-diaminoeicosano ou um composto tendo a fórmula



- em que R¹, R², R³ e R⁴ são independentemente selecionados a partir do grupo, que consiste em hidrogênio, e grupo alquila, preferivelmente grupo metila e hidrogênio, p é 2 a 4, em que os resíduos R¹ e R² podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos p, CR¹ R², q é 0 a 20, preferivelmente 0 a 10; r é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de q = 0, r não é 0, e em que os resíduos R³ e R⁴ podem ser os mesmos ou diferentes no grupo r, CR³ R⁴.

- Uma modalidade preferida da presente invenção também se refere a um método como descrito acima, em que o amido de hidroxialquila é reagido com um composto bifuncional que pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, e 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 1,6-diaminoexano, 1,7-diaminoeptano, 1,8-diaminooctano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminodecano, 1,11-diaminoundecano, 1,12-diaminododecano, 1,13-diaminotridecano, 1,14-diaminotetradecano, 1,15-diaminopentadecano, 1,16-diaminoexadecano, 1,17-diaminoeptadecano, 1,18-diaminooctadecano, 1,19-diaminononadecano e 1,20-diaminoeicosano ou um composto tendo a fórmula



em que R¹, R², R³ e R⁴ são independentemente selecionados a partir do grupo, que consiste em hidrogênio, e grupo alquila, preferivelmente grupo

metila e hidrogênio, p é 2 a 4, em que os resíduos $R^{1'}$ e $R^{2'}$ podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos p , $CR^{1'} R^{2'}$, q é 0 a 20, preferivelmente 0 a 4, e r é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de $q = 0$, r não é 0, e em que os resíduos $R^{3'}$ e $R^{4'}$ podem ser os mesmos ou diferentes no grupo r , $CR^{3'} R^{4'}$, em particular 1,4-diaminobutano, para produzir um derivado de amido de hidroxialquila funcionalizada por amino e este derivado de amido de hidroxialquila funcionalizada por amino é também reagido com um pelo menos composto bifuncional contendo um grupo funcional reativo com o grupo amino da hidroxialquila funcionalizada por amino e um grupo funcional que é pelo menos um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou grupo alfa-SH-beta amino. Este outro composto bifuncional é preferivelmente selecionado a partir do grupo que consiste em ácido formilbenzóico, ácido 4-formilbenzóico, éster de pentafluorofenila, éster de N-hidroxissuccinimida de ácido 4-formilbenzóico, ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenóxi)butírico e anidrido de ácido 4-formilbenzóico ou um composto biocompatível selecionado a partir do grupo que consiste em ácidos alfa-ceto carboxílico, ácidos neuramínicos ou derivado destes e piridoxal fosfato.

Em outra modalidade do método em (a)(2)(ii), o amido de hidroxialquila que compreende o referido grupo alfa-SH-beta-amino é obtido por um método que compreende opcionalmente oxidar amido de hidroxialquila em sua extremidade de redução, reagir a extremidade de redução oxidada ou não oxidada com um grupo funcional M_1 de um composto que compreende, além de M_1 , um outro grupo funcional Q , para produzir um primeiro derivado de amido de hidroxialquila, e reagir o grupo funcional Q do primeiro derivado de amido de hidroxialquila com um grupo funcional V de um composto que compreende, além de V , um grupo alfa-SH-beta-amino opcionalmente protegido, para produzir o derivado de amido de hidroxialquila funcionalizada por alfa-SH-beta-amino opcionalmente protegido. Os grupos funcionais M_1 e Q são preferivelmente como descrito acima.

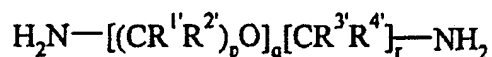
Em uma modalidade preferida, o composto que compreende V e o grupo alfa-SH-beta-amino opcionalmente protegido é cisteína ou um derivado destes, V que é um grupo carbóxi ou um grupo carbóxi reativo, preferi-

velmente um éster reativo ou um anidrido de ácido carboxílico.

Preferivelmente, em (a)(2)(ii), amido de hidroxialquila em sua forma não oxidada é reagido com um composto bifuncional que tem um grupo amino M_1 e um grupo amino Q por animação redutiva. Em particular, o

5 composto bifuncional pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em aminas primárias, amônia, 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, e 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 1,6-diaminoexano, 1,7-diaminoeptano, 1,8-diaminooctano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminodecano, 1,11-diaminoundecano, 1,12-diaminododecano, 1,13-diaminotridecano, 1,14-diaminotetradecano, 1,15-diaminopentadecano, 1,16-diaminoexadecano, 1,17-diaminoeptadecano, 1,18-diaminooctadecano, 1,19-diaminononadecano, e 1,20-diaminoeicosano ou um composto tendo a fórmula

10



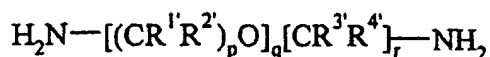
em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são independentemente selecionados a partir do grupo, que consiste em hidrogênio, e grupo alquila, preferivelmente hidrogênio e grupo metila, p é 2 a 4, em que os resíduos R^1 e R^2 podem ser os

15 mesmos ou diferentes nos grupos p, CR^1R^2 , q é 0 a 20, preferivelmente 0 a 4, e r é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de q = 0, r não é 0, e em que os resíduos R^3 e R^4 podem ser os mesmos ou diferentes no grupo r, CR^3R^4 , em particular 1,4 diaminobutano.

20 Preferivelmente, em (a)(2)(ii), o amido de hidroxialquila oxidada em sua extremidade de redução é reagido com um composto bifuncional que tem um grupo amino M_1 e um grupo amino Q por uma reação de abertura de anel de lactona. Em particular, o composto bifuncional pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, e

25 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 1,6-diaminoexano, 1,7-diaminoeptano, 1,8-diaminooctano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminodecano, 1,11-diaminoundecano, 1,12-diaminododecano, 1,13-diaminotridecano, 1,14-diaminotetradecano, 1,15-diaminopentadecano, 1,16-diaminoexadecano, 1,17-diaminoeptadecano, 1,18-diaminooctadecano, 1,19-diaminononadecano, e 1,20-diaminoeicosano ou um composto tendo a fórmula

30



em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são independentemente selecionados a partir do grupo, que consiste em hidrogênio, e grupo alquila, preferivelmente hidrogênio e grupo metila, p é 2 a 4, em que os resíduos R^1 e R^2 podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos p , CR^1R^2 , q é 0 a 20, preferivelmente 0 a 4, e r é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de $q = 0$, r não é 0, e em que os resíduos R^3 e R^4 podem ser os mesmos ou diferentes no grupo r , CR^3R^4 , em particular 1,4 diaminobutano.

Preferivelmente, em (a)(2)(ii), amido de hidroxialquila é primeiro reagido com um composto bifuncional que tem um grupo amino Q, preferivelmente preparado como descrito acima, e o amido de hidroxialquila funcionalizada por amino obtido é também reagida com um composto bifuncional que tem um grupo carboxílico ativado e um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal.

Em uma modalidade particularmente preferida, o método da invenção em (a)(2)(ii) compreende reagir o amido de hidroxialquila preferivelmente oxidado com um composto que tem um grupo amino M_1 e um grupo amino Q, em particular um composto de diaminoalquila, especialmente 1,4-diaminobutano, e em seguida reagir o amido de hidroxialquila funcionalizada por amino com um composto selecionado a partir do grupo que consiste em cisteína opcionalmente protegida e ácido 4-formil benzóico.

A substância ativa que compreende o pelo menos um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou grupo alfa-SH-beta amino pode ser fornecida por todo método adequado.

Em uma modalidade preferida, a substância ativa, preferivelmente uma proteína opcionalmente modificada, peptídeo, peptídeo sintético ou oligonucleotídeo, que compreende o referido grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou grupo alfa-SH-beta-amino é obtida por um método que compreende

(b)(1) introduzir pelo menos um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou pelo menos um grupo alfa-SH-beta-amino na substância ativa

42

durante sua preparação ou por modificação química; ou

- (b)(2) reagir a substância ativa com um pelo menos composto bifuncional, o referido composto que compreende dois grupos funcionais M_2 e Q, um grupo funcional M_2 que é reagido com a substância ativa e um grupo funcional Q que é:

- (i) um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino; ou
- (ii) um grupo funcional que é quimicamente modificado para produzir o grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino.

Preferivelmente em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou peptídeo que foi preparado por síntese orgânica, preferivelmente produzido empregando-se uma resina de síntese, que permite uma proteína ou peptídeo funcionalizado por aldeído, funcionalizado por ceto, funcionalizado por hemiacetal ou funcionalizado por alfa-SH-beta-amino, ou em que em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou peptídeo que foi produzido empregando-se um vetor de expressão que conduz a uma proteína ou peptídeo funcionalizado por aldeído, funcionalizado por ceto, funcionalizado por hemiacetal ou funcionalizado por alfa-SH-beta-amino, ou em que em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou um peptídeo e a cadeia principal da proteína ou peptídeo é substituída com um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou grupo alfa-SH-beta-amino, ou em que em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou um peptídeo onde o referidor grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou grupo alfa-SH-beta-amino é ligado diretamente à cadeia principal da proteína ou peptídeo ou faz parte de uma cadeia lateral da cadeia principal.

Em uma modalidade preferida (b)(1), a substância ativa é obtida por modificação da substância ativa, em particular de uma proteína ou um peptídeo por oxidação para introduzir um grupo aldeído.

Em uma modalidade preferida, a substância ativa é uma proteína ou peptídeo e o grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal está compreendido em uma porção de carboidrato do polipeptídeo, em particular em

que a porção de carboidrato é selecionada a partir do grupo que consiste em hidroxialdeídos, hidroxicetonas e modificações químicas destes. A porção de carboidrato pode ser um derivado de um porção de carboidrato de ocorrência natural e é selecionar a partir do grupo que consiste em glicose, galactose, manose e ácido siálico, que são opcionalmente quimicamente ou enzimaticamente oxidados, preferivelmente uma galactose oxidada ou um resíduo ácido siálico oxidado de uma cadeia lateral de carboidrato, mais preferivelmente a galactose terminal ou resíduo de ácido siálico de uma cadeia lateral de carboidrato, a oxidação de uma porção de carboidrato terminal que é preferivelmente realizada enzimaticamente ou quimicamente, uma oxidação química preferivelmente realizada empregando-se um periodato.

Em uma modalidade preferida, a porção de carboidrato é um derivado de uma porção de carboidrato de ocorrência natural e é uma galactose terminal que é enzimaticamente ou quimicamente oxidada, em que o resíduo de galactose terminal é obtido opcionalmente depois da clivagem de um ácido siálico terminal.

Em uma modalidade preferida, o grupo alfa-SH-beta-amino é compreendido em um resíduo de cisteína da substância ativa, preferivelmente uma proteína ou peptídeo, o resíduo de cisteína que é preferivelmente um resíduo de cisteína de terminal N da substância ativa.

Em uma modalidade preferida, a substância ativa é um peptídeo ou proteína modificada ou com um resíduo de cisteína de terminal N, que não faz parte de uma ponte de dissulfeto, em particular em que o peptídeo ou proteína modificada que possui um resíduo de cisteína de terminal N é um mutante de uma proteína ou peptídeo de ocorrência natural, obtido (1) adicionando-se um resíduo de cisteína ao aminoácido de terminal N, (2) substituindo-se o aminoácido de terminal N com cisteína, ou (3) eliminando-se o(s) aminoácido(s) de terminal N até uma cisteína terminal ser obtida.

Nos peptídeos, a cisteína mencionada pode ser introduzida durante a síntese. Síntese de peptídeo é conhecida na técnica. (W. Chang, P. D. White; Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach; Oxford University Press, Oxford, 2000, ISBN 0199637245).

Polipeptídeos recombinantes são obteníveis por meio de técnicas biológicas moleculares padrão como, por exemplo, descritas em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edição, Eds. Sambrook e outros, CSHL Press 2001. Resumidamente, polipeptídeos podem ser expressos a partir de

5 vetores de expressão recombinantes que compreendem um ácido nucléico que codifica o polipeptídeo desejado, cujo ácido nucléico está operavelmente ligado a pelo menos uma seqüência reguladora que permite a expressão do polipeptídeo desejado. Por exemplo, uma seqüência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo desejado pode ser isolada e pode ser clonada

10 em um vetor de expressão e o vetor pode ser em seguida transformado em uma célula hospedeira adequada para expressão do polipeptídeo desejado. Um tal vetor pode ser um plasmídeo, um fagomídeo ou um cosmídeo. Por exemplo, uma molécula de ácido nucléico pode ser clonada de um modo adequado em vetores de expressão procarióticos ou eucarióticos (*Molecular*

15 *Cloning*, vide acima). Tais vetores de expressão compreendem pelo menos um promotor e também podem compreender um sinal para iniciação de translação e - no caso de vetores de expressão procarióticos - um sinal para terminação de translação, enquanto no caso de vetores de expressão eucarióticos, preferivelmente sinais de expressão para terminação transcricional e

20 para poliadenilação são compreendidos. Exemplos para vetores de expressão procarióticos são, para expressão em *Escherichia coli*, por exemplo, vetores de expressão com base em promotores reconhecidos por RNA polimerase de T7 como descrito em US 4.952.496, para vetores de expressão eucarióticos para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, os

25 vetores G426/Met25 ou P526/Gal1 (Mumberg e outros, (1994) *Nucl. Acids Res.*, 22, 5767-5768), para a expressão em células de inseto, por exemplo, vetores de *Baculovirus*, como por exemplo, descrito em EP-B 1-0127839 ou EP-B 1-0549721 ou por Ciccarone e outros. ("Generation of recombinant *Baculovirus* DNA in *E.coli* using baculovirus shuttle vector" (1997) Volume

30 13, U. Reisch, ed. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.) e para a expressão em células mamíferas, por exemplo os vetores Rc/CMW e Rc/ASW e Vetores SW40, que são geralmente conhecidos e comercialmente disponibilizados,

ou o sistema EBNA descrito no Exemplo 4, o pCytTS com base em réplicon de Sindbis (Boorsma e outros (2002) *Biotechnol. Bioeng.* 79(6): 602-609), o sistema de expressão de vírus Sindbis (Schlesinger (1993) *Trends Biotechnol.* 11(1): 18-22) ou um sistema de expressão de Adenovírus (He e outros (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2509-2514). Os métodos biológicos moleculares para a produção destes vetores de expressão, bem como os métodos para transfectar células hospedeiras e cultivar tais células hospedeiras transfectadas bem como as condições para produzir e obter o polipeptídeos da invenção a partir das referidas células hospedeiras transformadas são bem-conhecidas pela pessoa versada.

Polipeptídeos com o resíduo de cisteína de terminal N desejado podem ser gerados a partir dos polipeptídeos expressos e purificados como descrito acima clonando-se o polipeptídeo de interesse atrás de uma sequência líder de terminal N que é removível para produzir os polipeptídeos com o resíduo de cisteína de terminal N desejado.

Isto pode ser obtido, por exemplo, por clivagem proteolítica do polipeptídeo expresso e purificado como descrito acima. Em um tal caso, um polipeptídeo de fusão foi clonado, expresso e purificado em que um resíduo de cisteína segue diretamente um sítio de clivagem de protease altamente seletivo, por exemplo, um resíduo de Cys imediatamente seguindo o sítio de clivagem de Fator Xa: Ile (Glu/Asp) Gly Arg | (Cys/His), ou um resíduo His ou Cys imediatamente seguindo o sítio de clivagem de Enterocinase: Asp Asp Asp Asp Lis | (Cis/His), em que | denota o local de clivagem pela protease.

Isto pode também ser alcançado, por exemplo, por clivagem do polipeptídeo durante a expressão, por exemplo, clivagem no estágio de translocação de ER pela peptidase de sinal. Em um tal caso, um polipeptídeo de fusão foi clonado e expresso onde um resíduo Cys segue diretamente o peptídeo de sinal que direciona o polipeptídeo recombinante à trilha segregadora (para revisão vide Rapoport e outros, *Annu Rev Biochem.* 1996;65:271-303).

Os métodos biológicos moleculares para manipular a sequência de codificação de um polipeptídeo recombinante de forma que uma seqüên-

46

cia de codificação para um polipeptídeo com o resíduo Cis desejado na posição desejada seja gerada são bem-conhecidos na técnica (Sambrook, acima).

5 As modalidades preferidas para (b)(2) são como descritos para (a)(2) acima, em particular grupos funcionais M_2 e Q são preferivelmente como descrito acima para grupos funcionais M_1 e Q, contanto que a substância ativa contenha um grupo funcional que é reativo com o grupo M_1 como descrito acima.

10 Em uma modalidade particularmente preferida, a substância ativa é selecionada a partir de uma proteína e peptídeo e é obtida de acordo com (b)(1) acima, preferivelmente como descrito acima.

15 Em uma modalidade preferida particular de acordo com (A), amido de hidroxialquila compreendendo um grupo aldeído é obtido por (a)(2)(ii), preferivelmente reagindo-se o amido de hidroxialquila preferivelmente oxidado com um composto tendo um grupo amino M_1 e um grupo amino Q, em particular um composto de diaminoalquila, especialmente 1,4-diaminobutano, e em seguida reagindo-se o amido de hidroxialquila funcionalizado por amino com um composto bifuncional compreendendo um grupo aldeído, em particular ácido 4-formil benzóico, e em seguida reagindo-se o

20 grupo aldeído do amido de hidroxialquila com um grupo alfa-SH-beta-amino opcionalmente protegido de uma substância ativa obtida por (b)(2)(i), preferivelmente introduzindo-se uma cisteína opcionalmente protegida na substância ativa, em particular uma proteína ou um peptídeo.

25 Em uma modalidade preferida particular de acordo com (B), a substância ativa compreendendo um grupo aldeído é obtida por (b)(1), em particular introduzindo-se um grupo aldeído por modificação química, preferivelmente oxidando-se uma proteína ou peptídeo, e em seguida reagindo-se o grupo aldeído da substância ativa com amido de hidroxialquila compreendendo um grupo alfa-SH-beta-amino obtido por (a)(2)(ii), preferivelmente

30 reagindo-se o amido de hidroxialquila preferivelmente oxidado com um composto tendo um grupo amino M_1 e um grupo amino Q, em particular um composto de diaminoalquila, especialmente 1,4-diaminobutano, e em segui-

da reagindo-se o amido de hidroxialquila funcionalizado com um composto bifuncional que compreende um grupo alfa-SH-beta-amino, em particular cisteína.

5 A reação da invenção de acordo com (A) e (B) da substância ativa com o amido de hidroxialquila pode ser realizada em qualquer solvente adequado ou mistura de pelo menos dois solventes e em um pH adequado e em uma temperatura de reação adequada.

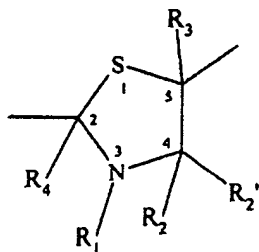
10 Em uma modalidade preferida, a reação (A) ou (B) é realizada em uma temperatura de 0 a 40°C, preferivelmente 0 a 25°C, em particular 20 a 25°C, na presença de um solvente, e em um pH de 3,5 a 10, preferivelmente 4 a 8, em particular 4,8 a 8,0 com um tempo de reação de preferivelmente 0,1 a 24 h, em particular cerca de 21 h.

15 O solvente é selecionado preferivelmente a partir do grupo que consiste em água, tampão aquoso, DMF (dimetilformamida), DMSO (dimetil-sulfóxido), DMA (dimetilacetamida) e misturas destes.

A relação molecular de amido de hidroxialquila para substância ativa é cerca de 1:1 a 200:1, preferivelmente 10:1 a 100:1, em particular 40:1 a 70:1.

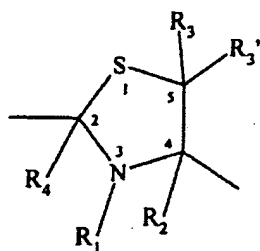
20 Além disso, a invenção refere-se a um conjugado de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, como obtível por um método como descrito acima.

25 Em outra modalidade, a invenção refere-se ao conjugado de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, em que a substância ativa e o amido de hidroxialquila são covalentemente ligados por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I)



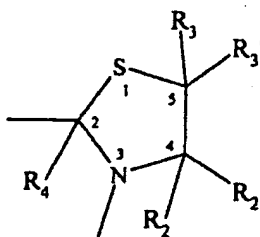
(I)

ou fórmula (I')



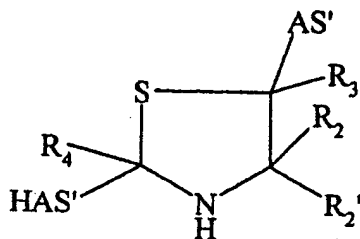
(I')

ou fórmula (I'')

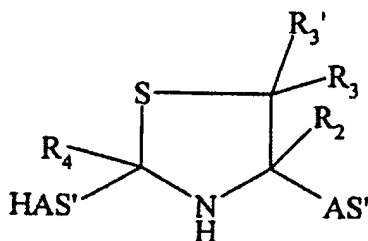


(I'')

- em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo heteroalquila, aralquila, heteroarila, arila e alquila opcionalmente adequadamente substituído, linear, cíclico e/ou ramificado, preferivelmente hidrogênio, o referido conjugado tendo uma estrutura de acordo com fórmula (IV), (IV'), ou (IV'')

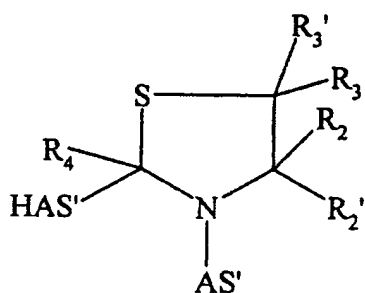


(IV)



(IV')

ou

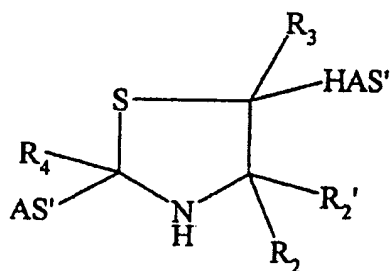


(IV'')

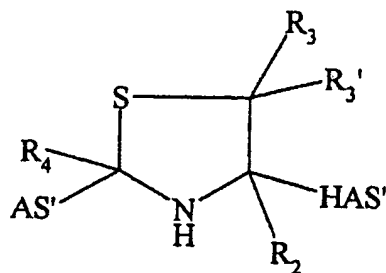
em que HAS' é o resíduo do amido de hidroxialquila ou um derivado deste

que foi ligado a um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal, e em que AS' é o resíduo da substância ativa ou um derivado deste que foi ligado ao grupo alfa-SH-beta-amino,

ou uma estrutura de acordo com a fórmula (V), (V'), ou (V'')

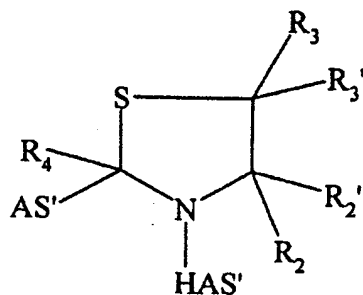


(V)



(V')

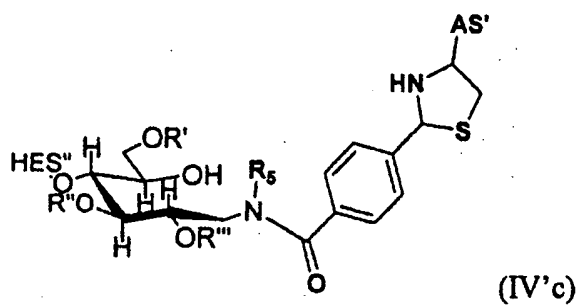
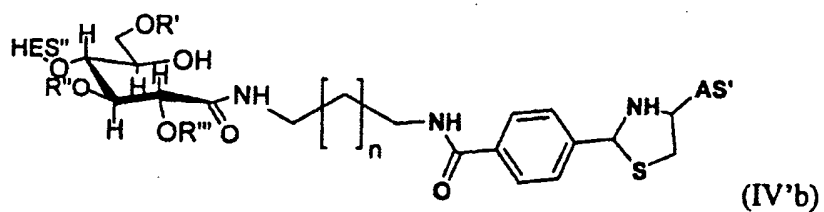
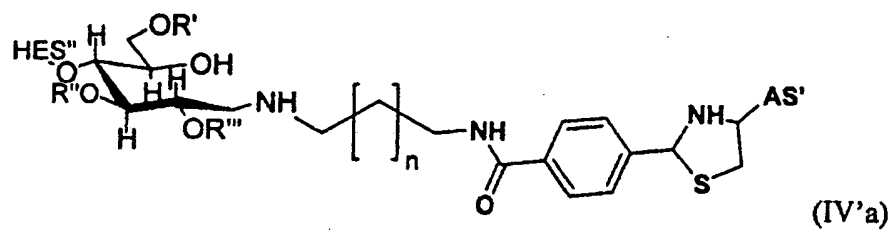
ou



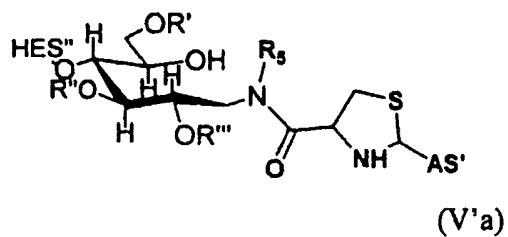
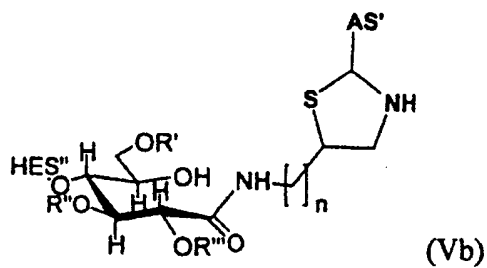
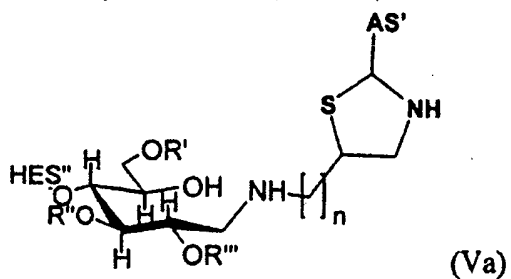
(V'')

- 5 em que HAS' é o resíduo do amido de hidroxialquila ou um derivado deste que foi ligado ao grupo alfa-SH-beta-amino, e em que AS' é o resíduo da substância ativa ou um derivado desta que foi ligado ao grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal.

10 Em uma modalidade preferida, o conjugado é selecionado a partir do grupo que consiste em

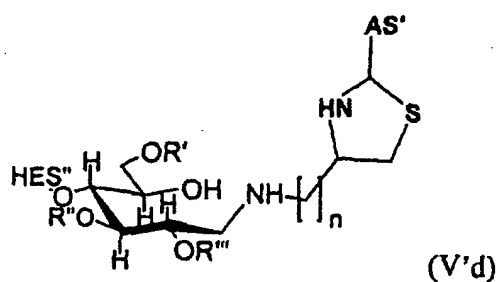
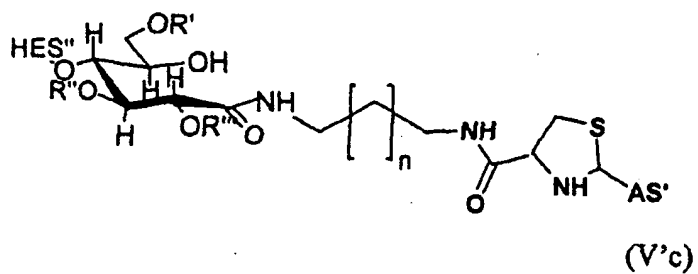
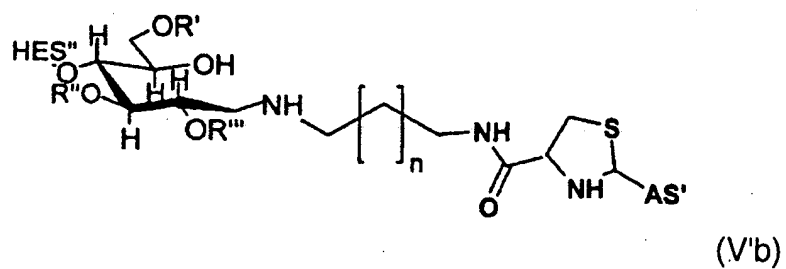


em que R_5 é como definido para R_1 a R_4 acima,

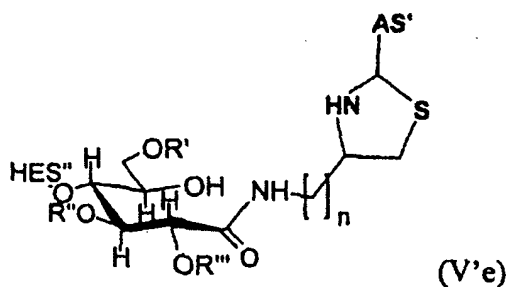


em que R_5 é como definido para R_1 a R_4 acima,

58



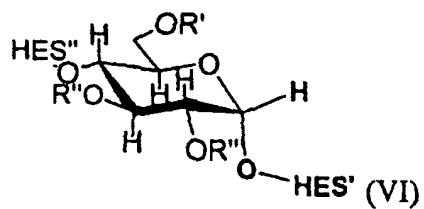
e



em que na fórmula IV', IV'b, V'b ou V'c n é um número inteiro, preferivelmente n é 0 a 20 e em que na fórmula Va, Vb, V'd ou V'e n é um número inteiro, preferivelmente, n é 1 a 20. Em uma modalidade preferida da fórmula IV'b e de V'c, n é 2 a 4, em particular 2.

5

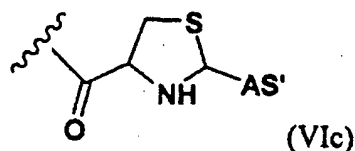
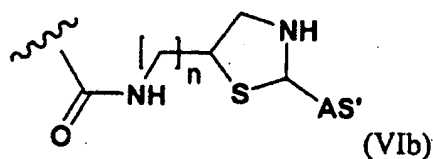
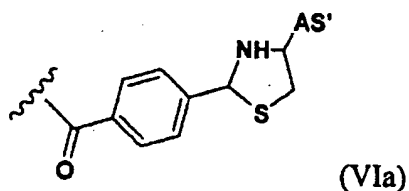
Em uma modalidade preferida, o conjugado é



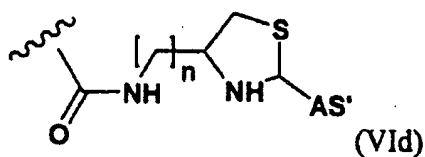
em que R' , R'' e/ou R''' são como definidos para fórmula II e em que, em pe-

59

lo menos uma unidade de glicose de HES, pelo menos um dentre R', R'' e/ou R''' é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em

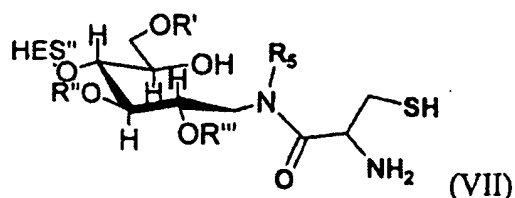


e

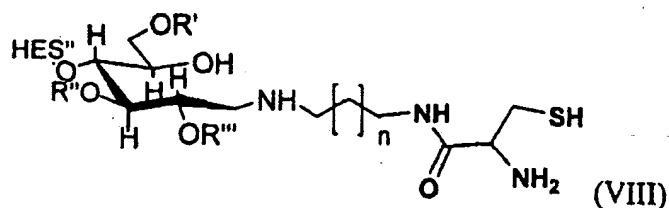


5 e em que n é um número inteiro, preferivelmente 1 a 20 e/ou em que pelo menos um dentre R', R'' e/ou R''' é $-(CH_2CH_2O)_m-R^{n^o}$, em que m é um número inteiro, preferivelmente 1 a 3 e R^{n^o} é selecionado a partir do grupo que consiste na fórmula (VIa), (VIb), (VIc) e (VIc).

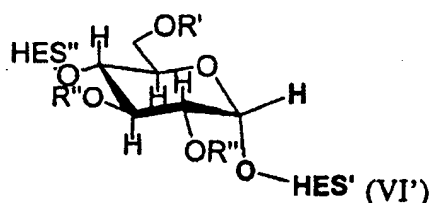
10 Em uma outra modalidade, a invenção refere-se a um derivado de amido de hidroxialquila funcionalizado por alfa-SH-beta amino selecionado a partir do grupo consistindo em



em que R_5 é definido para R_1 a R_4 acima,

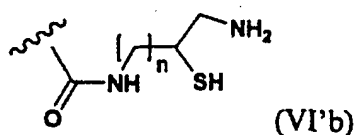
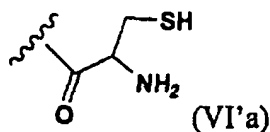


em que n é um número inteiro, preferivelmente 0 a 20,
ou o grupo consistindo em

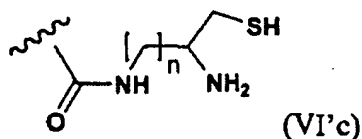


em que R' , R'' e/ou R''' são como definidos para fórmula II e em que em pelo menos uma unidade de glicose de HES, pelo menos um dentre R' , R'' e/ou

5 R''' é independentemente selecionado a partir do grupo consistindo em



e



e em que n é um número inteiro, preferivelmente 1 a 20 e/ou em que pelo menos um dentre R' , R'' e /ou R''' é $-(CH_2CH_2O)_m-R^{n^{na}}$, em que m é um número inteiro, preferivelmente 1 a 3, e $R^{n^{na}}$ é selecionado a partir do grupo consistindo nas fórmulas (VI'a), (VI'b) e (VI'c).

10 As abreviações HES'' e HES' especificamente empregadas no contexto das fórmulas (VI) e (VI') referem-se aos resíduos da molécula de HES que, junto com a porção de carboidrato ligando HES'' e HES' como mostrado em (VI) e (VI'), constituem a molécula de HES que por sua vez é parte dos conjugados como definido em (VI) e (VI').

Em uma outra modalidade, a invenção refere-se a um conjugado como descrito acima para uso em um método para o tratamento do corpo humano ou animal ou como um agente terapêutico.

Os conjugados de acordo com a invenção podem ser pelo menos 50% puros, ainda mais preferido pelo menos 70% puros, ainda mais preferidos pelo menos 90%, em particular pelo menos 95% ou pelo menos 99% puros. Em uma modalidade mais preferida, os conjugados podem ser 100% puros, isto é, não há outros subprodutos presentes.

Portanto, de acordo com outro aspecto, a presente invenção da mesma forma refere-se a uma composição que pode compreender o(s) conjugado(s) da invenção, em que a quantidade do(s) conjugado(s) pode ser pelo menos 50% em peso, ainda mais preferido pelo menos 70% em peso, ainda mais preferido pelo menos 90% em peso, em particular pelo menos 95% em peso ou pelo menos 99% em peso. Em uma modalidade mais preferida, a composição pode consistir no(s) conjugado(s), isto é a quantidade do(s) conjugado(s) é 100% em peso.

Desta maneira, a presente invenção da mesma forma refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um conjugado como descrito acima ou um conjugado, obténível por um método como descrito acima.

Além disso, a presente invenção da mesma forma refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um conjugado como descrito acima ou um conjugado, obténível por um método como descrito acima, a referida composição farmacêutica também compreendendo pelo menos um diluente, adjuvante, ou veículo farmaceuticamente aceitável.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1 mostra uma análise dos conjugados de proteína-HES brutos por eletroforese em gel de SDS obtida pela formação de tiazolidina de H-Cis(H)-HES10/0,4 e EPO oxidada.

Faixa X: marcador de peso molecular Roti[®]-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) do topo à base: 200 kDa, 119 kDa, 66 kDa, 43 kDa, 29 kDa, 20 kDa, 14,3 kDa

Faixa A: conjugação de H-Cis(H)-HES 10/0,4 para EPO oxidada

55/

Figura 2 mostra uma análise dos conjugados de proteína-HES brutos por eletroforese em gel de formação de tiazolidina de um H-Cis-peptídeo-NH₂ e AldeídoHES.

5 Faixa X: marcador de peso molecular Roti[®]-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) do topo à base: 200 kDa, 119 kDa, 66 kDa, 43 kDa, 29 kDa, 20 kDa, 14,3 kDa

Faixa A: conjugação de AldeídoHES10/0,7 em pH 4,6

Faixa B: conjugação de AldeídoHES50/0,7 em pH 4,6

Faixa C: controle de reação: peptídeo em pH 4,6

10 Faixa D: conjugação de AldeídoHES10/0,7 em pH 8,0

Faixa E: conjugação de AldeídoHES50/0,7 em pH 8,0

Faixa F: controle de reação: peptídeo em pH 8,0

Figura 3 mostra uma análise dos conjugados de DNA-HES brutos por eletroforese em gel de agarose obtida pela formação de tiazolidina de H-Cis(H)-HES50/0,7 e DNA modificado por aldeído como descrito nas seções experimentais 8,4 - 8,5 aqui abaixo.

Faixa X: marcador pUC19/Msp I (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D). Marcador de peso molecular do topo à base: 501/489 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp, 111/110 bp, 67 bp.

20 Faixa A, fileira de topo: conjugação de H-Cis(H)-HES50/0,7 para DNA modificado por FBA em pH 4,6 como descrito na seção experimental 8,5;

Faixa B, fileira de topo: controle de reação; conjugação de Oxo-HES50/0,7 para DNA modificado por FBA em pH 4,6 como descrito na seção experimental 8,5;

25 Faixa C, fileira de topo: conjugação de H-Cis(H)-HES50/0,7 para DNA modificado por FBA em pH 8,0 como descrito na seção experimental 8,5;

Faixa D, fileira de topo: controle de reação; conjugação de Oxo-HES50/0,7 para DNA modificado por FBA em pH 8,0 como descrito na seção experimental 8,5;

30 Faixa E, fileira de topo: controle de reação; DNA modificado por FBA em água sem derivado de HES;

Faixa A, fileira de topo: conjugação de H-Cis-(H)-HES50/0,7 para DNA modi-

ficado por Formilindol em pH 4,6 como descrito na seção experimental 8,5;
 Faixa B, fileira de topo: controle de reação; conjugação de Oxo-HES50/0,7 para DNA modificado por Formilindol em pH 4,6 como descrito na seção experimental 8,5;

- 5 Faixa C, fileira de topo: conjugação de H-Cis-(H)-HES50/0,7 para DNA modificado por Formilindol em pH 8,0 como descrito na seção experimental 8,5;
 Faixa D, fileira de topo: controle de reação; conjugação de Oxo-HES50/0,7 para DNA modificado por Formilindol em pH 8,0 como descrito na seção experimental 8,5;

- 10 Faixa E, fileira de topo: controle de reação; DNA modificado por Formilindol em água sem derivado de HES.

Figuras 4 a 6 mostram a análise do conjugado de Daunorrubicina-HES por cromatografia de fase reversa HPLC, detecção de UV em 290 nm, obtida por formação de tiazolidina de H-Cis(H)-HES50/0,7 e Daunorrubicina como descrito na seção experimental 9 aqui abaixo.

Figura 4: análise por HPLC do conjugado bruto;

Figura 5: análise por HPLC de Daunorrubicina;

Figura 6: análise por HPLC de H-Cis(H)-HES50/0,7;

- 15 **Figuras 7 a 9** mostram a análise do conjugado de Tilosina-HES bruto por cromatografia de fase reversa HPLC, detecção de UV em 220 nm, obtida por formação de tiazolidina de H-Cis(H)-HES50/0,7 e Tilosina como descrito na seção experimental 9. aqui abaixo.

Figura 7: análise por HPLC do conjugado bruto;

Figura 8: análise por HPLC de Tilosina;

- 25 Figura 9: análise por HPLC de H-Cis(H)-HES50/0,7

Figura 10 mostra análise dos conjugados de peptídeo-HES bruto por eletroforese em gel de SDS como descrito na seção experimental 10 aqui abaixo.

- Faixa X: marcador de peso molecular Roti[®]-Mark STANDARD (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) do topo à base: 200 kDa, 119 kDa, 66 kDa, 43 kDa, 29 kDa, 20 kDa, 14,3 kDa.

Faixa A: conjugação de HES10/0,7 para peptídeo a 21°C, em DMF.

Faixa B: conjugação de HES10/0,7 para peptídeo a 37°C, em DMF.

Faixa C: controle de reação: peptídeo a 50°C, em DMF.

Faixa D: conjugação de HES10/0,7 para peptídeo a 50°C, pH 4,6.

Faixa E: conjugação de HES10/0,7 para peptídeo a 50°C, em DMF.

- 5 Faixa F: conjugação de HES10/0,7 para peptídeo a 50°C, pH 4,6, 1% de Triton.

Faixa G: conjugação de HES10/0,7 para peptídeo a 50°C, em DMF, 1% de Triton.

- 10 A invenção será explicada em mais detalhes por meio dos seguintes exemplos.

Exemplos

1. Síntese de H-Cis(StBu)-HES10/0,4

1.1 Síntese de AminoHES10/0,4 a partir de HES oxidado

- Oxo-HES10/0,4 (4 g, PM = 10,9 kDa, DS = 0,4, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D) foi aquecido durante a noite a 80°C em vácuo, dissolvido sob argônio em dimetil sulfóxido seco (25 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) e 1,4-diaminobutano (4,0 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foi adicionado. Depois de agitar a 45°C durante 24 horas, a mistura de reação foi adicionada em 2-propanol (125 mL, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) e incubada durante uma hora a -20°C. O produto precipitado bruto foi coletado por centrifugação a 4°C, lavado com 2-propanol (100 mL) e coletado por centrifugação. O produto bruto foi dissolvido em água (20 mL, Milli-Q), dialisado durante 43 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 3,5 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O rendimento do produto isolado foi 65%.

1.2 Síntese de Fmoc-Cis(StBu)-HES10/0,4 de AminoHES

- Fmoc-Cis(S-tBu)-OH (150 mg, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) e 1-hidróxi-1H-benzotriazol (61,4 mg, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foram dissolvidos em N,N-dimetilformamida (3,5 mL de Peptide synthesis grade, Biosolve, Valkenswaard NL) e N,N'-diisopropilcarbodiimida (54,3 µL, Fluka, Sigma-Aldrich Che-

58

mie GmbH, Taufkirchen, D) foi adicionado. Depois da incubação a 21°C durante 30 minutos, AminoHES10/0,4 (0,35 g) como esboçado em 1,1 foi adicionado. Depois de agitar em temperatura ambiente durante a noite, a mistura de reação foi adicionada a uma mistura gelada de 1:1 (35 mL, v/v) de acetona (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) e etanol (DAB, Sonnenberg, Braunschweig, D) e incubada durante uma hora a -20°C. O produto precipitado foi coletado por centrifugação a 4°C, dissolvido em água (20 mL, Milli-Q) e diclorometano (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) foi adicionado (20 mL). A mistura foi misturada cuidadosamente e centrifugada. A camada aquosa superior foi dialisada durante 41 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 3,5 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizada. O rendimento do produto isolado foi 78%.

1.3 Síntese de H-Cis(StBu)-HES10/0,4 de Fmoc-Cis(StBu)-HES10/0,4

Fmoc-Cis(StBu)-HES10/0,4 (0,35 g) como obtido em 1,2 foi dissolvido em solução de piridina (4 mL, 20% em DMF, v/v, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Depois de agitar em temperatura ambiente durante 15 minutos, a mistura de reação foi adicionada em uma mistura gelada de 1:1 de acetona e etanol (35 mL, v/v) e incubada durante uma hora a -20°C. O produto precipitado foi coletado por centrifugação a 4°C e lavado com metil éter de terc-butila (25 mL, Acros Organics, Geel, B) e incubado durante uma hora a -20°C. O produto precipitado foi coletado por centrifugação a 4°C e secado em uma corrente de nitrogênio. O rendimento do produto isolado foi 68%.

2. Síntese de AldeídoHES10/0,7

2.1 Síntese de AminoHES10/0,7 de HES oxidado

Oxo-HES10/0,7 (6,02 g, PM = 14,7 kDa, DS = 0,76, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D) foi aquecido durante 16,5 horas a 80°C em vácuo, dissolvido sob argônio em dimetil sulfóxido seco (25 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) e 1,4-diaminobutano (5,1 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foi adicionado. Depois de agitar a 40°C durante 17 horas, a mistura de reação foi adicionada em uma mistura gelada de 1:1 de acetona e etanol

(150 mL, v/v). O produto precipitado foi coletado por centrifugação a 4°C, lavado com uma mistura gelada de 1:1 de acetona e etanol (40 mL, v/v) e coletado por centrifugação. O produto bruto foi dissolvido em água (80 mL), dialisado durante 42 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 3,5 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O rendimento do produto isolado foi 67%.

2.2 Síntese de AldeídoHES10/0,7 de AminoHES

Ácido 4-formilbenzóico (75 mg, Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, D) e 1-hidróxi-1H-benzotriazol (115 mg, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foram dissolvidos em N,N-dimetilformamida (DMF, 5 mL Peptide synthesis grade, Biosolve, Valkenswaard NL) e N,N'-diisopropilcarbodiimida (102 µL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foi adicionado. Depois da incubação em temperatura ambiente durante 30 minutos, AminoHES10/0,7 (0,5 g, PM = 14,7 kDa, DS = 0,76) foi adicionado. Depois de agitar em temperatura ambiente durante a noite, a mistura de reação foi adicionada em 2-propanol (30 mL, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) e incubada durante uma hora a -20°C. O produto precipitado foi coletado por centrifugação a 4°C, lavado com 2-propanol (30 mL) e coletado por centrifugação. O produto bruto foi dissolvido em água (10 mL, Milli-Q), dialisado durante 44 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 3,5 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O rendimento do produto isolado foi 86%.

3. Síntese de AldeídoHES50/0,7

3.1 Síntese de AminoHES50/0,7 de HES oxidado

Oxo-HES50/0,7 (6,09 g, PM = 56,7 kDa, DS = 0,76, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodhein, D) foi aquecido durante 16,5 horas a 80°C em vácuo, dissolvido sob argônio em dimetil sulfoxido seco (32 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) e 1,4-diaminobutano (1,2 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foi adicionado. Depois de agitar a 40°C durante 17 horas, a mistura de reação foi adicionada a uma mistura gelada de 1:1 de acetona e etanol (150 mL, v/v). O produto precipitado foi coletado por centrifugação a 4°C, lavado

com uma mistura gelada de 1:1 de acetonal e etanol (40 mL, v/v) e coletado por centrifugação. O produto bruto foi dissolvido em água (80 mL), dialisado durante 42 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 3,5 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O rendimento do produto isolado foi 82%.

3.2 Síntese de AldeídoHES50/0,7 de AminoHES

Ácido 4-formilbenzóico (124 mg, Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, D) e 1-hidróxi-1H-benzotriazol (174 mg, Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foram dissolvidos em N,N-dimetilformamida (DMF, 38 mL Peptide synthesis grade, Biosolve, Valkenswaard NL) e N,N'-diisopropilcarbodiimida (155 µL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foram adicionados. Depois da incubação em temperatura ambiente durante 30 minutos, AminoHES50/0,7 (3,80 g, PM = 56,7 kDa, DS = 0,76) foi adicionado. Depois da agitação em temperatura ambiente durante a noite, a mistura de reação foi adicionada em 2-propanol (160mL, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) e incubada durante uma hora a -20°C. O produto precipitado foi coletado por centrifugação a 4°C, dissolvido em DMF (20 mL), precipitado com 2-propanol como descrito acima e coletado por centrifugação. O produto bruto foi dissolvido em água, dialisado durante 24 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 3,5 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O produto foi dissolvido em água (20 mL), precipitado com uma mistura gelada de 1:1 de acetona e etanol (150 mL, v/v), incubado durante uma hora a -20°C e coletado por centrifugação. O produto bruto foi dissolvido em água (29 mL), dialisado durante 24 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 10 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O rendimento do produto isolado foi 77%.

4. Formação de tiazolidina a partir de H-Cis(H)-HES10/0,4 e EPO oxidada

4.1 Desproteção de H-Cis(StBu)-HES10/0,4

H-Cis(StBu)-HES10/0,4 (10 mg) como esboçado no esquema 1 foi obtido em tampão de acetato de sódio (1 mL, 0,1 M, pH 4,6, 10 mM de

64

EDTA) e cloridrato de tris-(2-carboxietil)-fosfina (2,8 mg, TCEP, Acros Organics, Geel, B) foi adicionado. A mistura de reação foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente e o excesso de TCEP foi removido por diafiltração:

- 5 A mistura de reação foi diluída com tampão (tampão de fosfato de sódio, 0,1 M, pH 8,0, 1 mM de EDTA) para 0,5 mL e centrifugação a 20°C durante 10 minutos em 13000 x g em um concentrador Vivaspin 500 (Viva Science, 5 kDa MWCO, Hannover, Germany). O procedimento de lavagem foi repetido três vezes por diluição da solução residual com tampão em 0,5
- 10 mL e centrifugação durante 35 minutos como descrito. As soluções de H-Cis(H)-HES10/0,4 foram diluídas com o mesmo tampão de reação em 150 µL tendo uma concentração final calculada de 66,6 µg/mL.

4.2. Conjugação para EPO oxidado

- Para preparar a EPO oxidada, a uma solução de 2,0 mg/mL de
- 15 EPO (EPO recombinantemente produzida tendo uma sequência de aminoácido de EPO humano e similar ou essencialmente as mesmas características como a Epoietina alfa comercialmente disponível: Erypo, ORTHO BIOTECH, Jansen-Cilag ou Epoietina beta: NeoRecormon, Roche; cf. EP 0 148 605, EP 0 205 564, EP 0 411 678) de 20 mL totais mantidas a 0°C foram adicionados
- 20 2,2 mL de uma solução gelada de 10 mM de meta-periodato de sódio que resulta em uma concentração final de 1 mM de meta-periodato de sódio. A mistura foi incubada a 0°C durante uma hora em um banho de gelo no escuro e a reação foi terminada por adição de 40 µL de glicerol e incubada durante mais 5 minutos. O tampão da mistura foi mudado para tampão de acetato de sódio pH 5,5.
- 25

- A EPO oxidada obtida (14,9 µL, 1,34 mg/mL, tampão de acetato de sódio pH 5,5), a solução de H-Cis(H)-HES 10/0,4 (5 µL) como obtido em 4,1 foi adicionada. Depois da incubação durante 21 horas em temperatura ambiente a mistura de reação foi analisada por eletroforese em gel de SDS.
- 30 Uma XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) e um fornecimento de força Consort E143 (CONSORTnv, Turnhout, B) foram empregados para eletroforese em gel de SDS. Um gel de 10% de Bis/Tris junto com

um tampão fluente de MOPS em condições de redução (ambos Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) foram empregados de acordo com a instrução dos fabricantes.

5. Formação de tiazolidina a partir de H-Cis(H)-peptídeo-NH₂ e AldeídoHES

Uma solução do peptídeo transportando um resíduo de cisteína livre em seu terminal N (2 μ L, 15 μ g, 3147 g/mol, 7,5 mg/mL em DMF, H-CLPSLEGNMQQPSEFHCMMNWSSHIAAC-NH₂, obtido por síntese de fase sólida de Fmoc padrão e purificado por HPLC) foi adicionada a 20 μ L de uma solução de AldeídoHES (vide Tabela 1) em tampão de reação (vide Tabela 1, degaseificado durante 15 minutos em um banho ultra-sônico) e a mistura foi incubada durante a noite em temperatura ambiente. Para análise por eletroforese em gel de SDS, uma XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) e um fornecimento de força Consort E 143 (CONSORTnv, Turnhout, B) foram empregados. Um gel de 12% de Bis/Tris junto com um tampão fluente de MES em condições de redução (ambos Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) foram empregados de acordo com a instrução dos fabricantes.

Tabela 1: Condições de reação

AldeídoHES	Concentração de AldeídoHES	Tampão de reação
AldeídoHES 10/0,7 como obtido em 2.	119 mg/mL	Acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,6, 10 mM EDTA
AldeídoHES 50/0,7 como obtido em 3.	595 mg/mL	Acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,6, 10 mM EDTA
AldeídoHES 10/0,7 como obtido em 2.	119 mg/mL	Fosfato de sódio, 0,1 M, pH 8,0, 1 mM EDTA
AldeídoHES 50/0,7 como obtido em 3.	595 mg/mL	Fosfato de sódio, 0,1 M, pH 8,0, 1 mM EDTA

20 6. Resultados

Os resultados das experiências podem ser vistos nas Figuras.

Duas estratégias diferentes foram conduzidas como pode ser

visto nos exemplos acima. Em um caso (vide 4), o grupo carbonila foi introduzido no glicano de EPO por oxidação de periodato e conjugado a um grupo alfa-SH-beta amino contendo HES. Este derivado de HES10/0,4 foi sintetizado em duas etapas a partir de HES, oxidado na extremidade de redução.

- 5 O HES oxidado foi convertido por um procedimento conhecido em um AminoHES (vide 1,1.) seguido por acilação com uma cisteína protegida (Fmoc-Cis(StBu)-OH) (vide 1,2.) e desproteção (vide 1,3.). A outra rotina (vide 5.) utilizou um AldeídoHES10/0,7 e um AldeídoHES50/0,7 (vide 2,2. e 3,2.), sintetizado por acilação do AminoHES conhecido (vide 2,1. e 3,1.) com ácido 4-
- 10 formilbenzóico e um peptídeo, transportando uma cisteína desprotegida em seu terminal N. Conclusão para conversão quase completa foi obtida pelas estratégias (vide Figura 1 e 2). A conjugação de AldeídoHES para Cis-peptídeo continuou igualmente corretamente em pH 4,6 e pH 8,0 (vide Figura 2, Faixas A e D ou Faixas B e E). A reação do peptídeo nestas condições
- 15 de reação com HES10/0,7 ou HES50/0,7 falhou. Sob condições de reação modificadas, o sucesso pôde ser esperado.

O método de acordo com esta invenção tem a vantagem para proteínas que mutantes com resíduos de cisteína de terminal N são obtíveis através de expressão, enquanto outras modificações de proteínas que

20 da mesma forma permitiriam uma conjugação de quimiosseletiva poderiam não estar disponíveis através desta rotina. Com isso, espera-se que uma reação seletiva com amido de hidroxialquila, em particular, amido de hidroxietila através do resíduo de terminal N da proteína seja permitida. Uma outra vantagem do método de acordo com a invenção é a quimiosseletividade da

25 reação do grupo aldeído, ceto ou hemiacetal com o grupo alfa-SH-beta amino. Portanto, nenhuma reação com os grupos funcionais das cadeias laterais de, por exemplo, uma proteína ou peptídeo é esperada.

7. Síntese de H-Cis(H)-HES50/0,7

7.1 Síntese de AminoHES50/0,7 a partir de HES oxidado

- 30 Oxo-HES50/0,7 (10,1 g, PM = 44,2 kDa, DS = 0,7, Parte 502, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D) foi aquecido durante 72 horas a 80°C em vácuo, dissolvido sob argônio em dimetil sulfó-

64

xido seco (52 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) e 1,4-diaminobutano (2,3 mL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foi adicionado. Depois de agitar a 45°C durante 19,5 horas, a mistura de reação foi adicionada em gotas a uma mistura de 1:1 (400 mL, v/v) de acetona (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) e etanol (DAB, Sonnenberg, Braunschweig, D). O produto precipitado foi coletado por centrifugação. O produto bruto foi dissolvido em água (100 mL, Milli-Q), dialisado (tubulação para diálise SnakeSkin, 10 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) durante 24 horas contra 20 mM de ácido acético e 3,5 horas contra água. O rendimento do produto isolado depois da liofilização foi 84%.

7.2 Síntese de Fmoc-Cis(StBu)-HES50/0,7 a partir de AminoHES50/0,7

Fmoc-Cis(S-tBu)-OH (293,1 mg, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) e 1-hidróxi-1H-benzotriazol (155,9 mg, Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, D) foram dissolvidos em N,N-dimetilformamida (30 mL Peptide synthesis grade, Biosolve, Valkenswaard, NL) e N,N'-diisopropilcarbodiimida (138 µL, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foram adicionados. Depois de incubação a 21°C durante 30 minutos, AminoHES50/0,7 (3,00 g), obtido como descrito em 7,1 foi adicionado. Depois de agitar em temperatura ambiente durante a noite, a mistura de reação foi adicionada a uma mistura de 1:1 (230 mL, v/v) de acetona (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) e etanol (DAB, Sonnenberg, Braunschweig, D). O produto precipitado foi coletado por centrifugação, dissolvido em DMF (30 mL) e precipitado novamente como descrito acima. Depois da centrifugação, o produto bruto foi dissolvido em água (30 mL, Milli-Q), dialisado durante 28 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 10 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O rendimento do produto isolado foi 98%.

7.3 Síntese de H-Cis(StBu)-HES50/0,7 a partir de Fmoc-Cis(StBu)-HES50/0,7

Fmoc-Cis(StBu)HES50/0,7 (2,62 g), obtido como descrito em 7,2 foi dissolvido em DMF (20 mL) e piperidina (5 mL, Fluka, Sigma-Aldrich

Chemie GmbH, Taufkirchen, D) foi adicionado. Depois de agitar em temperatura ambiente durante 15 minutos a mistura de reação foi adicionada a uma mistura de 1:1 de acetona e etanol (190 mL, v/v). O produto precipitado foi coletado por centrifugação, dissolvido em DMF (25 mL) e precipitado novamente como descrito acima. Depois da centrifugação, o produto bruto foi dissolvido em água (25 mL, Milli-Q) dialisado durante 45 horas com água Milli-Q (tubulação para diálise SnakeSkin, 10 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) e liofilizado. O rendimento do produto isolado foi 83%.

10 7.4 Síntese de H-Cis(H)-HES50/0,7 a partir de H-Cis(StBu)-HES50/0,7

H-Cis(S-tBu)HES50/0,7 (0,50 g), obtido como descrito em 7,3 foi dissolvido em 50 mM de solução de cloridrato de tris-(2-carboxietil)-fosfina (5 mL, TCEP, Acros Organics, Geel, B em 0,1 M de tampão de acetato de sódio pH 5,0). Depois de agitar em temperatura ambiente durante uma hora, a mistura de reação foi dialisada (tubulação para diálise SnakeSkin, 10 kDa MWCO, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) durante 22 horas com 5 mM de EDTA aquosa (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D em Milli-Q water) e uma hora com água (Milli-Q) e liofilizada. O rendimento do produto isolado foi 97%.

20 8. Conjugação para DNA

8.1 Hibridização de DNA modificado por Formilindol

DNA modificado por 5'-Formilindol (a modificação de Formilindol, isto é a modificação de 3-Formilindol, foi introduzida de acordo com A. Okamoto e outros, Tetrahedron Lett. 2002, 43, 4581-4583; 200 µL, atdbio, Southampton, UK, parte A0795, M = 9361 g/mol, c = 37,8 µM em água, sequência: XTACTCACCCCTGCGAATTCAACTGCTGCCTC) e o padrão complementar não modificado (199 µL, atdbio, Southampton, UK, parte A0794, M = 9376 g/mol, c = 38,2 µM em água, sequência: GAGGCAGCATTGAATTGCGAGGGTGAGTA) foram hibridizados em uma relação molar de 1:1 com base nas concentrações produzidas pelo fabricante. As soluções foram misturadas e incubadas a 95°C durante 5 minutos, resultando em uma concentração final de 0,356 mg/mL de DNA de filamento duplo. 157 µL (55,9 µg) foram

liofilizados durante noite e dissolvidos em água (27,9, Milli-Q) resultando em uma concentração final calculada de 2 mg/mL. As concentrações são calculadas e não são experimentalmente verificadas.

8.2 Hibridização de DNA modificado por 5'-amino-C6

5 DNA modificado por 5'-amino-C6 (59,1 nmols, biomers.net GmbH, Ulm, D, lot 00033426_1 DNA, M = 9218 g/mol, 59,1 nmols, sequência: TACTCACCTGCGAATTCAACTGCTGCCTC) foi dissolvido em água (100 µL; Milli-Q). Ele (38,78 µL, 595 µM) foi hibridizado em uma relação molar de 1: 1 com base nas concentrações dadas pelo fabricante ao filamento
10 complementar não modificado (600 µL, atdbio, Southampton, UK, parte A0794, M = 9376 g/mol, c = 38,2 µM em água, sequência: GAGGCAG-CATTGAATTCGCAGGGTGAGTA). As soluções foram misturadas e incubadas a 95°C durante 5 minutos, resultando em uma concentração calculada final de 0,667 mg/mL de DNA de filamento duplo. As concentrações foram
15 calculadas e não foram experimentalmente verificadas.

8.3 Formação de um DNA modificado por FBA a partir de DNA modificado por 5'-amino-C6

4-Formilbenzoato de succinimidila (50 µL, 4 mg/mL em DMF, Novabiochem, Merck KGaA, Darmstadt, D) foi adicionado ao DNA modificado por 5'-amino-C6 de filamento duplo, obtido como descrito em 8,2 (500 µL, 0,667 mg/mL em água) e a solução clara foi incubada durante 5 horas a 21°C. A mistura de reação foi centrifugada a 21°C durante 15 minutos em 13000 x g em um concentrador Vivaspin 500 (Viva Science, 5 kDa de MW-CO, Hannover, Germany). O procedimento de lavagem foi repetido três vezes por diluição da solução residual com água (Milli-Q) em 0,5 mL e centrifugação durante 12 minutos como descrito. A solução de DNA foi diluída com água em 167 µL, resultando em uma concentração final calculada de 2 mg/mL. As concentrações foram calculadas e não experimentalmente verificadas.

8.4 Formação de tiazolidina a partir de H-Cis(H)-HES50/0,7 e DNA modificado por Formilindol

Uma solução de derivado de HES50/0,7 (4 µL, 147,5 mg/mL,

vide Tabela 1) em tampão de reação (vide Tabela 2 em seguida) foi adicionada a uma solução aquosa de DNA modificado por Formilindol (1,4 μ L, 2 mg/mL), obtida como descrito em 8.1. Depois da incubação durante 14 horas a 21°C, a mistura de reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose. Um sistema Agagel Standard e um fornecimento de força Minicell Power Pack P20 (ambos Biometra GmbH, Göttingen, D) foram empregados. 2% de agarose NEEO Ultra-Qualität (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) junto com tampão fluente de TBE de 0,5 x foram empregados durante uma hora a 55 V. Um sistema de documentação em gel Gel Doc 2000 junto com o software Quality One V4.0.3 (ambos BIO-RAD laboratories, München, D) foram empregados. Os resultados das experiências podem ser vistos na Figura 2.

Tabela 2: Condições de reação

HES50/0,7-derivado	Tampão de reação
H-Cys(H)-HES50/0,7, como obtido em 7,4.	Acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,6, 10 mM EDTA
Oxo-HES50/0,7, (Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)	Acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,6, 10 mM EDTA
H-Cys(H)-HES50/0,7, como obtido em 7,4.	Fosfato de sódio, 0,1 M, pH 8,0, 5 mM EDTA
Oxo-HES50/0,7, (Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)	Fosfato de sódio, 0,1 M, pH 8,0, 5 mM EDTA

8.5 Formação de Tiazolidina a partir de H-Cis(H)-HES50/0,7 e DNA modificado por FBA

Uma solução de derivado de HES50/0,7 (4 μ L, 147,5 mg/mL, vide Tabela 3 em seguida) em um tampão de reação (vide Tabela 3 em seguida) foi adicionada a uma solução aquosa de DNA modificado por FBA (1,5 μ L, 2 mg/mL), obtido como descrito em 8.3. Depois da incubação durante 14 horas a 21°C, a mistura de reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose como descrito em 8.4. Os resultados das experiências podem ser vistos na Figura 3.

Tabela 3: Condições de reação

HES50/0,7-derivado	Tampão de reação
H-Cys(H)-HES50/0,7, como obtido em 7,4.	Acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,6, 10 mM EDTA
Oxo-HES50/0,7, (Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)	Acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,6, 10 mM EDTA
H-Cys(H)-HES50/0,7, como obtido em 7,4.	Fosfato de sódio, 0,1 M, pH 8,0, 5 mM EDTA
Oxo-HES50/0,7, (Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D)	Fosfato de sódio, 0,1 M, pH 8,0, 5 mM EDTA

9. Conjugação em moléculas orgânicas pequenas (aqui: antibióticos (Daunorrubicina) e citostáticos (Tylosin)) Conjugação em moléculas orgânicas pequenas por formação de tiazolidina

- 5 H-Cis(H)-HES50/0,7 (11,0 mg), obtido como descrito em 7.4, foi dissolvido em uma solução de molécula orgânica pequena (44 µL, tendo concentração [A] mg/mL, 13,4 equiv., vide Tabela 4 em seguida) em DMF (vide Tabela 4 em seguida), incubado a 21°C durante a noite e 40 µL da mistura de reação foram analisados por HPLC. Os resultados das experiências
- 10 podem ser vistos nas Figuras 4 a 9.

- Daunorrubicina (Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) e tartarato de Tilosina (ambos BioChemika grade, Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) foram empregados como moléculas orgânicas pequenas. Para análise por HPLC, uma coluna C18 ReproSil-PUR Basic 150 x 4,6 mm i. d. (Order Nº
- 15 R15.B9.S1546, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, D) e um sistema de cromatografia de Äkta Basic (Bomba P900 Ser. Nº 01118816, detector de UV UV900 Ser. Nº 01120613, pH/detector de condutividade pH/C900 Ser. Nº 01120665, coletor de fração Frac900 Ser. Nº 01120011 e *software* Unicorn 5.0 Ser. Nº 01119821, todos Amersham Biosciences, Freiburg, D) foram
- 20 empregados.

O seguinte método foi aplicado para todas as análises:

69

- Tampão A: água com 0,1 de TFA (Rotisolv LC-MS Garde, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D)

- Tampão B: uma mistura de 15% de água com 0,1 de TFA e 85% de acetonitrila com 0,1% de TFA (ambos Rotisolv LC-MS grade, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D).

- Gradiente: 0% de tampão B em 2 volumes de coluna (CV); gradiente linear 0 - 50% de tampão B em 15 CV, gradiente linear 50 - 100% de tampão B em 7 CV, 100% de tampão B para 7 CV, 0% de tampão B para 5 CV.

- Detecção de UV em 220 e 290 nm.

- Taxa de fluxo: 2 mL/min.

Tabela 4: Condições de reação

Molécula Orgânica Pequena	Concentração [A] / (mg/mL)
Daunorrubicina	43,0
Tilosina	80,7

10. Formação de Tiazolidina a partir de H-Cis-peptídeo e HES nativo

Uma solução de um peptídeo transportando um resíduo de cisteína livre como seu terminal N (1 μ L, 20 μ g, 2528 g/mol, 20 mg/mL em DMF, Sequenze H-Cis-Asn-Thr-Arg-Lis-Arg-Ile-Arg-Ile-Gln - Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lis-OH, SC623, NeoMPS S.A., Strasbourg, F) foi adicionada em 9 μ L de uma solução de HES 10/0,7 (408 mg/mL em [Tampão de Reação] (vide Tabela 5 abaixo), PM = 9,2 kDa, DS = 0,7, Parte 437, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D), solução de Triton-X100 (1 μ L, 10% em água) foi adicionada às reações selecionadas (vide Tabela 5 abaixo) e as misturas foram incubadas durante a noite a [B]°C (vide Tabela 5 abaixo). Para análise por Eletroforese em gel de SDS, uma XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) e um fornecimento de força Consort E 143 (CONSORTnv, Turnhout, B) foram empregados. Um gel de 12% de Bis/Tris junto com um tampão fluente de MOPS em condições de redução (ambos Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) foi empregado de acordo com a instrução dos fabricantes. Os resultados da experiência podem ser vistos na Figura 10.

70/

Tabela 5: Condições de reação

Faixa	[Tampão de reação]	[B]/°C	Triton-X100
A	DMF	21	-
B	DMF	37	-
C	DMF	50	-
D	0,1 M NaOAc pH 4,6, 10 mM EDTA	50	-
E	DMF	50	-
F	0,1 M NaOAc pH 4,6, 10 mM EDTA	50	1 μ L
G	DMF	50	1 μ L

* sem HES

11. Resultados das experiências de acordo com os itens 8 a 10 acima11.1 Conjugação para DNA por formação de tiazolidina (item 8 acima)

- 5 Conjugação para DNA por formação de tiazolidina foi obtida com dois DNAs modificados por aldeído diferentes (vide item 8. aqui acima). Os DNA-aldeídos necessários estavam comercialmente disponíveis no caso de DNA modificado por Formilindol (vide artigo 8.1 aqui acima) ou foram preparados a partir de DNA de 5'-amino comercialmente disponível e 4-
- 10 formilbenzoato de succinimidila (vide item 8.3 aqui acima). O grupo alfa-SH-beta amino contendo HES (H-Cis(H)-HES50/0,7) foi preparado a partir de H-Cis(StBu)-HES50/0,7 por redução com TCEP e purificado por precipitação e diálise (vide item 7.4 aqui acima). H-Cis(StBu)-HES50/0,7 foi preparado em analogia a H-Cis(StBu)-HES10/0,4 (vide item 4.1 aqui acima). Os resultados
- 15 da conjugação para os DNAs modificados por aldeído são mostrados na Figura 3. Conjugação bem-sucedida foi indicada pelo aparecimento de uma nova faixa em peso molecular mais alto. Sua largura de faixa aumentada foi devido à distribuição de peso molecular da parte de HES do conjugado. Conjugação foi obtida em pH 4,6 (Faixa A) ou pH 8,0 (Faixa C). Nenhuma conjugação foi observada com OxoHES50/0,7, o material de partida para H-Cis(H)-HES50/0,7 (Faixa B e D).
- 20

11.2 Conjugação para moléculas orgânicas pequenas (item 9 acima)

Conjugação para compostos orgânicos pequenos por formação de tiazolidina foi obtida para um fármaco citostático (Daunorrubicina, vide

FY

Figura 4 aqui abaixo) e um antibiótico (Tylosin, vide Figura 7 aqui abaixo). O grupo alfa-SH-beta amino que contém material de partida de HES (a mesma concentração como na reação de conjugação) apareceu como uma faixa ampla com um tempo de retenção por volta de 10 minutos (vide Figuras 6, 9 aqui abaixo). Sua largura de pico aumentada foi devido à distribuição de peso molecular do HES. As análises de HPLC dos compostos orgânicos pequenos (a mesma concentração como na reação de conjugação) são mostradas nas Figuras 5 e 8. Conjugação bem-sucedida é indicada pelo aparecimento de um novo pico amplo em tempos de retenção entre aqueles do material de partida de HES e aqueles do composto orgânico pequeno (Figuras 4, e 7). Novamente, a forma de pico amplo refletiu a distribuição de peso molecular da parte de HES do conjugado.

11.3 Conjugação empregando-se HES nativo (item 10 acima)

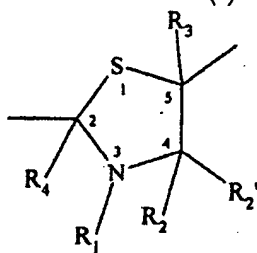
Conjugação para HES nativo por formação de tiazolidina foi obtida para um peptídeo transportando um resíduo de cisteína livre em seu terminal N (vide item 10. aqui acima) em DMF como o solvente em uma faixa de temperatura entre 21°C - 50°C (Figura 10 Faixas A, B e E) ou em tampão aquoso em pH 4,6 a 50°C (Figura 10, Faixa D). Conjugação foi da mesma forma observada nos presentes do detergente Triton X-100 a 50°C (Figura 10, Faixas F e G). Conjugação bem-sucedida foi indicada pelo aparecimento de uma nova faixa em peso molecular mais alto. Sua largura de faixa aumentada foi devido à distribuição de peso molecular da parte de HES do conjugado.

Desse modo, pode ser mostrado que a conjugação de HES nativo com um Cis-peptídeo é geralmente possível, mesmo sob várias condições diferentes, como mostrado sob item 6. aqui acima.

fly

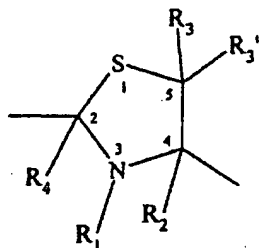
REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um conjugado de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, em que a substância ativa e o amido de hidroxialquila são covalentemente ligados por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I)
- 5



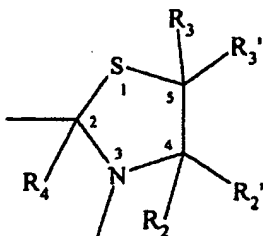
(I)

ou fórmula (I')



(I')

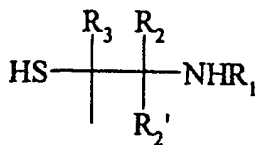
ou fórmula (I'')



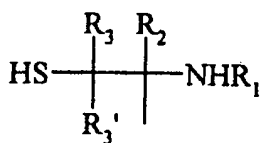
(I'')

- em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são seleccionados independentemente a partir do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo heteroaralquila, aralquila, heteroarila, arila e alquila opcionalmente apropriadamente substituído, linear, cíclico e/ou ramificado, preferivelmente hidrogênio,
- 10 o referido método compreendendo

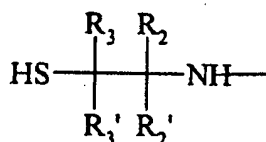
- (A) reagir um grupo aldeído, um grupo ceto ou um grupo hemiacetal de um amido de hidroxialquila ou um derivado do mesmo compreendendo o referido grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal com um
- 15 grupo alfa-SH-beta amino



- de uma substância ativa ou um derivado da mesma compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I); ou com um grupo alfa-SH-beta amino

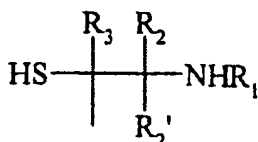


- de uma substância ativa ou um derivado da mesma compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula (I'), ou com um grupo alfa-SH-beta amino



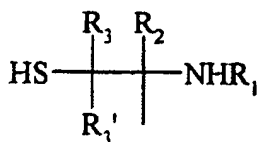
- de uma substância ativa ou um derivado da mesma compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula (I''), em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são como definidos acima; ou

- (B) reagir um grupo aldeído, um grupo ceto ou um grupo hemiacetal de uma substância ativa ou um derivado da mesma compreendendo o referido grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal com um grupo alfa-SH-beta amino

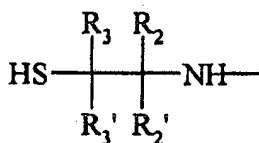


74
8

- de um derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula
- 5 (I); ou com um grupo alfa-SH-beta amino

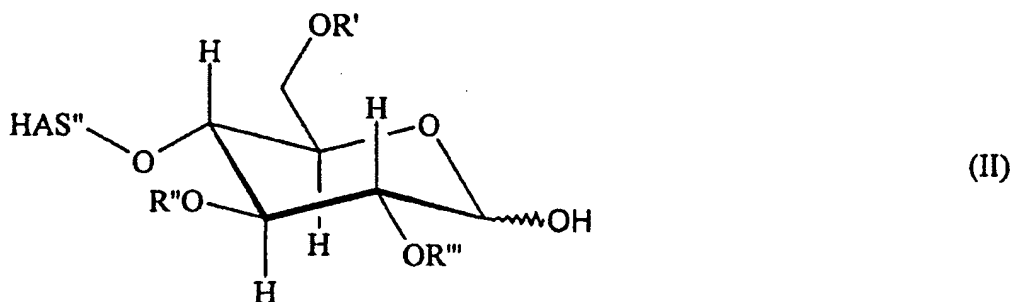


- de um derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula
- 10 (I'); ou com um grupo alfa-SH-beta amino



- de um derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta amino, desse modo preparando um conjugado da referida substância ativa e do referido amido de hidroxialquila sendo covalentemente ligado por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com fórmula
- 15 (I''), em que R₁, R₂, R_{2'}, R₃, R_{3'} e R₄ são como definidos acima.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o amido de hidroxialquila tem a seguinte estrutura (II)



em que R', R'' e R''' são independentemente hidrogênio, um grupo hidroxialquila linear ou ramificado ou o grupo



em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são selecionados independentemente a partir do grupo, que consiste em hidrogênio, e grupo alquila, preferivelmente hidrogênio e grupo metila,

m é 2 a 4, em que os resíduos R^1 e R^2 podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos $m \text{ CR}^1\text{R}^2$;

n é 0 a 20, preferivelmente 0 a 4;

o é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de $n = 0$, o não é 0, e em que os resíduos R^3 e R^4 podem ser os mesmos ou diferentes no grupo $o \text{ CR}^3\text{R}^4$.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que R' , R'' e R''' são independentemente hidrogênio ou um grupo 2-hidroxietila.

4. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 1 a 3, em que o amido de hidroxialquila é amido de hidroxietila.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, em que o amido de hidroxietila tem um peso molecular de 1 a 300 kD, mais preferivelmente de 2 a 200 kD, mais preferivelmente de 10 a 150 kD ou 4 a 130 kD, mais preferivelmente a partir de 10 a 100 kD.

6. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 4 ou 5, em que o amido de hidroxietila tem uma substituição molar de 0,1 a 3, preferivelmente 0,1 a 2, mais preferido 0,1 a 0,9 ou 0,4 a 2, preferivelmente 0,4 a 1,3.

7. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 4 a 6, em que o amido de hidroxietila tem uma relação preferida entre substituição de $\text{C}_2 : \text{C}_6$ na faixa de 2 a 20 com respeito aos grupos hidroxietila.

8. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 1 a 7, em que a substância ativa é selecionada a partir do grupo que consiste em proteínas, peptídeos, fármacos de molécula pequena, agentes ativos, glicoproteínas e oligonucleotídeos, tais como DNA, RNA, PNA ou derivado destes.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que a substân-

cia ativa é selecionada a partir do grupo que consiste em proteínas, peptídeos e PNA compreendendo um grupo alfa-SH-beta amino, preferivelmente compreendendo um grupo cisteína, em particular uma cisteína de terminal N.

10. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 8 ou 9, em que a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em EPO, G-CSF, IFN alfa, IFN beta, AT III, IL-2, IL-3, mioglobina, SOD, BSA, rhEPO, rhG-CSF, rhIFN alfa, rhIFN beta, rhAT III, rhIL-2, rhIL-3, AIAT, Fator VII, Fator VIII, Fator IX, tPA, e APC.

11. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que a substância ativa é selecionada a partir do grupo que consiste em proteínas, glicoproteínas ou peptídeos que compreendem um aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal, preferivelmente glicoproteínas contendo um aldeído em uma cadeia lateral de glicanos ou peptídeos sintéticos.

12. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações anteriores, em que o amido de hidroxialquila ou derivado deste compreende 1 a 100, preferivelmente 1 a 15, em particular 1 grupo aldeído, grupo ceto e/ou grupo hemiacetal ou em que o amido de hidroxialquila ou derivado deste compreende 1 a 100, preferivelmente 1 a 15, em particular 1 grupo alfa-SH-beta amino.

13. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações anteriores, em que a substância ativa compreende 1 a 15, preferivelmente 1 a 8, em particular 1 grupo aldeído, grupo ceto e/ou grupo hemiacetal ou em que a substância ativa compreende 1 a 15, preferivelmente 1 a 8, em particular 1 grupo alfa-SH-beta amino.

14. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações anteriores, em que de acordo com (A), o grupo hemiacetal do amido de hidroxialquila é o grupo hemiacetal da extremidade de redução do amido de hidroxialquila em sua forma não oxidada.

15. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 1 a 14, em que o derivado de amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou o referido grupo alfa-SH-beta amino é obtido por um método que compreende

(a)(1) introduzir pelo menos um grupo aldeído no amido de hidroxialquila por uma reação de oxidação de abertura de anel, ou

(a)(2) reagir o amido de hidroxialquila com pelo menos um, pelo menos composto bifuncional, o referido composto compreendendo dois grupos funcionais M_1 e Q, um grupo funcional M_1 sendo reagido com o amido de hidroxialquila e um grupo funcional Q sendo

(i) um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino; ou

(ii) um grupo funcional sendo quimicamente modificado para produzir o grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou o grupo alfa-SH-beta amino.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(1), o amido de hidroxialquila é submetido a uma reação de oxidação de abertura de anel empregando-se um periodato para produzir um derivado de amido de hidroxialquila tendo pelo menos um grupo aldeído.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(2), o grupo funcional M_1 é reagido com um grupo OH no amido de hidroxialquila ou a extremidade de redução não oxidada ou oxidada de amido de hidroxialquila.

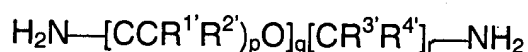
18. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(2), o grupo funcional M_1 é um grupo carbóxi ou um grupo carbóxi reativo e o grupo funcional Q é um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, em que o composto bifuncional compreendendo M_1 e Q é selecionado a partir do grupo que consiste em ácido formilbenzóico, éster de pentafluorofenila de ácido 4-formilbenzóico, éster de N-hidroxissuccinimida de ácido 4-formilbenzóico e ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenóxi)butírico ou um composto biocompatível selecionado a partir do grupo que consiste em ácidos alfa-ceto carboxílicos, ácidos neuramínicos ou derivados dos mesmos e fosfato de piridoxal.

20. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(2)(ii) o, pelo menos, composto bifuncional compreende um grupo amino M_1 e um grupo amino Q.

78/6

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, em que o, pelo menos, composto bifuncional é um diaminoalcano opcionalmente substituído tendo de 1 a 20 átomos de carbono, preferivelmente um composto sendo selecionado a partir do grupo que consiste em 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, e 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 1,6-diaminohexano, 1,7-diaminoheptano, 1,8-diaminooctano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminodecano, 1,11-diaminoundecano, 1,12-diaminododecano, 1,13-diaminotridecano, 1,14-diaminotetradecano, 1,15-diaminopentadecano, 1,16-diaminoexadecano, 1,17-diaminoheptadecano, 1,18-diaminooctadecano, 1,19-diaminononadecano, e 1,20-diaminoeicosano ou um composto tendo a fórmula



em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são selecionados independentemente a partir do grupo, consistindo em hidrogênio, e grupo alquila, preferivelmente hidrogênio e grupo metila,

15 p é 2 a 4, em que os resíduos R^1 e R^2 podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos $\text{p CR}^1\text{R}^2$,
 q é 0 a 20, preferivelmente 0 a 10;
 r é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de $q = 0$, r não é 0, e em que os resíduos R^3 e R^4 podem ser os mesmos ou diferentes no grupo $r \text{ CR}^3\text{R}^4$.
 20

22. Método, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, adicionalmente compreendendo reagir o derivado de amido de hidroxialquila, resultando da reação do amido de hidroxialquila com o, pelo menos, composto bifuncional compreendendo dois grupos amino M_1 e Q , no grupo amino Q com um outro composto bifuncional compreendendo um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal para produzir um derivado de amido de hidroxialquila tendo um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o outro composto bifuncional é selecionado a partir do grupo que consiste em ácido formilbenzóico, éster de pentafluorofenila de ácido 4-formilbenzóico, éster de

JY

N-hidroxissuccinimida de ácido 4-formilbenzóico, ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenóxi)butírico, e anidrido de ácido 4-formilbenzóico.

24. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 20 a 23, em que o amido de hidroxialquila é reagido por sua extremidade de
5 redução opcionalmente oxidada com o grupo funcional M_1 .

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que estatisticamente mais que 50%, preferivelmente pelo menos 55%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais
10 preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 95% tal como 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% das moléculas de amido de hidroxialquila empregadas para uma determinada reação são reagidos por pelo menos uma extremidade de redução opcionalmente oxidada por
15 molécula de amido de hidroxialquila.

26. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(2)(i), o grupo funcional M_1 é selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo carbóxi, um grupo carbóxi reativo, anidrido de ácido carboxílico, halogeneto de ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, éster de ácido
20 clorofórmico, e grupos epóxido e o grupo funcional Q é um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, em que o grupo funcional M_1 é reagido com grupos OH no amido de hidroxialquila.

28. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em
25 (a)(2)(i), o grupo funcional M_1 é selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo amino e um grupo alfa-SH-beta amino e o grupo funcional Q é um grupo alfa-SH-beta amino.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, em que o grupo funcional M_1 é reagido com a extremidade de redução opcionalmente oxidada do amido de hidroxialquila.
30

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, em que estatisticamente mais que 50%, preferivelmente pelo menos 55%, mais preferivel-

89

mente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 95% tal como 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% das moléculas de amido de hidroxialquila empregados para uma determinada reação são reagidos por pelo menos uma extremidade de redução opcionalmente oxidada por molécula de amido de hidroxialquila.

31. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(2)(i), o amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-beta-amino é obtido por um método compreendendo reagir o amido de hidroxialquila na extremidade de redução opcionalmente oxidada com um composto compreendendo um grupo funcional M_1 e um grupo funcional Q sendo um grupo alfa-SH-beta amino.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, em que o composto compreendendo M_1 e o grupo alfa-SH-beta-amino é 1,3-diamino-2-tio propano ou 2,3-diamino-1-tio propano.

33. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(2)(ii) o, pelo menos, composto bifuncional compreende M_1 sendo um grupo carbóxi ou um grupo carbóxi reativo e Q sendo um grupo alfa-SH-beta amino protegido.

34. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que o, pelo menos, composto bifuncional é selecionado a partir do grupo que consiste em D-, L- PG_1 -Cis(PG_2)-OH, ou uma mistura racêmica do mesmo, e seu éster ativo, em que PG_1 pode ser qualquer grupo protetor adequado para um grupo amino, preferivelmente selecionado a partir do grupo que consiste em *tert*-butiloxicarbonila (Boc) ou 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc), e PG_2 pode ser qualquer grupo protetor adequado para um grupo tiol, preferivelmente selecionado a partir do grupo que consiste em tritila (Trt), p-metoxitritila (Mmt) S-*tert*-butiltio (S-t-Bu), e acetamidometila (Acm).

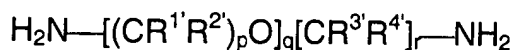
35. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que em (a)(2)(ii), o amido de hidroxialquila compreendendo o referido grupo alfa-SH-

85

beta-amino é obtido por um método compreendendo opcionalmente oxidar amido de hidroxialquila em sua extremidade de redução, reagir as extremidade de redução não oxidada ou oxidada com um grupo funcional M_1 de um composto compreendendo, além de M_1 , um grupo funcional adicional Q, para
 5 produzir um primeiro derivado de amido de hidroxialquila, e reagir o grupo funcional Q do primeiro derivado de amido de hidroxialquila com um grupo funcional V de um composto compreendendo, além de V, um grupo alfa-SH-beta-amino opcionalmente protegido, para produzir o derivado de amido de hidroxialquila funcionalizado por alfa-SH-beta-amino opcionalmente protegido.

10 36. Método, de acordo com a reivindicação 35, em que o composto compreendendo M_1 e Q são um composto de diamino ou carbodiimidazol ou carbonato de N,N'-dissuccinimidila.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, em que o, pelo menos, composto bifuncional é um diaminoalcano opcionalmente substituído
 15 tendo de 1 a 20 átomos de carbono, preferivelmente um composto sendo selecionado a partir do grupo que consiste em 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, e 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 1,6-diaminohexano, 1,7-diaminoeptano, 1,8-diaminooctano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminodecano, 1,11-diaminoundecano, 1,12-diaminododecano, 1,13-diaminotridecano, 1,14-diaminotetradecano, 1,15-diaminopentadecano, 1,16-diaminoexadecano, 1,17-diaminoeptadecano, 1,18-diaminooctadecano, 1,19-diaminononadecano e 1,20-diaminoeicosano ou um composto tendo a
 20 fórmula



em que $R^{1'}$, $R^{2'}$, $R^{3'}$, e $R^{4'}$ são selecionados independentemente a partir do
 25 grupo, consistindo em hidrogênio, e grupo alquila, preferivelmente hidrogênio e grupo metila,

p é 2 a 4, em que os resíduos R^1 e R^2 podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos $p CR^{1'}R^{2'}$,

q é 0 a 20, preferivelmente 0 a 10;

30 r é 0 a 20, preferivelmente 2 a 4, em que no caso de $q = 0$, r não é

0, e em que os resíduos R^3 e R^4 podem ser os mesmos ou diferentes nos grupos CR^3R^4 .

38. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 35 a 37, em que o composto compreendendo V e o grupo alfa-SH-beta-amino opcionalmente protegido são cisteína ou um derivado desta, V sendo
5 um grupo carbóxi ou um grupo carbóxi reativo, preferivelmente um éster reativo ou um anidrido de ácido carboxílico ou o composto compreendendo V é 1,3-diamino-2-tio propano ou 2,3-diamino-1-tio propano.

39. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações
10 anteriores, em que a substância ativa, preferivelmente uma proteína opcionalmente modificada, peptídeo, peptídeo sintético ou oligonucleotídeo, compreendendo o referido grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou o referido grupo alfa-SH-beta-amino é obtido por um método compreendendo

(b)(1) introduzir pelo menos um grupo aldeído, grupo ceto, grupo
15 hemiacetal ou pelo menos um grupo alfa-SH-beta-amino na substância ativa durante sua preparação ou por modificação química, ou

(b)(2) reagir a substância ativa com um, pelo menos, composto bifuncional, o referido composto compreendendo dois grupos funcionais M_2 e Q, um grupo funcional M_2 sendo reagido com a substância ativa e um grupo
20 funcional Q sendo

(i) um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino; ou

(ii) um grupo funcional sendo quimicamente modificado para produzir o grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou um grupo alfa-SH-beta amino.
25

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, em que em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou peptídeo que foi preparada por síntese orgânica, preferivelmente produzida empregando-se uma resina de síntese, permitindo uma proteína ou peptídeo funcionalizado por aldeído, funcionalizado por ceto, funcionalizado por hemiacetal ou funcionalizado por alfa-SH-beta-amino, ou em que em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou peptídeo que foram produzidos empregando-se um vetor de expressão
30

que conduz a um proteína ou peptídeo funcionalizado por aldeído, funcionalizado por ceto, funcionalizado por hemiacetal ou funcionalizado por alfa-SH-beta-amino, ou em que em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou um peptídeo e a cadeia principal da proteína ou peptídeo é substituída com um grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou grupo alfa-SH-beta-amino, ou em que em (b)(1), a substância ativa é uma proteína ou um peptídeo onde o referido grupo aldeído, grupo ceto, grupo hemiacetal ou o referido grupo alfa-SH-beta-amino ser ligado diretamente à cadeia principal da proteína ou peptídeo ou ser parte de uma cadeia lateral da cadeia principal.

41. Método, de acordo com a reivindicação 39, em que em (b)(1) a substância ativa é uma proteína ou peptídeo e o grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal é compreendido em uma porção de carboidrato do polipeptídeo.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, em que a porção de carboidrato é selecionada a partir do grupo que consiste em hidroxialdeídos, hidroxicetonas e modificações químicas das mesmas.

43. Método, de acordo com a reivindicação 41, em que a porção de carboidrato é um derivado de uma porção de carboidrato de ocorrência natural e é selecionada a partir do grupo que consiste em glicose, galactose, manose e ácido siálico, que são opcionalmente quimicamente ou enzimaticamente oxidados, preferivelmente uma galactose oxidada ou um resíduo de ácido siálico oxidado de uma cadeia lateral de carboidrato, mais preferivelmente a galactose terminal ou resíduo de ácido siálico de uma cadeia lateral de carboidrato, a oxidação de uma porção de carboidrato terminal sendo realizada enzimaticamente ou quimicamente, uma oxidação química preferivelmente realizada empregando-se um periodato.

44. Método, de acordo com a reivindicação 41, em que a porção de carboidrato é um derivado de um porção de carboidrato de ocorrência natural e é uma galactose terminal, que é quimicamente ou enzimaticamente oxidada, em que o resíduo de galactose terminal é obtido opcionalmente depois da clivagem de um ácido siálico terminal.

45. Método, de acordo com a reivindicação 39, em que em

(b)(2)(i), o grupo alfa-SH-beta-amino é compreendido em um resíduo de cisteína da substância ativa, preferivelmente uma proteína ou peptídeo, o resíduo de cisteína preferivelmente sendo um resíduo de cisteína de terminal N da substância ativa.

5 46. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações anteriores, em que a substância ativa é uma proteína ou peptídeo modificado com um resíduo de cisteína de terminal N, que não faz parte de uma ponte de dissulfeto.

10 47. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a proteína ou peptídeo modificado que possuem um resíduo de cisteína de terminal N é um mutante de uma proteína ou peptídeo de ocorrência natural, obtido (1) adicionando-se um resíduo de cisteína ao aminoácido de terminal N, (2) substituindo-se o aminoácido de terminal N com cisteína, ou por (3) deletando-se o(s) aminoácido(s) de terminal N até uma cisteína terminal ser obtida.

15 48. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações anteriores, em que a reação (A) ou (B) é realizada em uma temperatura de 0 a 40°C, preferivelmente 0 a 25°C, em particular 20 a 25°C, na presença de um solvente, e em um pH de 3,5 a 10, preferivelmente 4 a 8, em particular 4,8 a 8,0 com um tempo de reação de preferivelmente 0,1 a 24 h, em particular aproximadamente 21 h.

20 49. Método, de acordo com a reivindicação 48, em que o solvente é selecionado a partir do grupo que consiste em água, tampão aquoso, DMF, DMSO, DMA e misturas dos mesmos.

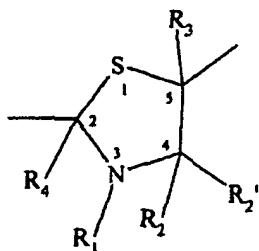
25 50. Método, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 48 ou 49, em que a relação molecular de amido de hidroxialquila para substância ativa é cerca de 1 :1 a 200:1, preferivelmente 10:1 a 100:1, em particular 40:1 a 70:1.

30 51. Conjugado de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, quando alcançável por um método como definido nas reivindicações 1 a 50.

52. Conjugado de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, em que a substância ativa e o amido de hidroxialquila são covalentemente

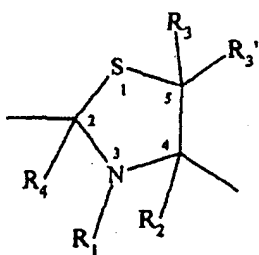
85

te ligados por um resíduo químico tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I)



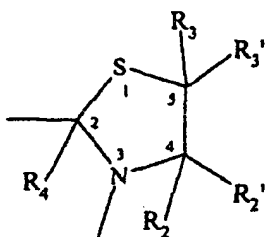
(I)

ou fórmula (I')



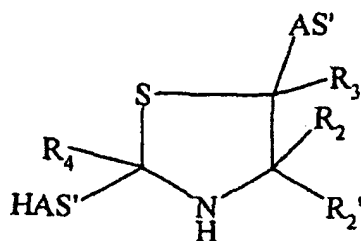
(I')

ou fórmula (I'')



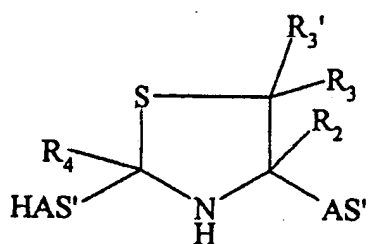
(I'')

- 5 em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo heteroalquila, aralquila, heteroarila, arila e alquila opcionalmente adequadamente substituído, linear, cíclico e/ou ramificado, preferivelmente hidrogênio, o referido conjugado tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (IV), (IV'), ou (IV'')
- 10



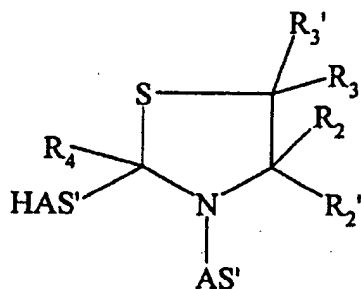
(IV)

86



(IV'')

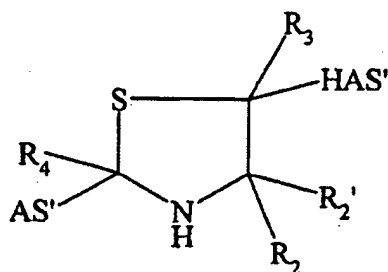
ou



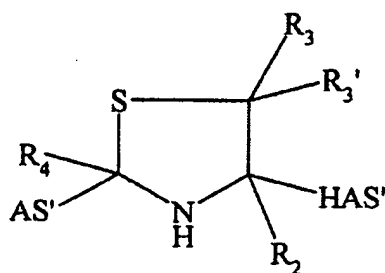
(IV'')

em que HAS' é o resíduo do amido de hidroxialquila ou um derivado do mesmo que foi ligado a um grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal, e em que AS' é o resíduo da substância ativa ou um derivado da mesma que foi ligado ao grupo alfa-SH-beta-amino,

- 5 ou uma estrutura de acordo com a fórmula (V), (V'), ou (V'')

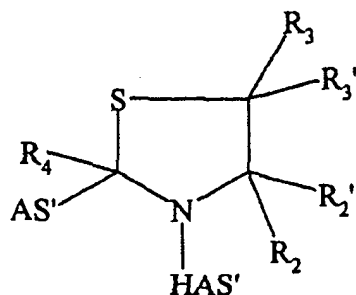


(V)



(V')

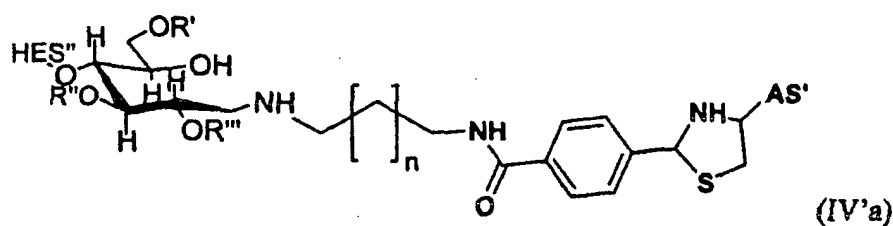
ou



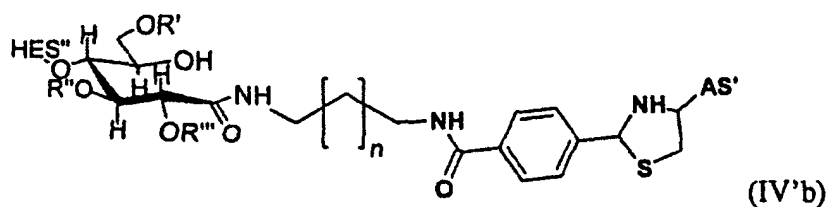
(V'')

em que HAS' é o resíduo do amido de hidroxialquila ou um derivado do mesmo que foi ligado ao grupo alfa-SH-beta-amino, e em que AS' é o resíduo da substância ativa ou um derivado da mesma que foi ligado ao grupo aldeído, grupo ceto ou grupo hemiacetal.

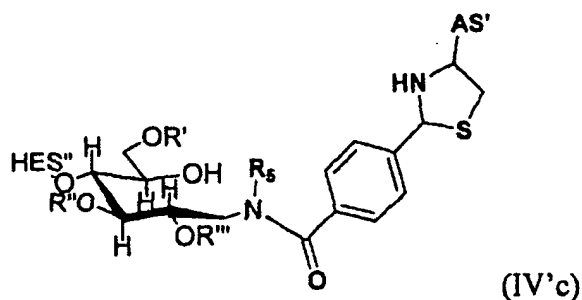
- 5 53. Conjugado, de acordo com a reivindicação 52, em que o conjugado é selecionado a partir do grupo que consiste em



(IV'a)

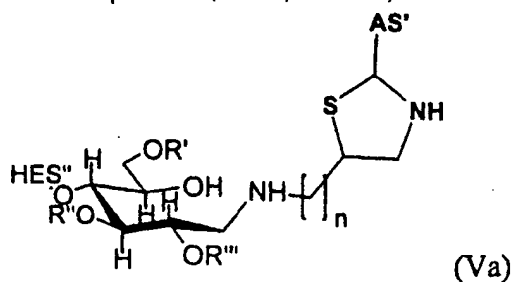


(IV'b)



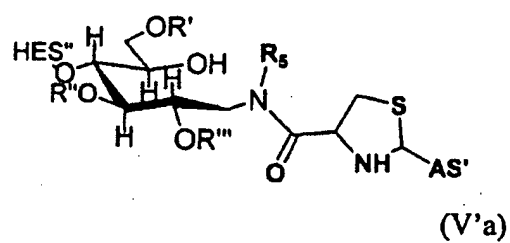
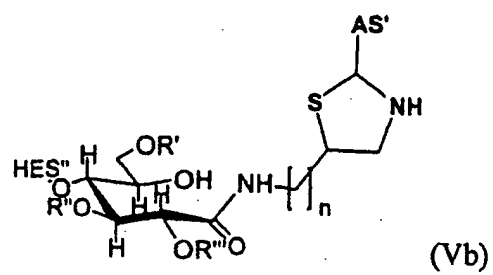
(IV'c)

em que R₅ é como definido para R₁ a R₄ acima,

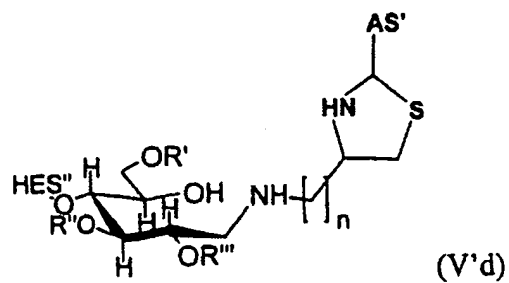
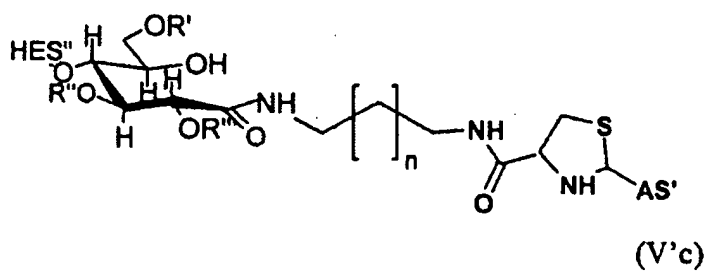
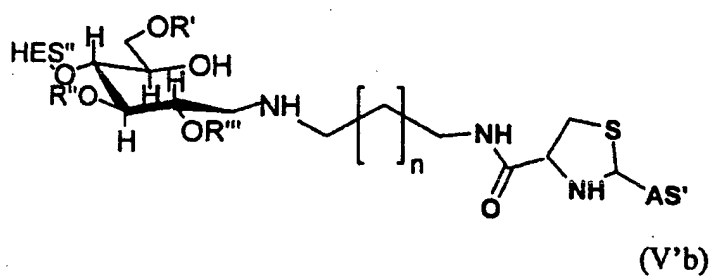


(Va)

88

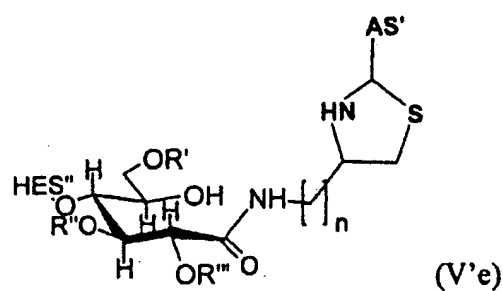


em que R_5 é como definido para R_1 a R_4 acima,



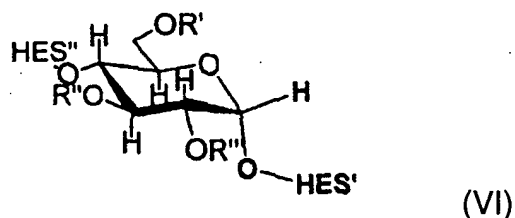
e

88

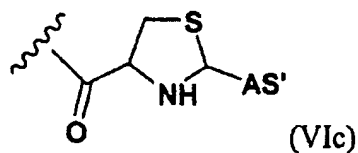
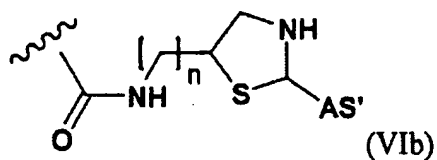
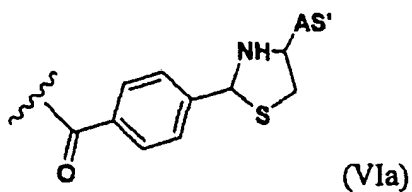


em que na fórmula IV'a, IV'b, V'b, ou V'c, n é um número inteiro, preferivelmente n é 0 a 20, e onde na fórmula Va, Vb, V'd, ou V'e, n é um número inteiro, preferivelmente n é 1 a 20.

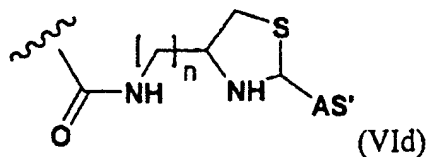
54. Conjugado, de acordo com a reivindicação 52, em que o
5 conjugado é



em que R' , R'' e/ou R''' é/são como definido(s) para fórmula II e em que, em pelo menos uma unidade de glicose de HES, pelo menos um dentre R' , R'' e/ou R''' seja selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em

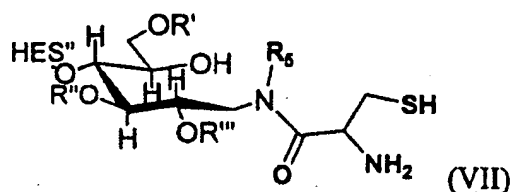


e



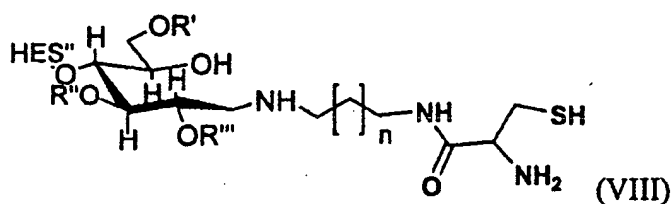
e em que n é um número inteiro, preferivelmente 1 a 20 e/ou em que pelo menos um dentre R' , R'' e/ou R''' é $-(CH_2CH_2O)_m-R^{n^o}$, em que m é um número inteiro, preferivelmente 1 a 3, e R^{n^o} é selecionado a partir do grupo que consiste na fórmula (VIa), (VIb), (VIc) e (VI'd).

- 5 55. Derivado de amido de hidroalquila funcionalizado por alfa-SH-beta amino selecionado a partir do grupo que consiste em



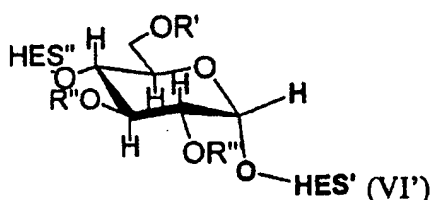
em que R_5 é como definido para R_1 a R_4 acima,

e

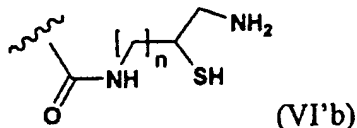
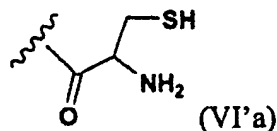


em que n é um número inteiro, preferivelmente 0 a 20,

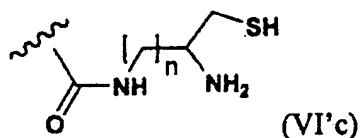
- 10 ou o grupo que consiste em



em que R' , R'' e/ou R''' é/são como definido(s) para fórmula II e em que em pelo menos uma unidade de glicose de HES, pelo menos um dentre R' , R'' e/ou R''' seja selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em



e



e em que n é um número inteiro, preferivelmente 1 a 20 e/ou em que pelo menos um dentre R' , R'' e/ou R''' é $-(CH_2CH_2O)_m-R^{n^{na}}$, em que m é um número inteiro, preferivelmente 1 a 3, e $R^{n^{na}}$ é selecionado a partir do grupo que consiste na fórmula (VI'a), (VI'b), e (VI'c).

5 56. Conjugado, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 51 a 54, para uso em um método para o tratamento do corpo humano ou animal.

57. Conjugado, de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 51 a 54, como um agente terapêutico.

10 58. Composição farmacêutica compreendendo um conjugado de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 51 a 54.

59. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 58, também compreendendo pelo menos um diluente, adjuvante, ou veículo farmaceuticamente aceitável.

15 60. Composição compreendendo um conjugado de uma substância ativa e amido de hidroxialquila de acordo com quaisquer dentre as reivindicações 51 a 54.

92/8

1/10

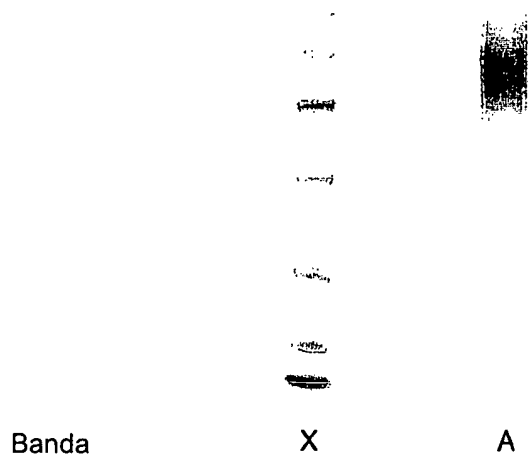


Fig. 1

93/

2/10

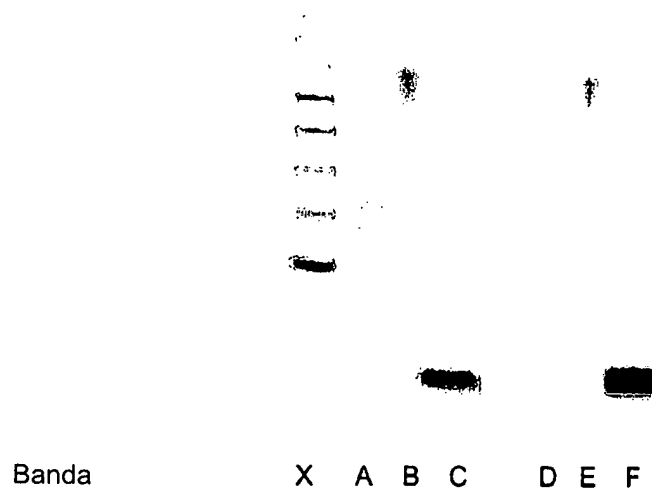


Fig. 2

94
7

3/10

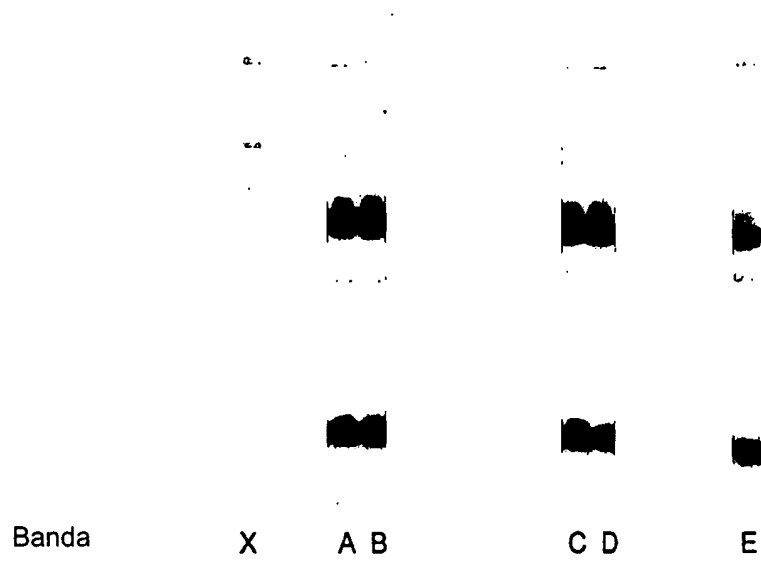


Fig. 3

95
2

4/10

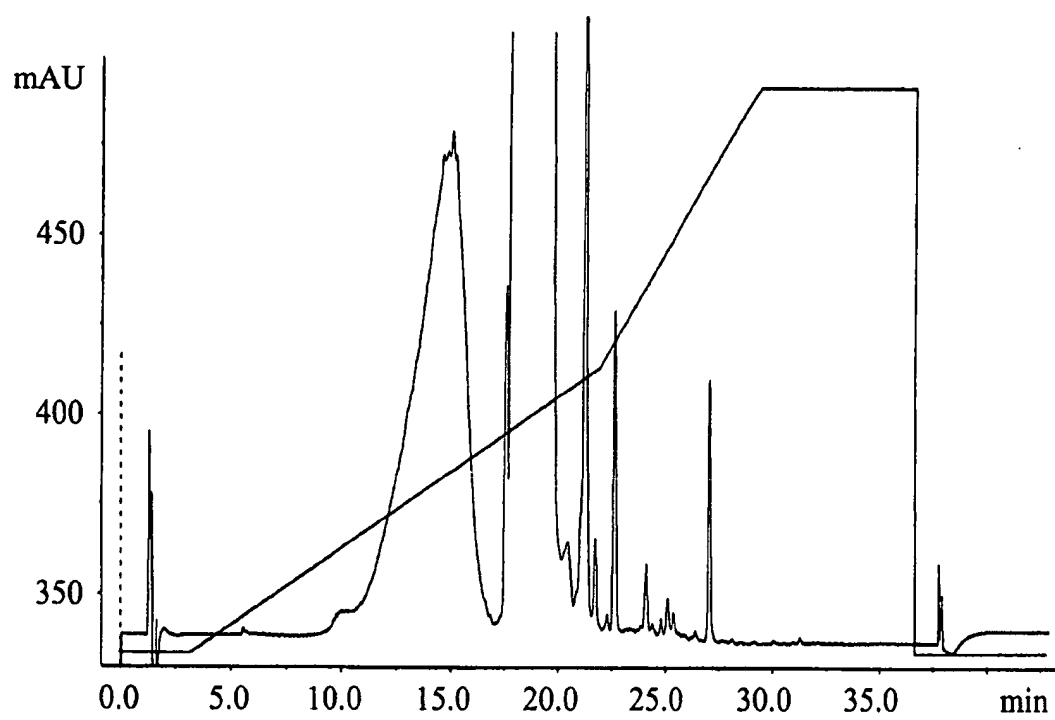
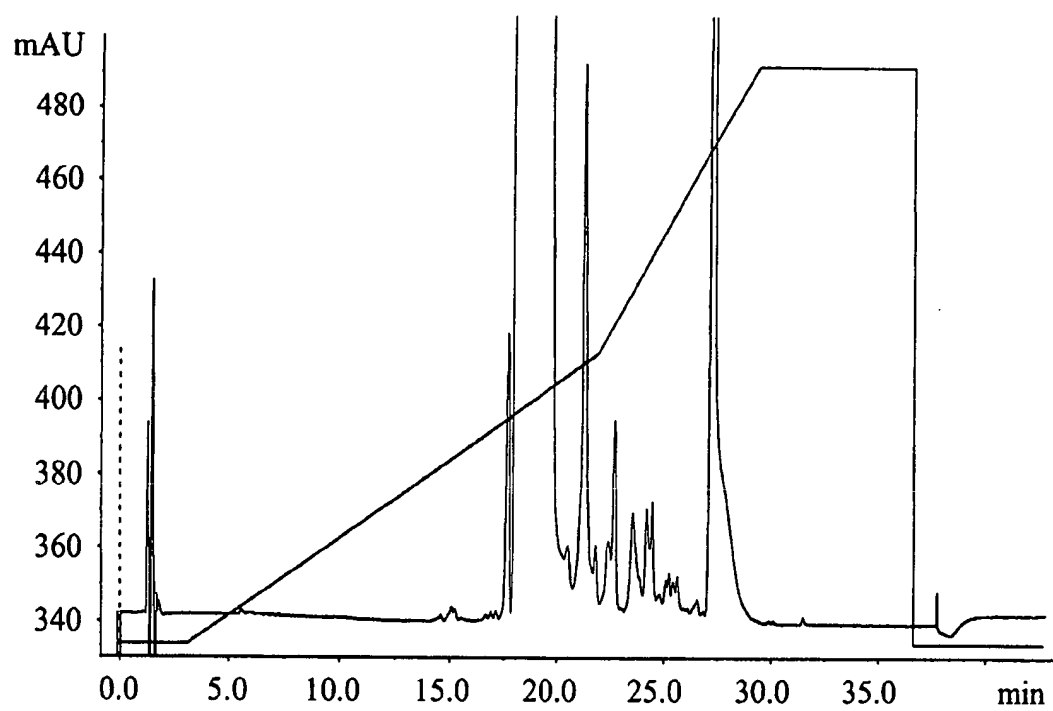


Fig. 4

**Fig. 5**

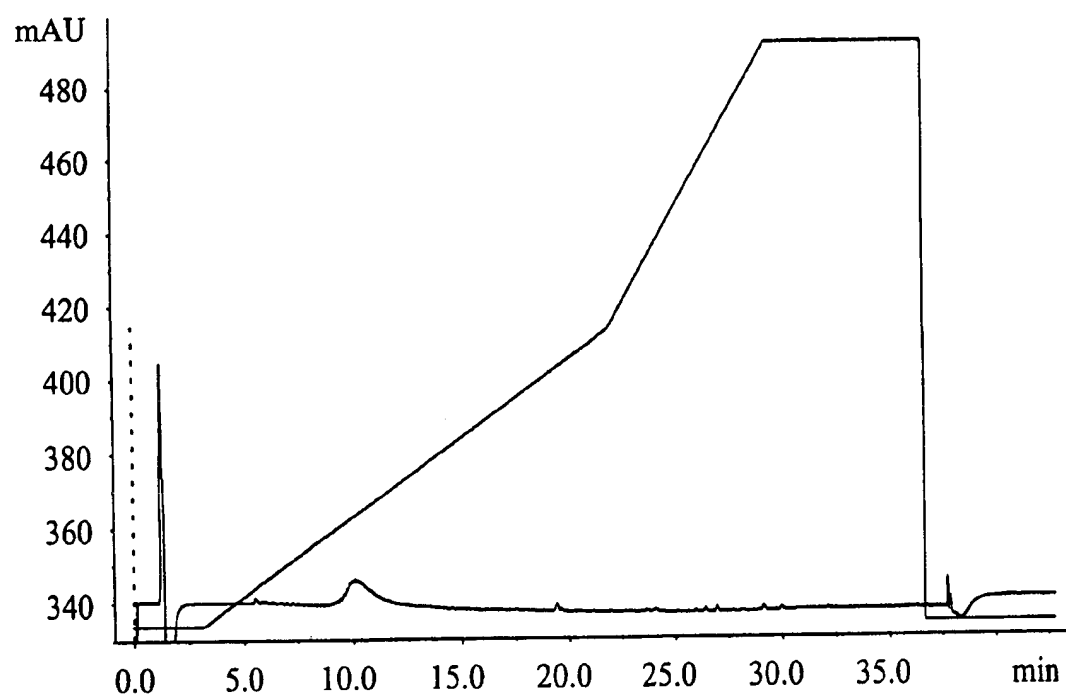
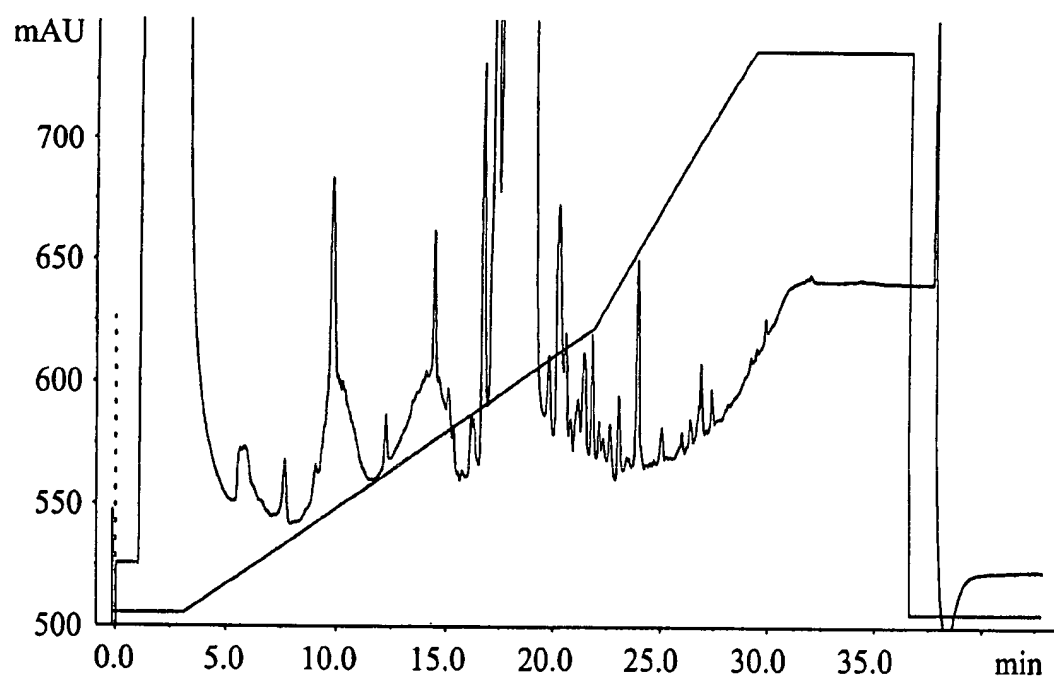


Fig. 6

**Fig. 7**

99
8

8/10

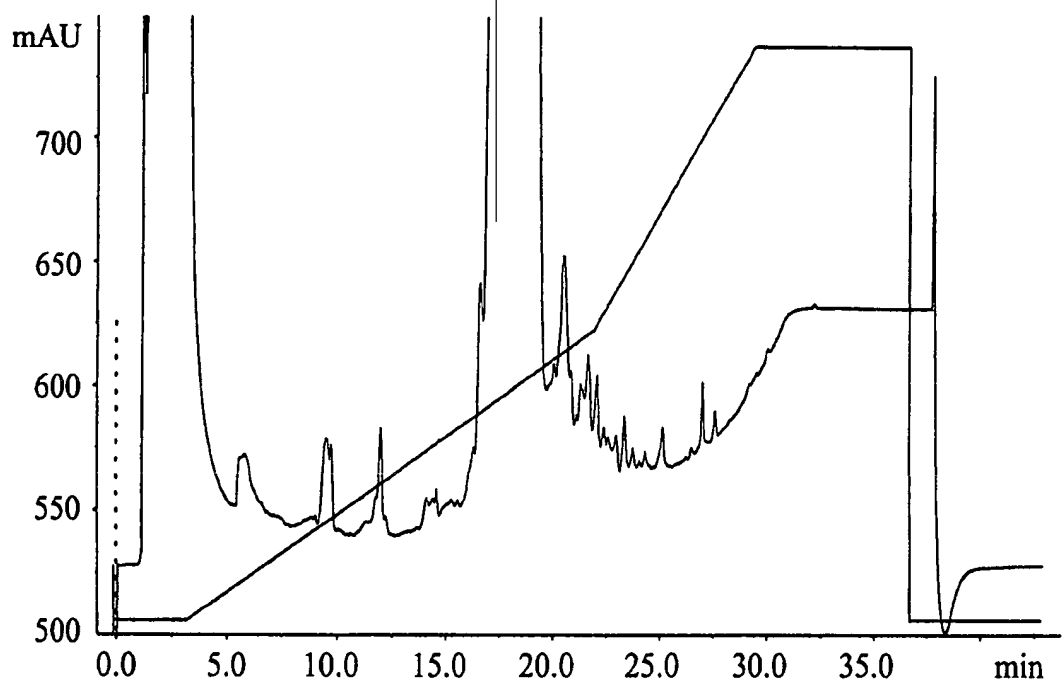


Fig. 8

102

9/10

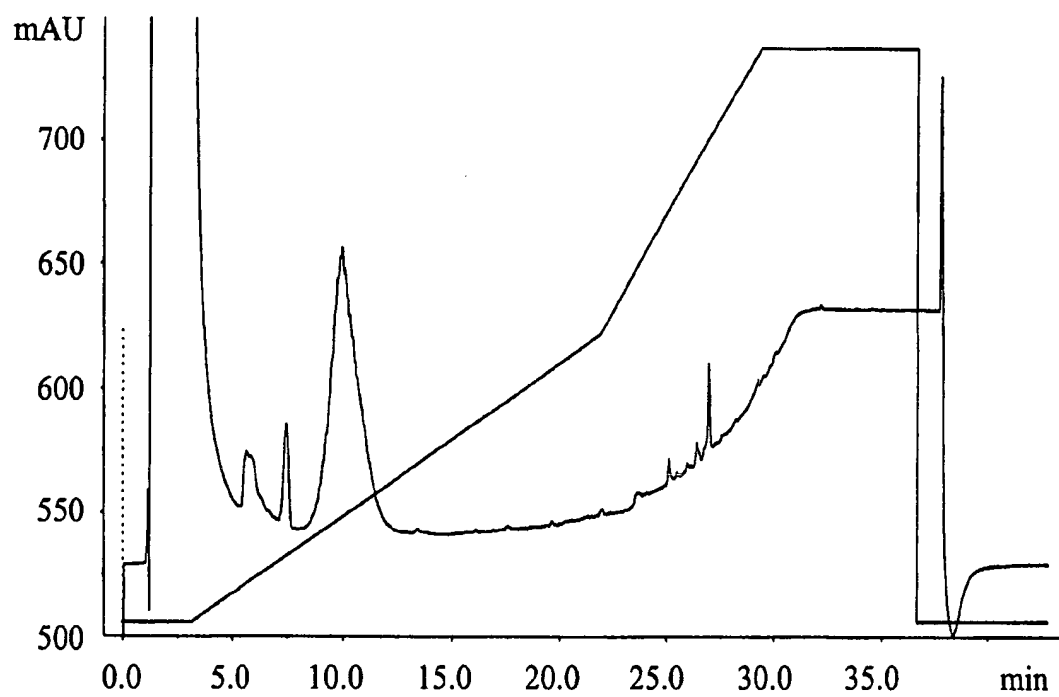


Fig. 9

10/10

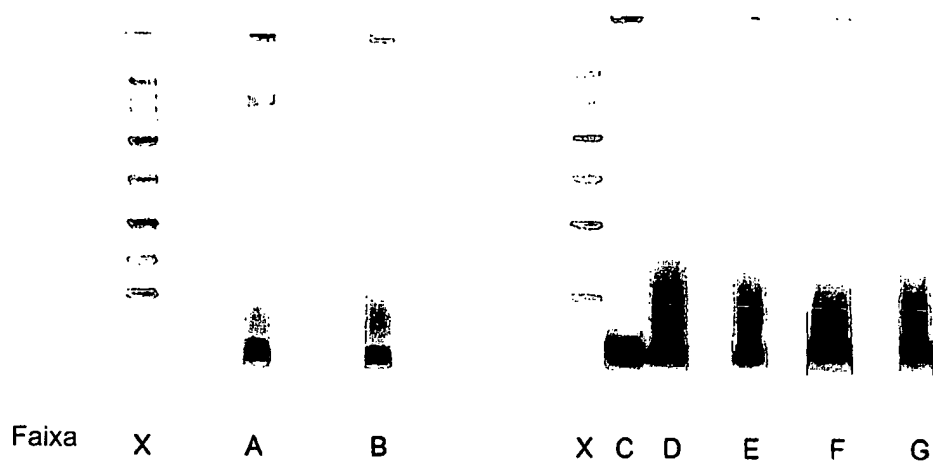


Fig. 10

P10615732-7

102
X

RESUMO

Patente de Invenção: **"CONJUGADOS DE AMIDO DE HIDROXIALQUILA E UMA SUBSTÂNCIA ATIVA PREPARADA POR LIGAÇÃO QUÍMICA POR MEIO DE TIAZOLIDINA"**.

- 5 A presente invenção refere-se a um método para preparar conjugados de uma substância ativa e amido de hidroxialquila e a conjugados de uma substância ativa e amido de hidroxialquila, preferivelmente amido de hidroxietila, em que os conjugados são preparados ligando-se covalentemente o amido de hidroxialquila e a substância ativa por um resíduo químico
- 10 tendo uma estrutura de acordo com a fórmula (I) (I') (I'') em que R_1 , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' e R_4 são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo heteroaralquila, aralquila, heteroarila, arila e alquila opcionalmente adequadamente substituído, linear, cíclico e/ou ramificado, preferivelmente hidrogênio.