



Organización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

OK
26/

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

INVENTARIO

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-78139

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

CONJUGADOS DE UN POLIPEPTIDO Y UN OLIGOSACARIDO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

AGIK 47/48

71. SOLICITANTE

N.V. ORGANON

DOMICILIO

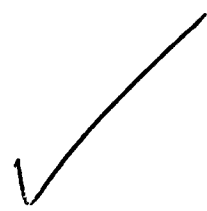
5249 AB Oss, HOLANDA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,





Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-078139- -00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:49:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE I/II Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL *Sept. 1/2007*

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: N.V. ORGANON

Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Holanda.

Dirección: Kloosterstraat 6,
5349 AB Oss,
Holanda

Domicilio: 5349 AB Oss,
Holanda

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@camyp.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Ebo Sybren BOS

P.O. Box 20,
N.V. Organon,
5340 BH Oss,
Holanda

3. Meertinus Jan SMIT

P.O. Box 20,
N.V. Organon,
5340 BH Oss,
Holanda

2. Martin DE KORT

N.V. Organon,
P.O. Box 20,
5340 BH Oss,
Holanda

4. Constant Adriaan Anton VAN BOECKEL

P.O. Box 20,
N.V. Organon,
5340 BH Oss,
Holanda

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/050551

Fecha: 31 de enero de 2006

Publicación Internacional No. WO 2006/082184 A3

Fecha: 10 de agosto de 2006

6

Título (54)

CONJUGADOS DE UN POLIPEPTIDO Y UN OLIGOSACARIDO

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 47/48

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

NL

(32) Fecha

1 de febrero de 2005

(31) Número de Solicitud

05100688.0

9

Comprobante de pago No.:

07-57,557

Fecha: 16 de julio de 2007

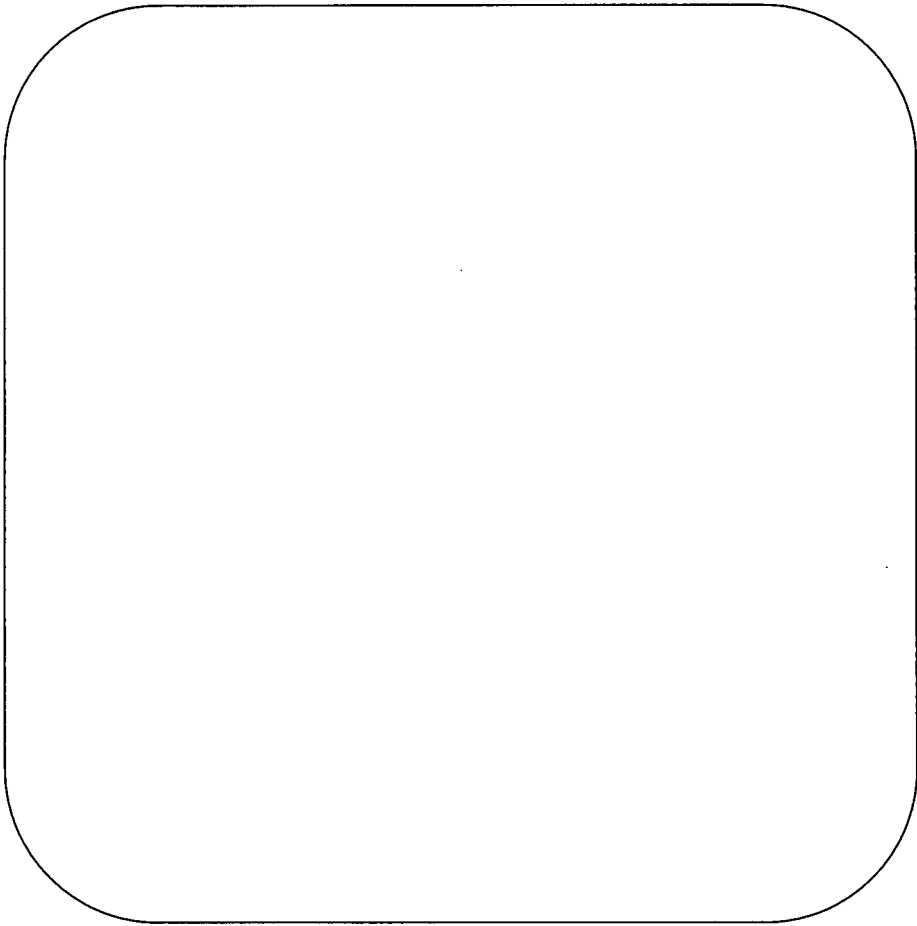
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

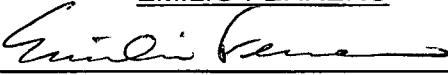
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/082184 A3

Descripción:

Páginas 63 en el idioma original

Páginas 82 en español

Reivindicaciones: Número (s) 32

Figuras: Número (s) 22

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

CAVELIER

GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO y ERNESTO CAVELIER, domiciliados en Carrera 4a. No. 72-35, Bogotá, Colombia

PODER

Yo (nosotros), abajo firmado(s)

N.V. Organon

domiciliado(s) en Kloosterstraat 6, 5349 AB OSS, Países Bajos

por el presente conferimos poder a GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO y ERNESTO CAVELIER, domiciliados en Carrera 4a. No. 72-35, Bogotá, Colombia, para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial, y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me(nos) represente(n) ante cualquier autoridad o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas y de servicio; el depósito de nombres comerciales y enseñas; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) las acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan; y c) para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este poder, transigir, desistir, cancelar, recibir, renunciar, aceptar notificaciones nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Dado y firmado hoy 5 de noviembre de 1986

en Arnhem

N.V. Organon

For patents, designs, trademarks, service marks, commercial names, ensigns.

Para patentes, modelos, dibujos, marcas de fábrica y de servicio, nombres comerciales y enseñas.

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned
N.V. Organon

of Kloosterstraat 6, 5349 AB OSS, the Netherlands

hereby grant to GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO and ERNESTO CAVELIER, domiciled at Carrera 4a. No. 72-35, Bogotá, Colombia, Power of Attorney to

and to obtain the protection of my (our) industrial property and against unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us); and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications appoint attorneys-in-fact in or out of Court, and ratify the acts made by agents without power of attorney.

Given and signed this 5th day of November 1986

in Arnhem

J. Werkman

J.N.H. de Carpentier Wolf

proxyholders

signature

TRANSCRIPCION OFICIAL NO. 281/86
KLUCKS CROOFT
INTERPRETE OFICIAL
MINISTERIO DE JUSTICIA

LEGALIZATION

KINGDOM OF THE NETHERLANDS
Legalization *inter alia* ex
Section 59 Code of Commerce
I, Pierre Henri Marie KEESOM,



„Nikolaas“ in Trade
Marks to the Court of
Appeal in Amsterdam,
do hereby certify:

the signatures in retro to be
of Mr. Jan WERKMAN and Mr.
Jan Hilbrand Hendrik de
CARPENTIER WOLF, procurists of
„N. Organon.

TRADUCCION OFICIAL No. 281/86
ALFRED GROOT
INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION No. 2195, ABRIL 17, 1969
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA.



CONSULADO DE COLOMBIA

FECHA:

11 NOV. 1986

No. 1594

El suscrito, CONSUL DE COLOMBIA en LA HAYA-HOLANDA-

C E R T I F I C A:

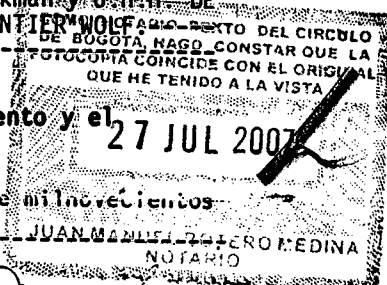
1º. Que el señor PIERRE HENRI MARIE KEESOM-----
quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha
allí indicada, las funciones de OFICIAL DE AUTENTICACIONES ANTE LA CORTE
DE APELACION DE HOLANDA-----

y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son
los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

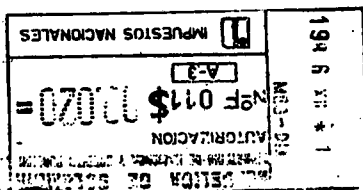
2º. Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía N.V. ORGANON--
----- existe legalmente,

que actualmente ejerce su objeto social y que el señor J. Werkman y J. H. H. DE
en su carácter de representantes oficiales-----
está autorizado para representarla en este acto.
Este certificado se relaciona con la parte formal del documento y el
suscrito no asume responsabilidad alguna por su contenido.

Dado en La Haya, a los once(11) días del mes de Noviembre de milnovecientos
ochenta y seis(1986)-----



[Signature]
CONSUL DE COLOMBIA
LA HAYA



CAVELE - ABOGADOS

TRADUCCION OFICIAL No. 281/86
ALFRED GROOT
INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION No. 2195, ABRIL 17, 1969
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA.

Consular legalization is necessary.
NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL COLOMBIANO: Según los artículos 65 del C. de P. C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Consul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social, que quien confiere el poder es su representante y puede otorgar el poder, segundamente autenticar la firma de este.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

27 JUL 2007

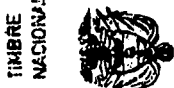
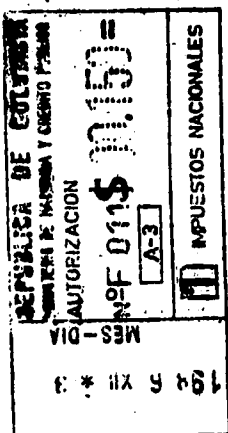
JUAN MANUEL BOTERO MEDIN
NOTARIO

TRADUCCION OFICIAL No. 781/86
ALICIA GROOT
INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION No. 2195, ABRIL 17, 1988
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA.

BOGOTA 2 DIC. 1986 No. 184600
HACE CONSTAR

Que el señor Mano Cuervo C.
cuya firma aparece al pie del
documento, desempeñaba en ese momento
las funciones allí indicadas.

JOSE M. PERA RIVERA
Eduardo Magueta Gonzalez
Marta Camacho



CAVELIER - ARBOGADO

6

TRADUCCION OFICIAL No. 281/86 de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor lo mismo que la presente. ----- Autenticaciones que se hallan a continuación de un Poder, escrito en Inglés y en Español, otorgado por la sociedad N. V. ORGANON, a los doctores GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO y ERNESTO CAVELIER.

Dado y firmado el día 5 de noviembre de 1986, en Arnhem.

N. V. Organon

(firmado) (firma ilegible)

J. Werkman

Apoderados

Al dorso, dice:

(firmado) (firma ilegible)

J.H.H. de Carpentier Wolf

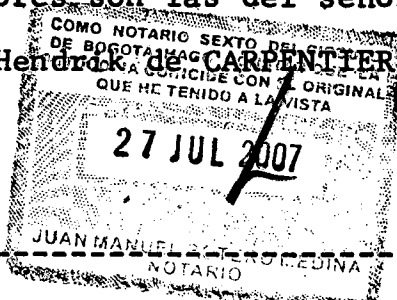
LEGALIZACION

Noviembre 6 de 1986

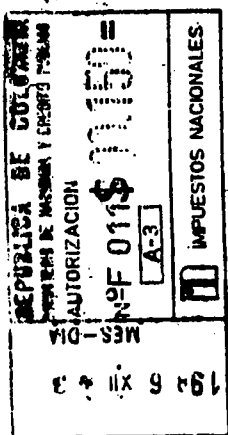
REINO DE LOS PAISES BAJOS

Legalización entre otros ex Sección 69 Código de Comercio. Yo, Pierre Henri Marie KEESOM, "Makelaar" (comerciante) en Marcas de la Corte de Apelaciones de Amsterdam, por el presente certifico que las firmas anteriores son las del señor Jan WERKMAN y del señor Jan Hilbrand Hendrick de CARPENTIER WOLF, procuradores de N.V. Organon.

(firmado). Keesom



En español, legalizaciones de la firma de Pierre Henri Marie Keesom, así como de la existencia legal de la sociedad N.V. Organon, y de las firmas de J. Werkman y J.H.H. de Carpentier Wolf, como sus representantes oficiales, hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Colombia, bajo el Número 184600, de fecha 2 de diciembre de 1986.



TIMBRE NACIONAL
CAVELIER - ABOGADOS

Adherida y debidamente anulada, estampilla del Servicio Exterior de Colombia, por un valor de Cinco pesos (\$5.00).

Pagado el Impuesto de Timbre, por máquina registradora, por un valor de Veinte pesos (\$20.00).

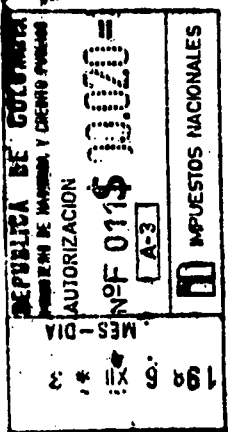
ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA del documento en referencia.

Bogotá, Diciembre 3 de 1986.

AG/c.

Alicia Groot

TRADUCCION OFICIAL No. 281/86
ALICIA GROOT
INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION No. 2195, ABRIL 17, 1969
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA.

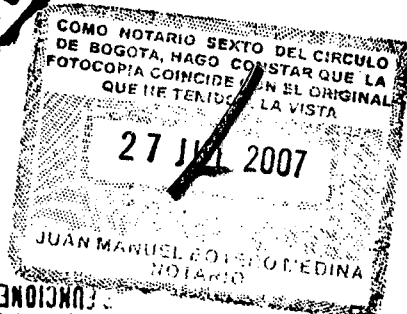


TIMBRE NACIONAL
CAVELIER - ABOGADOS

EL NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA QUE
AUTORIZA ESTE DOCUMENTO Y QUE
DICE Alicia Groot

ES AUTENTICA
BOGOTA D.C.

05 DIC 1986



JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

1986 MAR 8 A 11:49

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
FUNCIONES INDICADAS

221719

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 No. 72 - 35

BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com

E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

TELEFONO: (57) (1) 347-3611

TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señor Jefe de la

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E.

S.

D.

Poderdante: N.V. ORGANON

Poder conferido el: 05-11-86

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

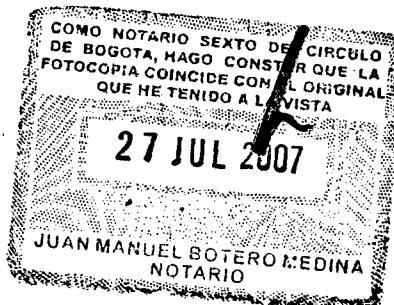
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. Nº 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén.



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Santafé de Bogotá D. C.

Ante mí **JUAN MANUEL BOTERO MEDINA**

10 JUN. 1998

Notario Sexto del Circuito de Bogotá

Conprodujeron personalmente,

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

quienes) exhibieron para la

2877924

438019

y la(s) Libreta(s) Militares:

880 = 832
31924

de militado(s) en Bogotá, y que en el presente documento se hace constar el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta escritura.

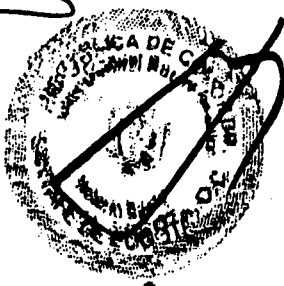
[Handwritten signature]

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADA A LA VISTA

27 JUL 2007

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

[Handwritten signature]



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 August 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/082184 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2006/050551

(22) International Filing Date: 31 January 2006 (31.01.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

05100688.0

1 February 2005 (01.02.2005) NL

(71) Applicant (for all designated States except US): N.V. ORGANON [NL/NL]; Kloosterstraat 6, NL-5349 AB Oss (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BOS, Ebo, Sybren [NL/NL]; P.O. Box 20, N.v. Organon, NL-5340 BH Oss (NL). DE KORT, Martin [NL/NL]; N.V. Organon, P.o.box 20, NL-5340 BH Oss (NL). SMIT, Meertinus, Jan [NL/NL]; P.O. Box 20, N.v. Organon, NL-5340 BH Oss (NL). VAN BOECKEL, Constant, Adriaan, Anton [NL/NL]; N.V. Organon, P.o. Box 20, NL-5340 BH Oss (NL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:

7 June 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CONJUGATES OF A POLYPEPTIDE AND A PENTASACCHARIDE

(57) Abstract: The present invention relates to conjugates of a polypeptide and an oligosaccharide, wherein the polypeptide is conjugated to at least one oligosaccharide-spacer residue, the oligosaccharide being a synthetic sulfated oligosaccharide comprising 4-18 monosaccharide units and per se having affinity to antithrombin III and the spacer being a bond or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, or a pharmaceutically acceptable salt thereof. The conjugates of the invention have improved pharmacokinetic properties when compared to the original polypeptides (i.e. the corresponding non-conjugated polypeptides per se).

WO 2006/082184 A3

CONJUGATES OF A POLYPEPTIDE AND AN OLIGOSACCHARIDE

The present invention relates to new conjugates of polypeptides and oligosaccharides, a process for their preparation, pharmaceutical compositions containing the compounds as active ingredients, as well as the use of said compounds for the manufacture of medicaments.

Recent developments of recombinant DNA techniques and advanced peptide synthetic methods have permitted the commercial production of medically useful quantities of therapeutic polypeptides. The short half-life of many therapeutic polypeptides, however, has historically posed a challenge to the administration of these compounds. There are several important polypeptide-based drugs currently in use which would benefit from increased half-life. Examples are erythropoietin, insulin, interferon α -2b, interferon β , interferon γ , granulocyte colony stimulating factor, human growth hormone, granulocyte macrophage colony stimulating factor, relaxin, urokinase, streptokinase, tissue plasminogen activator, calcitonin, interleukin-2 and tumor necrosis factor with half-lives (significantly) less than a few hours. Insulin, for example, has a half-life of only about 12 minutes in man. Other examples of polypeptides that are being developed as potential therapeutic agents but suffer from short half-lives are adrenomedullin, glucagon like peptide (GLP-1) and kisspeptin (metastin). Extending the half-life of therapeutic polypeptides can improve current treatment by allowing dosing amounts and frequency of dosing to be reduced (*Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* 2005, 8, 590-600).

Many proteins have already been subjected to studies aimed at extending the in vivo half-life employing e.g. adaptation by PEGylation (i.e. conjugation with a ~1-30 kDa polyethylene glycol-moiety; *Drug Discovery Today* 2005, 10, 1451-1458). Currently available are for example PEGylated analogs of insulin with an extended half-life. Beside the reduced clearance rate, important aspects of the latter insulin derivatives are the reduced immunogenicity (e.g. US 4,179,337) and increased solubility. Further, developments in PEGylation of insulin also led to physically and proteolytically more stable conjugates than native insulin (see for example WO 2004/091494, WO 2002/098232, US 2005/0152848).

PEGylated erythropoietin with a longer serum half-life is for example described in WO 2004/022577. It has further been found that by altered glycosylation of erythropoietin, the half-life increases. In addition, hyperglycosylated analogs of erythropoietin were reported to have

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 August 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/082184 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01)

(74) Agent: KRAAK, H.; P.O. Box 20, NL-5340 BH Oss (NL).

(21) International Application Number:
PCT/EP2006/050551

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 31 January 2006 (31.01.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
05100688.0 1 February 2005 (01.02.2005) NL

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): AKZO NOBEL N.V. [NL/NL]; Akzo Nobel N.V., Velperweg 76, NL-6824 BM Arnhem (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BOS, Ebo, Sybren [NL/NL]; P.O. Box 20, N.v. Organon, NL-5340 BH Oss (NL). DE KORT, Martin [NL/NL]; N.V. Organon, P.O. box 20, NL-5340 BH Oss (NL). SMIT, Meertinus, Jan [NL/NL]; P.O. Box 20, N.v. Organon, NL-5340 BH Oss (NL). VAN BOECKEL, Constant, Adriaan, Anton [NL/NL]; N.V. Organon, P.O. Box 20, NL-5340 BH Oss (NL).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CONJUGATES OF A POLYPEPTIDE AND AN OLIGOSACCHARIDE

(57) Abstract: The present invention relates to conjugates of a polypeptide and an oligosaccharide, wherein the polypeptide is conjugated to at least one oligosaccharide-spacer residue, the oligosaccharide being a synthetic sulfated oligosaccharide comprising 4-18 monosaccharide units and per se having affinity to antithrombin III and the spacer being a bond or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, or a pharmaceutically acceptable salt thereof. The conjugates of the invention have improved pharmacokinetic properties when compared to the original polypeptides (i.e. the corresponding non-conjugated polypeptides per se).

WO 2006/082184 A2

higher *in vivo* activity (WO 2000/24893). Other examples of PEGylated (poly)peptides with prolonged duration of action are glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (WO 2005/058954, WO 2004/093823; *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 377-382; *Biomaterials*, 2005, 26, 3597-3606), glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 4114-4117), calcitonin (*Pharm. Dev. Technol.* 1999, 4, 269-275) and octreotide (*Pharm. Res.* 2005, 22, 743-749).

Still, the use of PEG has limitations. PEG is obtained by chemical synthesis and, like all synthetic polymers, is polydisperse. This means that a batch of PEG consists of molecules having different numbers of monomers, resulting in a Gaussian distribution of the molecular weights. When a polypeptide is PEGylated, this leads to a collection of conjugates, which may have different biological properties, in particular in half-lives and immunogenicity. Reproducibility of the pharmacological activities of PEGylated polypeptides may therefore be a serious drawback of the technique. Also, it is known that PEGylation of proteins is often accompanied by loss of biological activity. Further, the use of PEG may cause problems relating to excretion from the body. At high molecular weights PEGs can accumulate in the liver, leading to macromolecular syndrome. Consequently, PEGylation of drugs should be performed with great care.

Similar results as with PEGylation were obtained by derivatization of polypeptides with polysaccharides, in particular with polysialic acid chains (e.g. WO 92/22331 and WO 2001/87922).

In JP 02/231077, heparin – superoxide dismutase (SOD) conjugates are described. Preferably, a number of heparin molecules are attached to SOD resulting in conjugates having a longer half-life than native SOD while retaining about 90 % of the enzymatic activity.

Other conjugates of polypeptides with increased half-life are exemplified by conjugated derivatives of insulin (WO 2003/013573, WO 05/012346) or GLP-1 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4395-4398) which bind to circulating serum albumin. The binding to serum albumin in those compounds is based in particular on hydrophobic interactions of the binding moiety within the conjugate with human serum albumin. The higher the hydrophobicity of that moiety, the stronger the binding affinity to human serum albumin. Although a wide range of binding moieties is suitable, a drawback of such conjugates is the low affinity and selectivity of the interaction of the conjugates with human serum albumin with as a result a poor predictability of the pharmacodynamic behavior. Alternatively, fusing the gene for human insulin directly to that for

human serum albumin results in a long-acting form of insulin that is active in reducing blood glucose levels for a prolonged period after subcutaneous administration (Duttaroy *et al. Diabetes* 2005, 54, 251-258). However, in this case the bioavailability of the fused polypeptide, as well as the binding affinity for the target receptor, is reduced.

- 5 Further, in WO 2000/40253 conjugates of, for instance, a peptide and, specifically, glycosaminoglycan chain(s) are disclosed, which are considered as synthetic proteoglycans. In those conjugates the pharmacological activity of the conjugated glycosaminoglycan has a significant impact on the therapeutic activity of the conjugates.

Also, oligosaccharides are attached to pharmaceutically active compounds in order to increase
10 the solubility thereof (WO 2004/03971).

The present invention relates to new conjugates of polypeptides with increased half-lives, being conjugates of a polypeptide and an oligosaccharide, wherein the polypeptide is conjugated to at least one synthetic sulfated oligosaccharide-spacer residue, the oligosaccharide comprising 4-18
15 monosaccharide units and *per se* having affinity to antithrombin III and the spacer being a bond or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Preferred oligosaccharides consist of 4-6 monosaccharide units and in particular preferred are pentasaccharides. The conjugates of the invention have improved pharmacokinetic properties - and thus improved pharmacological properties - when compared to
20 the original polypeptides (i.e. the corresponding non-conjugated polypeptides *per se*).

The present invention further relates to a novel technology based on a process for the preparation of a therapeutically active conjugate comprising a polypeptide and having negligible anti-thrombotic activity, comprising a step wherein a synthetic sulfated oligosaccharide, in
25 particular a pentasaccharide, which *per se* has affinity to antithrombin III (ATIII), is covalently attached to a polypeptide through a bond or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue.

ATIII is a serine protease inhibitor, present in blood plasma, which interrupts the coagulation cascade to provide a feed back loop. The half-life of a sulfated pentasaccharide is essentially
30 based on its affinity to ATIII (see *e.g.* F. Paolucci *et al. Clin. Pharmacokinet.* 2002; 41 Suppl. 2: 11-18). In the conjugates of this invention the serum half-life is longer than the half-life of the

original polypeptide as a result of the half-life of the pentasaccharide which largely accounts for the half-life of the conjugate. Furthermore, the conjugates of the invention not only have a longer half-life, but they also have tunable pharmacokinetic properties based on the specific interaction between the pentasaccharide part of the conjugate and ATIII (the latter interaction is described e.g. in Westerduin *et. al. Bioorg. Med. Chem.* 1994, 1267-1280; van Amsterdam *et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:495-503). In an embodiment of the present invention the oligosaccharide-polypeptide conjugate (the oligosaccharide in particular consisting of 4-6 monosaccharide units and most particularly being a pentasaccharide) has a circulating plasma level of ≤ 50 nM. Up to this concentration the ATIII-mediated anticoagulant activity of the oligosaccharide (in particular pentasaccharide) is insignificant in particular with respect to bleeding risks. (see for instance (1) F. Donat *et al., Clin. Pharmacokinet.* 2002; 41 Suppl. 2: 1-9; (2) S. J. Keam *et al. Drugs* 2002; 62 (11):1673-1685 and (3) The Rembrandt Investigators *Circulation* 2000; 102: 2726-2731). According to an embodiment of this invention, the oligosaccharide (in particular consisting of 4-6 monosaccharide units and most particularly being a pentasaccharide) used in the conjugates *per se* has an anticoagulant activity which is of subtherapeutic level when compared to the pharmacological activity of the polypeptide *per se*. Subtherapeutic in this respect means: having a lower than therapeutic effect and without side-effects, such as bleeding risks. For example, diabetes type 1 patients require (long half-life) insulin injections to complement (basal) therapeutic plasma levels of $\sim [0.1-1.0]$ nM, which is well in the subtherapeutic range of the pentasaccharides used in the present conjugates. A person skilled in the art will understand how to select conjugates with a proper balance between the therapeutic levels of the polypeptide and the pentasaccharide, respectively.

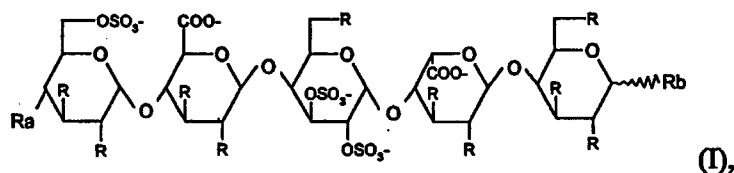
The polypeptides in the conjugates of the present invention retain their biological activity. Furthermore, the linear pharmacokinetic behavior of ATIII-bound pentasaccharide in the conjugates of this invention accounts for a highly predictable therapeutic effect of the conjugated polypeptides, since the conjugates remain largely in the intravascular compartment after i.v. or s.c. dosing.

The oligosaccharide residue in the conjugates of this invention is a residue from a synthetic sulfated oligosaccharide which *per se* has affinity to antithrombin III (ATIII). Sulfated oligosaccharides, and in particular pentasaccharides, generally have affinity to ATIII, however, a

person skilled in the art can easily check the affinity of an oligosaccharide to ATIII (van Amsterdam et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:495-503) and select the desired affinity level. Suitable synthetic oligosaccharide residues and in particular pentasaccharide residues may be derived from the oligo- and pentasaccharides disclosed in EP 0,454,220, EP 5 0,529,715, WO 98/03554, WO 99/36428, *J. Med. Chem.* 2005; 48, 349-352, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* 1994, 32,1671-1690 and the like.

The oligo- and pentasaccharide residues may be conjugated to the polypeptide directly or via a linking residue attached to any chemically suitable position within the pentasaccharide residue.

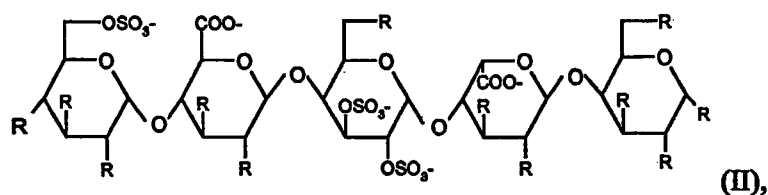
Therefore, in an embodiment of this invention the conjugates are conjugates wherein the oligosaccharide-spacer residue has the structure (I)



wherein one essentially pharmacologically inactive flexible linking residue is present and wherein R is independently OSO_3^- , (1-8C)alkoxy or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, and

15 Ra is independently OSO_3^- , (1-8C)alkoxy, an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue or an oligosaccharide residue, comprising 1 – 13 monosaccharide units, and Rb is independently (1-8C)alkoxy, an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue or an oligosaccharide residue, comprising 1 – 13 monosaccharide units, the charge being compensated by positively charged counterions.

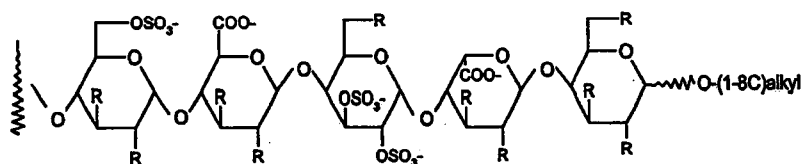
20 More preferred are conjugates wherein the oligosaccharide-spacer residue is a pentasaccharide-spacer residue having the structure (II)



wherein one essentially pharmacologically inactive flexible linking residue is present and wherein R is independently OSO_3^- or (1-8C)alkoxy, or an essentially pharmacologically inactive flexible

25 linking residue, the charge being compensated by positively charged counter ions.

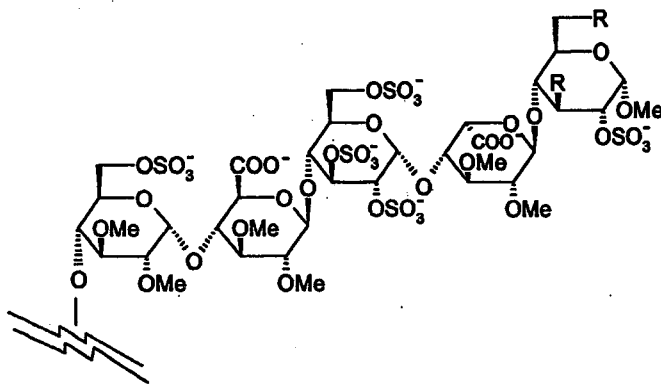
Further preferred are conjugates wherein the pentasaccharide residue has the structure (III)



(III),

wherein R is independently OSO_3^- or (1-8C)alkoxy, the charge being compensated by positively charged counterions.

Highly preferred compounds according to the invention are compounds wherein the pentasaccharide residue has the structure (IV)



(IV),

wherein R is independently OCH_3 or OSO_3^- , and in particular both R groups in (II) are OSO_3^- .

According to this invention, synthetic sulfated oligosaccharide residues, in particular pentasaccharide residues, with affinity to ATIII can be conjugated to any polypeptide. For example, the polypeptide can be a bioactive peptide (e.g., 3 to 50 amino acids in length) or can be a longer polypeptide that may or may not have catalytic activity. Non-limiting examples of bioactive peptides include neurotransmitters such as conantokin G, dynorphin, endorphin, enkephalin, or neurotensin; gastric activators such as bombesin, motilin, or gastrin; calcium regulators such as calcitonin or parathyroid hormone (PTH); bone resorption modulators such as osteoprotegerin (OPG); stimulators of osteoblastic activity such as adrenomedullin or truncated derivatives thereof such as ADM(27-52); hormones such as vasoactive intestinal polypeptide, corticotropin, secretin; hormone inhibitors such as somatostatin; hormone stimulators such as melanocyte stimulating hormone, luteinizing hormone releasing factor, or sermorelin; anti-diabetic agents such as glucagons, amylin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) or truncated derivatives thereof such as GLP-1(7-36), GLP-2, glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) or insulin ("Humulin," Eli Lilly); anti-infectives such as lysostaphin; appetite suppressing

hormones such as obestatin; vasoconstrictors such as angiotensin II; vasodilators such as bradykinin, substance P or kallidin; natriuretic agents such as atrial natriuretic polypeptide (ANP); antidiuretic hormones such as vasopressin or desmopressin; and oxytocic agents such as oxytocin. Additional examples of polypeptides that can be used include human growth hormone

5 ("Humantrope," Genentech); rLH; rG-CSF ("Neupogen," Amgen); erythropoietin ("Epogen," Amgen); interferon α - 2a, interferon α - 2b, interferon β , or interferon γ ; factor VIII or other blood clotting factors such as protein C or factor VIIa; follicle stimulating hormone (FSH); a cytokine such as an interleukin (IL) (e.g., IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, or -18); hemoglobin; superoxide dismutase; soluble CD4 or CD4 receptor; platelet GpIIb/IIIa

10 analogs and their receptors ("ReoPro," Johnson & Johnson); glucocerebrosidase ("Ceredase" or "Cerezyme," Genzyme); ACTH; somatotropin; parathyroid hormone, antidiuretic hormone; prolactin; rHGH, such as pegvisomant ("Somavert", Pfizer); GnRH agonists, such as leuprolide ("Lupron", "Leprorelin", Takeda) or nafareline ("Synarel", Roche) and GnRH antagonists, such as ganirelix ("Antagon", Organon); GHRH agonists, such as sermorelin ("Geref", Serono);

15 octreotide ("Sandostatin", Novartis); or thrombolytics such as streptokinase, staphylokinase, urokinase, or tissue plasminogen activator ("Activase," Genentech); metastin (KISS1 or kisspeptin-54) or truncated derivatives thereof such as kisspeptin-10.

Preferred polypeptides have a molecular weight of $\sim 0.3 - 50$ kDa. Other preferred polypeptides have a molecular weight of $\sim 0.3 - 20$ kDa. Also preferred are polypeptides which have a

20 molecular weight of $\sim 0.3 - 7.5$ kDa.

Further preferred polypeptides are insulin ($t_{1/2} = 12$ min; Mw = 5.8 kDa), calcitonin ($t_{1/2} = 20$ min; Mw = 3.4 kDa), GLP-1(7-36) ($t_{1/2} = 6$ min; Mw = 3.4 kDa), adrenomedullin ($t_{1/2} = 20$ min; Mw = 6.0 kDa), ADM(27-52) (Mw 3.0 kDa), octreotide ($t_{1/2} = 1.7$ h, Mw = 1.0 kDa), interleukin-2 ($t_{1/2} = 20$ min; Mw = 15 kDa) and ganirelix ($t_{1/2} = 12$ h; Mw = 1.6 kDa). In

25 particular preferred are insulin and [D-Ala⁶]-GLP-1(7-36). A further embodiment of this invention is a polypeptide conjugate monosubstituted with a pentasaccharide-spacer residue.

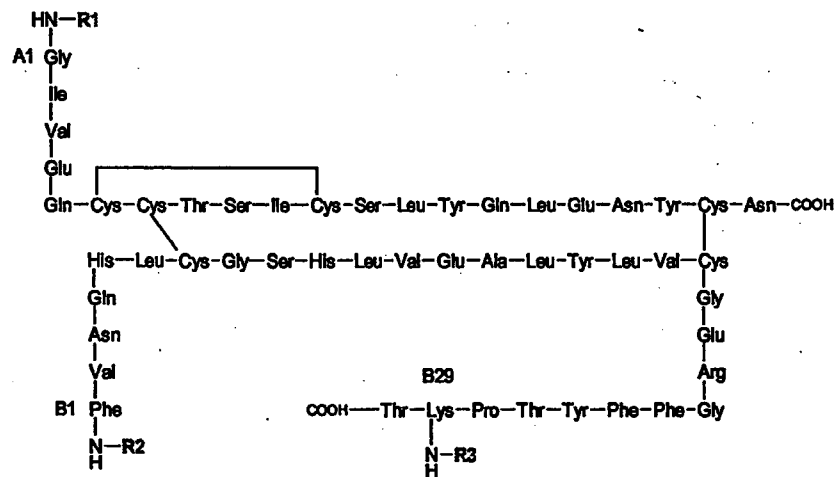
The spacer is a bond or an essentially pharmacologically inactive, flexible, linking residue. Preferably, the spacer is an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, in

30 particular having 10-50 atoms counted along the "backbone" of the spacer, the oxygen of the oligosaccharide residue not included. The term "essentially pharmacologically inactive" as used

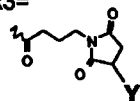
herein means that the spacer does not contain atoms or groups which show pharmacologically activity *per se* at the doses at which the compounds of the invention are therapeutically effective. Thus, at doses at which the compounds of the present invention are used as therapeutic drugs, the nature of the spacer does not lead to demonstrable pharmacological side-effects.

- 5 The spacer may comprise (somewhat) rigid elements, such as ring structures and unsaturated bonds. The spacer of the compounds of the invention is preferably flexible. Suitable spacers may easily be designed by a person skilled in the art. For synthetic reasons longer spacers are considered less suitable, however, longer spacers may still successfully be applied in the compounds of the present invention. Preferred spacers comprise at least one $-(CH_2CH_2O)-$
- 10 element.

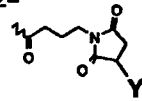
Representative examples of the conjugates of the present invention are conjugates of the following structures:



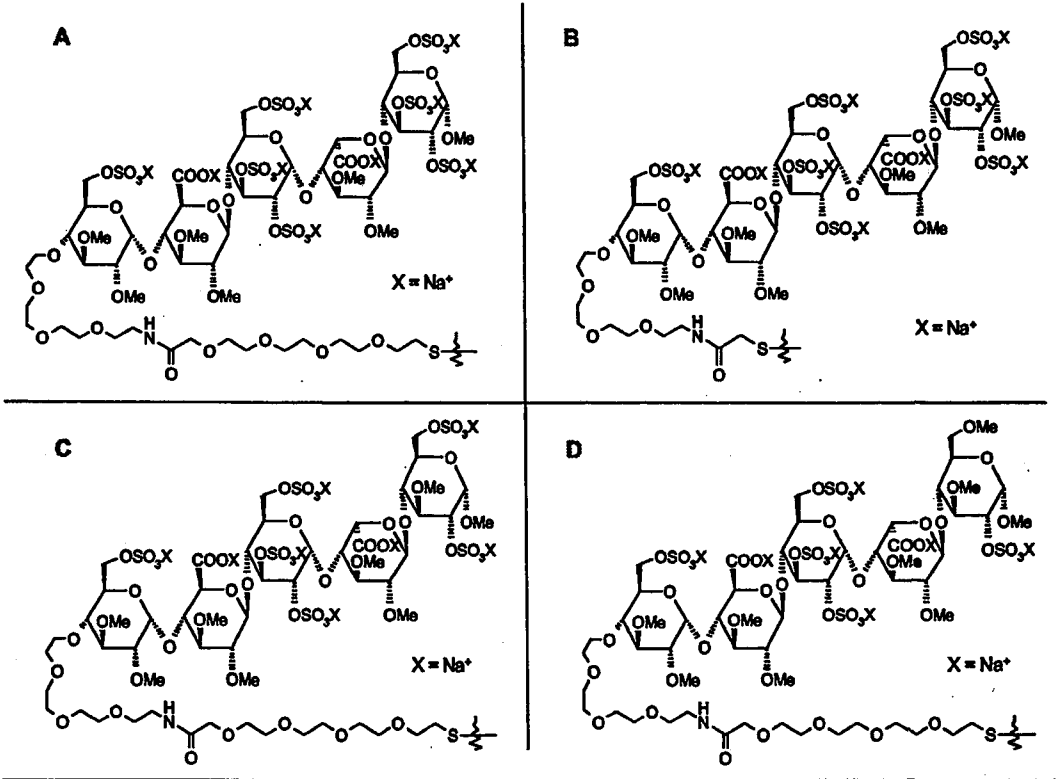
wherein R1=R2=H, R3=



or wherein R1=R3=H, R2=



and wherein Y is selected from structures A, B, C and D



or other salts thereof, but also conjugates wherein the spacer is a different one or is attached to the pentasaccharide at another position. Preferred is the sodium salt. And preferably, Y is selected from structures A and B.

5 Commonly used chemical abbreviations that are not explicitly defined in this disclosure may be found in The American Chemical Society Style Guide, Second Edition, American Chemical Society, Washington, DC (1997), "2001 Guidelines for Authors" *J. Org. Chem.* 66(1), 24A (2001), "A Short Guide to Abbreviations and Their Use in Polypeptide Science" *J. Polypeptide Sci.* 5, 465-471 (1999).

10 The term polypeptide refers to a chain of at least three amino acids, regardless of post-translational modifications. Polypeptides can be naturally occurring, chemically synthesized, or recombinantly produced polymers of amino acids. Polypeptides that have three to 50 amino acids typically are classified as peptides.

The phrase "polypeptide with catalytic activity" means an enzyme.

15 The term insulin as used herein refers to the naturally occurring hypoglycemic polypeptide found in mammals, including humans, rat, guinea pig, and rabbits, as well as to recombinant insulin and similar hypoglycemic polypeptides disclosed in US patents 4,652,525, 4,431,740, 5,268,453, 5,506,202, 5,514, 646, and 5,700,662.

In the description of the conjugates of the invention further the following definitions are used.

20 The terms (1-4C)alkyl and (1-8C)alkyl mean a branched or unbranched alkyl group having 1-4 and 1-8 carbon atoms, respectively, for example methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, hexyl and octyl. Methyl and ethyl are preferred alkyl groups.

The term (1-8C)alkoxy means an alkoxy group having 1-8 carbon atoms, the alkyl moiety having the meaning as previously defined. Methoxy is a preferred alkoxy group.

25 The spacer length is the number of atoms of the spacer, counted along the shortest chain between the oligosaccharide residue and the polypeptide, not counting the oxygen atom of the oligosaccharide residue which is connected to the spacer.

An embodiment of this invention is further a process for the preparation of a therapeutically
30 active conjugate comprising a polypeptide, the conjugate having negligible anti-thrombotic activity, wherein the conjugate has a longer plasma half-life than the original polypeptide while

the biological activity is essentially retained, comprising a step wherein a synthetic sulfated oligosaccharide, in particular wherein the oligosaccharide consists of 4-6 monosaccharide units, and most particularly being a sulfated pentasaccharide, *per se* having affinity to antithrombin III is attached to the polypeptide, optionally through an essentially pharmacologically inactive
5 flexible linking residue.

General synthetic and analytic aspects

Synthesis of pentasaccharides

10 The ATIII-binding oligosaccharide, in particular pentasaccharide, of the compounds of the present invention can be prepared as described for instance in *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* 1994, 32,1671-1690. Different oligo- and pentasaccharides with altered affinity for ATIII may be obtained by varying the intermediate mono-, di- or tetrasaccharide building blocks, for instance, by introduction of (permanent) alkyl groups or application of different (temporary) protecting
15 groups giving access to differently sulfated oligo- and pentasaccharides in a controlled fashion (e.g. Westerduin *et al. Bioorg. Med. Chem.* 1994, 1267). The spacer may be introduced as described for instance in WO 2001/42262. The oligo- and pentasaccharide-spacer molecule may further be derivatised with linking residues such as the gamma-maleimido butyryl (GMB) group, the *N*-hydroxysuccinimide (NHS) group or optionally protected thiol group (e.g. *Angew. Chem.*
20 *Intl. Ed. Engl.* 1996, 35, 331-333) to allow direct coupling with an optionally modified polypeptide.

Conjugation

In general, the conjugates of the invention are produced according to a process comprising (a)
25 an optional step wherein the polypeptide is adapted for conjugation, and (b) a coupling step wherein the optionally adapted polypeptide is reacted with an oligo- or pentasaccharide-spacer molecule.

General synthetic methods for the production of bioconjugates are described in "Bioconjugate Techniques" by Greg T. Hermanson, 1996, Academic Press. In addition, for conjugation may be
30 considered a Staudinger ligation (such as described by K.L. Kiick *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002; 99:19-24) or a Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition using a pentasaccharide derivative and

polypeptide independently modified with an alkyne or azide functional group. Alternatively, enzymatic reactions such as the regioselective IgA protease mediated elongation of polypeptides at the N-terminus (as described by M. Lewinska *et al.* in *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 231-234) or the transglutaminase catalyzed introduction of amino spacer containing oligosaccharides (as described by M. Sato *et al.* in *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14013-14022) can be adapted for conjugation of a pentasaccharide spacer residue to an optionally modified polypeptide.

Further, PEGylation of for instance insulin, GLP-1 and octreotide is well documented. In these proteins, a ~5-30 kDa PEG-moiety can be introduced without abolishing their biological activities; such strategies may be followed for the (site-specific) introduction of a pentasaccharide(spacer)-moiety. Furthermore, it is a prerequisite that binding of the pentasaccharide-conjugate to ATIII (~50 kDa) has no substantial deleterious effect on the biological activity of the polypeptide.

Insulin: The N-terminal B-1 and near C-terminal B-29 Lysine amino functions are not essential for the bioactivity of insulin. B1-PEGylated insulin has been prepared (S.W. Kim *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.* 2002, 54, 505-530) in 20% overall yield via reaction of a N-hydroxysuccinimide (NHS) activated PEG derivative with di-N-Boc-protected insulin. Similar reaction of a bifunctional coupling reagent such as N-maleimidobutyryloxy succinimide ester (GMBS) gives access to B1-modified insulin pentasaccharide conjugates. Alternatively, the B29 Lys residue of unprotected Zn²⁺-insulin can be selectively modified with an excess of NHS ester at pH ~10-11 in ~60% yield. Other well established methods for the regioselective conjugation to insulin may be adapted from WO 98/02460, WO 2004/091494, WO 2005/012346, US2005/0152848, Jensen *et al.* *J. Pept. Sci.* 2005, 11, 339-346, Lee *et al.* *Bioconj. Chem.* 2005, 16, 615-620, Jain *et al.* *Biochim. Biophys. Act.* 2003, 1622, 42-49, Tessmar *et al.* *Tissue Engin.* 2004, 10, 3, 441-453).

Ganirelix: NHS ester derivatives of a pentasaccharide can be conjugated to the free N-terminal amino group of de-N-Ac ganirelix or an amino spacer containing pentasaccharide derivative can be conjugated, optionally via an additional spacer, to the free terminal carboxylic acid group of desamido ganirelix which can in turn be obtained by advanced (solid phase) peptide synthesis as described for instance in *J. Med. Chem.* 1992, 35, 3942-3948.

Octreotide: The N-terminal D-Phe amino acid residue of octreotide, a commercially available peptide, can be modified with up to 5 kDa PEG without abolishing the bioactivity (D. Hee *et al.* *Pharm. Res.* 2005, 22, 743-749). Regiospecific functionalization of the N-terminal amino group

can be achieved with an excess of bifunctional NHS ester linking reagent at pH ~6, upon which further conjugation to a carrier pentasaccharide can be effected according to general synthetic methods for the production of bioconjugates as described above (e.g. by conjugation of a pentasaccharide spacer residue containing a thiol group to a maleimide derivative of octreotide).

5 *ADM(27-52)* : The N-terminal half of full length adrenomedullin (ADM) is not essential for its osteogenic activity and inhibitory effect on vascular calcification. Regiospecific conjugation of a pentasaccharide-spacer residue to the N-terminal Ala residue of ADM(27-52) can be achieved by synthesizing optionally N-terminally modified ADM(27-52) using well established methods employing solid phase peptide synthesis and general synthetic methods for the production of
10 bioconjugates as described above.

[D-Ala⁸]-GLP-1(7-36): The C-terminal portion of GLP-1(7-36) and its derivatives such as Exendin-4(1-39) form an α -helical structure in which amino acid residues are exposed that are important for receptor binding. Extension of this amino acid sequence with an additional lysine residue that is modified at the N^ε-position with a maleimide function, using an adapted solid
15 phase peptide synthesis as described for instance in WO 2005/058954, still exhibits receptor binding and *in vivo* functional activity after covalent binding to the Cys³⁴ amino acid of human serum albumin, while the proteolytic stability may (further) be improved by incorporating a D-Ala residue at position 2 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4395-4398). In a similar manner GLP-1(7-36) or analogues thereof can be conjugated to a suitably functionalized
20 pentasaccharide-spacer moiety (e.g. containing a thiol group). Alternatively, a Cys amino acid can be incorporated in the peptide sequence, preferably at position(s) 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 34, 35 or 36 or added at position 37, and which may be coupled to a suitably functionalized pentasaccharide-spacer moiety (e.g. containing a maleimide group), using methods similar as described for the PEGylation of GLP1 derivatives (WO 2004/093823).
25 Furthermore, conjugates of GLP-1 may be obtained by direct coupling to a bifunctional NHS ester linking reagent to GLP-1, followed by separation of the positional isomers (as described for instance for the direct PEGylation of GLP-1 by Lee *et al.* *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 377-382) and coupling to a suitably functionalized pentasaccharide-spacer moiety.

Interleukin-2 (IL-2): the free Cys¹²⁵ amino acid of commercially available native recH-IL2, or
30 free (additional) Cys amino acids of IL2 muteins that are still biologically active, can be reacted

with a pentasaccharide-spacer moiety containing a maleimide group according to a similar protocol as described for the PEGylation of IL2 (US 5,206,344) with PEG-maleimide.

The peptide coupling, a possible procedural step in the above described method to prepare the compounds of the invention, can be carried out by methods commonly known in the art for the coupling - or condensation - of peptide fragments such as by the azide method, mixed anhydride method, activated ester method, the carbodiimide method, or, preferably, under the influence of ammonium/uronium salts like TBTU, especially with the addition of catalytic and racemisation suppressing compounds like N-hydroxysuccinimide, N-hydroxybenzotriazole and 7-aza-N-hydroxybenzotriazole. Overviews are given in The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, E. Gross and J. Meienhofer, eds. (Academic Press, New York, 1981) and Peptides: Chemistry and Biology, N. Sewald and H.-D. Jakubke (Wiley-VCH, Weinheim, 2002).

Amine functions present in the compounds may be protected during the synthetic procedure by an N-protecting group, which means a group commonly used in peptide chemistry for the protection of an α -amino group, like the *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) group, the benzyloxycarbonyl (Z) group, the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group or the phthaloyl (Phth) group, or may be introduced by demasking of an azide moiety. Overviews of amino protecting groups and methods for their removal is given in the above mentioned The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3 and Peptides: Chemistry and Biology.

The compounds of the invention, which may occur in the form of a free base, may be isolated from the reaction mixture in the form of a pharmaceutically acceptable salt. The pharmaceutically acceptable salts may also be obtained by treating the free base of formula (I) with an organic or inorganic acid such as hydrogen chloride, hydrogen bromide, hydrogen iodide, sulfuric acid, phosphoric acid, acetic acid, propionic acid, glycolic acid, maleic acid, malonic acid, methanesulphonic acid, fumaric acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, ascorbic acid and the like.

The compounds of this invention or intermediates thereof may possess chiral carbon atoms, and may therefore be obtained as a pure enantiomer, or as a mixture of enantiomers, or as a mixture

containing diastereomers. Methods for obtaining the pure enantiomers are well known in the art, e.g. crystallization of salts which are obtained from optically active acids and the racemic mixture, or chromatography using chiral columns. For diastereomers straight phase or reversed phase columns may be used.

5

Physico- and biochemical analysis

Several techniques to monitor the effect of the reaction with bifunctional linkers and/or reactive pentasaccharide-moieties on the bioactivity of the protein are available. In this respect, biomolecular interaction analysis (BIA), using soluble receptor molecules as complementary
10 binding agents (insulin) and determination of enzyme activity are valuable tools. Binding studies of the pentasaccharide-conjugate to ATIII can be included in these assays as well.

Ion exchange, size exclusion chromatography and ATIII affinity chromatography are available methods for subfractionation of the pentasaccharide conjugates, while electrophoresis techniques are suitable for orthogonal, qualitative and quantitative characterization (e.g. SDS-PAGE, CZE).
15 Conjugation sites can be identified by MALDI-TOF MS analysis and N-terminal sequencing of the conjugates.

Pharmacokinetic (PK) studies

20 PK studies to determine the *in vivo* half-life of the unmodified polypeptide and the corresponding pentasaccharide conjugates can be carried out in rats. Several options are available, e.g. radiolabeling with ¹²⁵I employing Iodogen or lactoperoxidase ionisation to induce electrophilic substitution or using Bolton-Hunter reagent as labeling moiety and determining gamma-radiation in plasma samples. Other methods known in the art are based on injection of unlabeled
25 conjugates followed by immunochemical analysis through ELISA or Luminex technology.

Pharmacological evaluation

The pharmacological effects of conjugation of polypeptides of the invention to an ATIII binding
30 pentasaccharide can be studied in *in vitro* assays and *in vivo* animal models as described below.

18

Insulin is a 5.8 kDa protein consisting of two peptide chains which are held together by two disulfide bridges. Site-specific chemical modification at one of the Lys ϵ -amino or *N*-terminal α -amino groups is well documented. The effect of conjugation of a pentasaccharide to insulin can be studied by analyzing serum samples for glucose, insulin and C-peptide content (a biomarker to correct for endogenous insulin secretion). A glucometer and human insulin and C-peptide radioimmunoassays are commercially available. *In vivo* effects of insulin on the blood glucose levels can be measured in rats or Beagle dogs.

The pharmacological *in vitro* and *in vivo* effects of pentasaccharide conjugation of the decapeptide mimetic GnRH antagonist ganirelix can be studied in established assays and animal models. Advanced polypeptide synthesis will deliver a well-defined molecule of which the effects can be compared to ganirelix blocking oocyte maturation and ovulation in mouse and rat. Comparison of biological half-life of ganirelix and its pentasaccharide-conjugated counterpart may for instance be studied by determining at which time after administration the natural process of maturation and ovulation has restored.

GLP-1(7-36) is a well known and well studied insulinotropic endocrine hormone inducing numerous biological effects such as stimulating insulin secretion, inhibiting glucagon secretion, gastric or intestinal motility, enhancing glucose utilization and inducing weight loss. It is rapidly degraded by dipeptidyl peptidase IV (DPPIV). The latter premature degradation may for instance be circumvented by replacement of the amino acid residue at position 8 (*e.g.* by D-alanine). Other approaches such as modification with large fatty acid chains or PEG have resulted in biologically active GLP-1 or analogs thereof (as defined in *e.g.* WO 2004/093823). The (additional) stabilizing effect of conjugating an optionally modified GLP-1(7-36) derivative to a carrier pentasaccharide can be studied by measuring the stability of the conjugate *in vitro* in the presence of DPPIV and *in vivo* by measuring the plasma half life using immunochemical analysis. The functional activity of the GLP-1 pentasaccharide conjugate can be determined *in vitro* by measuring the ability to bind to and activate the GLP-1 receptor and *in vivo* pharmacodynamic effects can be studied by analyzing serum samples for glucose and insulin.

Adrenomedullin is a 52-amino acid polypeptide with numerous biological functions such as vasodilation, bronchodilation, neurotransmission, growth regulation and regulation of bone formation. The truncated fragment ADM(27-52) lacks the structural requirements for vasodilator activity but is still able to stimulate the growth of cultured rat osteoblasts in a dose-dependent manner (*Regulatory Peptides* 2003, 112, 79-86). In addition, it was recently established that ADM(27-52) inhibits vascular calcification in rats (*Regulatory Peptides* 2005, 129, 125-132) and may thus have potential therapeutic application in the prevention of artery calcification. The effect of conjugating ADM(27-52) to a carrier pentasaccharide may be assessed by well established assays, measuring the *in vitro* osteogenic activity in cultures of actively growing fetal rat osteoblasts or the *in vivo* increase in index of bone formation (without affecting bone resorption).

Octreotide is a synthetic octapeptide analogue of somatostatin and is clinically used for the treatment of acromegaly and certain endocrine tumors. It has been shown that long acting depot formulations (e.g. Sanostatin LAR depot, Novartis Pharma, Basel, Switzerland) are at least as effective in the lowering of plasma growth hormone and insulin-like growth factor (IGF-I) levels compared with three-daily subcutaneous injections. The effect of conjugation of octreotide to a pentasaccharide on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties can be studied in male rats by using established radio immunoassays to determine levels of conjugated octreotide and altered levels of IGF-I.

Interleukin-2 (IL-2) is a protein produced naturally in the body by white blood cells (T-lymphocytes) and is an important protein of the immune system. It is commercially available (Aldesleukin, Proleukin®, Chiron, U.S.) as a drug and is used in the treatment for some types of cancer (hairy cell leukemia) and is used in conjunction with anti-HIV therapy to induce increases in CD4 cell counts. The specific bioactivity of pentasaccharide-IL-2 conjugates can be determined *in vitro* using the IL-2 cell proliferation bioassay described by Gillis et al. (*J. Immunol.* 1978, 120, 2027-2032).

30 Pharmaceutical formulations

19

The conjugates of the invention may be administered enterally or parenterally. The exact dose and regimen of these compounds and compositions thereof will necessarily be dependent upon the biological activity of the polypeptide *per se*, the needs of the individual subject to whom the medicament is being administered, the degree of affliction or need and the judgment of the medical practitioner. In general, parenteral administration requires lower dosages than other methods of administration which are more dependent upon absorption. However, the daily dosages are for humans preferably 0.0001-1 mg per kg body weight, more preferably 0.001-0.1 mg per kg body weight.

The medicament manufactured with the compounds of this invention may also be used as adjuvant in therapy. In such a case, the medicament is administered with other compounds useful in treating such disease states.

Mixed with pharmaceutically suitable auxiliaries, *e.g.* as described in the standard reference, Gennaro *et al.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th ed., Mack Publishing Company, 1990, see especially Part 8: Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture) the compounds may be compressed into solid dosage units, such as pills, tablets, or be processed into capsules or suppositories. By means of pharmaceutically suitable liquids the compounds can also be applied in the form of a solution, suspension, emulsion, *e.g.* for use as an injection preparation, or as a spray.

For making dosage units, *e.g.* tablets, the use of conventional additives such as fillers, colorants, polymeric binders and the like is contemplated. In general any pharmaceutically acceptable additive which does not interfere with the function of the active compounds can be used.

Suitable carriers with which the compositions can be administered include lactose, starch, cellulose derivatives and the like, or mixtures thereof, used in suitable amounts. When administration is intravenous, pharmaceutical compositions may be given as a bolus, as two or more doses separated in time, or as a constant or non-linear flow infusion. Thus, compositions of the invention can be formulated for any route of administration.

Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent, a stabilizing agent, and a local anesthetic such as lidocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients will be supplied either separately, *e.g.* in a kit, or mixed together in a unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate. The composition may

be stored in a hermetically sealed container such as an ampule or sachette indicating the quantity of active agent in activity units. Where the composition is administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade "water for injection," saline, or other suitable intravenous fluids. Where the composition is to be administered by
5 injection, an ampule of sterile water for injection or saline may be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration. Pharmaceutical compositions of this invention comprise the compounds of the present invention and pharmaceutically acceptable salts thereof, with any pharmaceutically acceptable ingredient, excipient, carrier, adjuvant or vehicle.

10 Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention pertains. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described in this document. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned
15 herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

The invention is further illustrated by, but not limited to, the following examples. It will be
20 understood that various modifications may be made with different pentasaccharides, spacers and polypeptides without departing from the spirit and scope of this invention.

Legends to the figures.

25 Figure 1.

Recognition of pentasaccharide-insulin conjugate 6 (Insulin-penta) by insulin-specific ELISA.

Figure 2A.

Biomolecular interaction analysis of pentasaccharide(PS)-insulin conjugate 6.

30 Reaction of immobilized anti-insulin antibody with insulin conjugate with subsequent binding to human insulin receptor.

Figure 2B.

Biacore analysis of pentasaccharide(PS)-insulin conjugate 6.

Reaction of immobilized anti-insulin antibody with insulin conjugate with subsequent binding of

5 human ATIII.

Figure 3.

MALDI-TOF analysis of monosubstituted pentasaccharide-insulin conjugate 6.

10

Figure 4.

HP-SEC analysis of monosubstituted pentasaccharide-insulin conjugate 6 on Superdex 30.

Figure 5.

15 hATIII binding of reference pentasaccharide-spacer residues 7, 8 and 9 (BIA study).

Figure 6.

hATIII binding of insulin-pentasaccharide conjugates 24, 28 and 29 (BIA study).

20 **Figure 7.**

Mass spectrometric analysis (ESI-QTOF) of insulin-pentasaccharide conjugate 24

Figure 7A.

Comparison of an experimentally determined and calculated typical isotope distribution of an
25 insulin-pentasaccharide conjugate (ESI-QTOF, M^{5+} , compound 24)

Figure 8.

hATIII binding of compounds 31, 32, 36, 37 (Biacore study).

30 **Figure 9.**

hATIII binding of compound 39 (as determined by BIA).

Figure 10.

hATIII binding profile of compound 41 (as determined by BIA).

5 Figure 11.

hATIII binding profile of compound 44 (as determined by BIA).

Figure 12.

SDS-PAGE and Western blot analyses of compound 47

10

Figure 13.

Mean plasma levels (mean $\pm$ s.e.m.) determined by measurement of the insulin concentration after i.v. administration of 3.5 nmol/kg recH insulin (open circles) or pentasaccharide-insulin conjugate 6 (triangles).

15

Figure 14.

Mean plasma levels (mean $\pm$ s.e.m.) expressed as % of the concentration measured at T=1 minute after i.v. administration of 125 I-labeled conjugate 29 (open squares), 24 (open circles) and 28 (open triangles) and of recH insulin itself (closed bullets).

20

Figure 15.

Mean plasma levels (mean $\pm$ s.e.m.) expressed as % of the concentration measured at T=1 minute after i.v. administration of 125 I labeled conjugate 31 (open squares) and 32 (closed triangles). (Data not corrected for dehalogenation).

25

Figure 16.

Mean plasma levels (mean $\pm$ s.e.m.) expressed as % of the concentration measured at T=1 minute after i.v. administration of 125 I labeled conjugate 39 (open squares) and of 125 I labeled ADM(27-52) (closed triangles). (data not corrected for dehalogenation).

30

Figure 17.

Mean plasma levels (mean $\pm$ s.e.m.) expressed as % of the concentration measured at T=1 minute after i.v. administration of 125 I labeled conjugate 41 (closed triangles) and of 125 I labeled GLP-1 (open squares).

5 **Figure 18.**

Detection of the pentasaccharide-insulin conjugate 6-ATIII complex with anti-human and anti-rabbit ATIII antibodies.

Figure 19.

- 10 Mean glucose levels (mean $\pm$ s.e.m.) after i.v. administration of 7 nmol/kg pentasaccharide-insulin conjugate 6 (open triangles) or 3.5 nmol/kg recH-insulin (open circles).

Figure 20.

- 15 Mean glucose levels (mean $\pm$ s.e.m.) after i.v. administration of 12 nmol/kg pentasaccharide-insulin conjugate 26 (closed triangles) or 24 (closed circles) compared to the glucose levels after treatment with 9 nmol/kg recH-insulin (open circles).

Figure 21.

- 20 Mean glucose levels (mean $\pm$ s.e.m.) after i.v. administration of 24 nmol/kg pentasaccharide-insulin conjugate 27 (closed squares) or 25 (closed diamonds) compared to the glucose levels after treatment with 9 nmol/kg recH-insulin (open circles) or 48 nmol/kg of Insulin Detemir (open triangles).

Figure 22.

- 25 Mean glucose levels (mean $\pm$ s.e.m.) after i.v. administration of 24 nmol/kg pentasaccharide-insulin conjugate 24 (closed triangles), 28 (closed circles) or 29 (closed squares) compared to the glucose levels after treatment with 9 nmol/kg recH-insulin (open circles) or 24 nmol/kg of Insulin Detemir (open diamonds).

EXAMPLES

Abbreviations used:

	ACN	acetonitrile
5	AcOH	acetic acid
	ADM	adrenomedullin
	(h)ATIII	(human) anti-thrombin III
	AUC	area under the curve
	BIA	biomolecular interaction analysis
10	Boc ₂ O	di-tert-butyl dicarbonate
	Cl	clearance
	DCCI	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
	DIPEA	diisopropylethylamine
	DMF	N,N'-dimethylformamide
15	DMSO	dimethyl sulfoxide
	EDTA	ethylenediamine tetra-acetate
	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
	Equiv.	equivalents
	ESI	electron spray ionization
20	GLP-1	glucagon-like peptide 1
	GMB	gamma-maleimidobutyl
	GMBS	gamma-maleimidobutyric acid N-hydroxy succinimic ester
	HBS-EP	hepes buffered saline containing EDTA and polyethylene glycol
	HPLC	high performance liquid chromatography
25	HP-SEC	high performance size exclusion chromatography
	HRP	horse-radish peroxidase
	i.v.	intravenous
	IL-2	interleukin-2
	MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
30	MoAb	monoclonal antibody
	MRT	mean residence time

	MS	mass spectrometry
	NMM	N-methyl morpholin
	NMR	nuclear magnetic resonance
	PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
5	PBS	phosphate-buffered saline
	PS	pentasaccharide
	Q-TOF	quadropole time of flight
	rech	recombinant human
	RT	room temperature
10	Rt	retention time
	SDS	sodium docecyl sulfate
	TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborate
	TCA	trichloroacetic acid
	TEA	triethylamine
15	TFA	trifluoroacetic acid
	THF	tetrahydrofuran
	Vss	volume of distribution at steady state

Materials and methods

20 ¹H-NMR spectra were recorded at 400 MHz on a Bruker DRX-400 (ultra shield). Chemical shifts in organic solvents are reported in ppm (δ) relative to tetramethylsilane.

DMF, 1,4-dioxane, NMM, ammonium acetate, Boc₂O, TFA, DMSO, DCCI (Acros), hydroxylamine (50 wt. % in H₂O), iodoacetic anhydride, GMBS (Sigma Aldrich), rech insulin (Diosynth), TEA, 6-aminocaproic acid, N-hydroxysuccinimide (Janssen), THF (Biosolve), 2-
 25 mercapto-[S-acetyl]acetic acid N-hydroxysuccinimide ester (13), TBTU (Fluka), ACN (Merck), AcOH and Na₂HPO₄ (J.T. Baker) were used as received from the commercial suppliers mentioned.

Column chromatography was performed on MP Biomedicals Germany GmbH kieselgel 60 (MP silica 32-63, 60 Å) and on Merck LiChroprep RP-18 (40-63 μ m). TLC analysis was performed
 30 on Merck TLC plates kieselgel 60 F₂₅₄. Compounds were visualized by UV absorption (254 nm) and/or charring with USUI reagent (phosphor molybdenic acid/ AcOH/ H₂SO₄ in EtOH).

MALDI spectra were obtained with a Voyager DE PRO (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) in linear, delayed extraction mode in positive and negative ion mode. Re-crystallized alpha-cyano hydroxy cinnamic acid (CHCA, 3 g/L in 500 mL/L ACN /1 mL/L TFA) was used as matrix. Molecular weights were measured using a two point calibration (e.g. by assigning recH insulin and one of its fragment chains, or myoglobin at m/z 16953 and m/z 8477).

Q-TOF spectra were obtained with a PE Sciex API Q-star Pulsar in positive ion mode with an ESI-source. Samples were dissolved in H₂O and desalted by use of reversed phase Zip Tip®.

Default analytical HPLC was conducted on a Gilson 234 autosampler with three Gilson pumps (305) gradient system using a Luna™ C18(2) column (reversed phase, 150 x 4.6 mm, 5 µm). A Gilson UV detector (118) was used for detection at 210 nm. Gradient elution was performed at a column temperature of 40 °C and a flow rate of 1 mL/min by starting with 95% of eluent A (0.1% TFA in H₂O/ACN, 9:1) and 5% eluent B (0.1% TFA in ACN) for 5 min., then applying a linear gradient from 15 to 50% ACN in 25 min.

Analytical (HPLC) analysis of compound 4 was conducted on a Shimadzu SCL-10A vp (system controller) two way pump gradient system using a Luna™ C18(2) column (reversed phase, 150 x 2.0 mm, 5 µm). A Shimadzu diode array UV detector (SPD-M10A vp) was used for detection at 214 nm. Gradient elution was performed at a column temperature of 40 °C and a flow rate of 0.4 mL/min.

Preparative HPLC was conducted on a Waters 2769 sample manager with a single pump (Waters 600) gradient system using a Luna™ C18(2) column (reversed phase, 250 x 50 mm, 10 µm). A Gilson UV detector (2996, photodiode array) was used for detection at 210 nm. Gradient elution was performed at a flow rate of 50 mL/min by starting with 90% eluent A (0.1% TFA in H₂O/ACN, 9:1) and 10% eluent B (0.1% TFA in ACN) for 10 min., then applying a linear gradient from 15 to 50% eluent B in 50 min.

Analytical anion exchange chromatography was conducted on a Pharmacia Akta Explorer with a Pharmacia pump (P-900) gradient system using a Pharmacia Biotech MonoQ HR 5/5 column. A Pharmacia UV detector (UV 900) was used for detection at 210 nm in combination with a Pharmacia pH and conductivity detector (pH/C 900). An AD detector (AD900) was used in combination with a Chiralysers (IBZ). Furthermore a Pharmacia fraction collector (Frac 950) and a Pharmacia autosampler (A 900) were used. Default elution was performed with a flow rate of

1 mL/min starting with 74% eluent A (ACN/H₂O 2:8) and 26% eluent B (ACN/2M NaCl 2:8) for 5 min. and then applying a gradient to 20% eluent A and 80% eluent B in 15 min.

Preparative anion exchange chromatography was conducted on a Pharmacia system with a Pharmacia pump (P-50) and a Pharmacia gradient mixer (LKB GP-10) gradient system using a Pharmacia Biotech XK16 Q-sepharose Fast-Flow column. A Pharmacia UV detector (LKB-UV-MII) was used for detection at 214 nm in combination with a Biotechnics conductivity detector. Default gradient elution was performed at a flow rate of 4.6 mL/min by starting with 80% eluent A (H₂O) and 20% eluent B (2M NaCl in H₂O) for 20 min., then applying a gradient to 20% eluent A and 80% eluent B in 210 min..

10 Preparative gel filtration on Sephadex G25 (desalting) was conducted on a Pharmacia system with a Watson-Marlow pump (101V) using a Pharmacia Biotech XK26 Sephadex-G25 fine column. A Pharmacia UV detector (LKB-UV-MII) was used for detection at 214 nm in combination with a Biotechnics conductivity detector. Isocratic elution was performed with H₂O at a flow rate of 1 mL/min H₂O for 10 h.

15 Analytical HP-SEC with compound 6 was carried out on a Pharmacia Superdex™ 30 HR 10/30 column mounted in a HP1100 chromatography system. Elution was performed with 0.2 mol/L sodium phosphate buffer pH 7.0 at a flow rate of 0.4 mL/L.

Analytical HP-SEC with the other conjugates was conducted on the Akta Explorer system as described for the analytical Q-sepharose chromatography, with a Pharmacia Superdex™ 75 HR 10/30 column. An isocratic elution was performed with 50 mM ammonium acetate at a flow rate of 1 mL/min.

20 Preparative HPSEC was conducted on the same Akta Explorer system as described for the analytical Q-sepharose chromatography, with a Pharmacia Superdex™ 75 XK26 Hiload 26/60 prep-grade column. An isocratic elution was performed with 50 mM ammonium acetate at a flow rate of 1.32 mL/min.

Binding studies of pentasaccharide conjugates to ATIII, anti-insulin antibody and insulin receptor were performed using BIAtechnology. The sensorgrams and report points were analysed with blanc flow cell subtraction using BIAevaluation 3.2. IC₅₀ values were calculated using graphpad Prism 3.0.

30 A₂₈₀ measurements were performed on a Nano Drop® ND-1000 UV-VIS spectrophotometer.

EXAMPLE 1**6-(2-Iodo-acetylamino)-hexanoic acid (2)**

To a suspension of 6-amino-hexanoic acid (1) (0.37 g, 2.8 mmol) in 1,4-dioxane (60 mL) was
5 added iodoacetic anhydride (0.50 g, 1.4 mmol). The reaction mixture was stirred at 50°C for 3 h
and for 16 h at ambient temperature after which TLC analysis (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH, 98/10/1,
v/v/v) revealed complete conversion of compound 1 into a less lypophilic product. EtOAc (100
mL) was added and the reaction mixture was washed with 0.10 M aqueous HCl solution (50
mL). The organic layer was then washed twice with brine (50 mL) and the combined water
10 layers were extracted twice with EtOAc (75 mL). The combined organic layers were dried
(MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel
(CH₂Cl₂/MeOH/AcOH, 98/10/1, v/v/v) to give 6-(2-iodo-acetylamino)-hexanoic acid (2) (0.45
g, >100%). ¹H NMR (MeOD): δ 3.67 (s, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.29 (t, 2H), 1.66-1.33 (m, 6H).

15

EXAMPLE 2**6-(2-Iodo-acetylamino)-hexanoic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester (3)**

To a solution of 6-(2-iodo-acetylamino)-hexanoic acid (2) (0.20 g, 0.67 mmol) in THF (10 mL)
20 was added N-hydroxysuccinimide (85 mg, 0.74 mmol) and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (0.21
g, 1.0 mmol). The reaction mixture was stirred in the dark for 16 h. When TLC analysis
(EtOAc/Hep/AcOH, 80/20/1, v/v/v) revealed complete conversion into the activated ester 3,
seven drops of acetic acid were added. The mixture was then stored in the freezer overnight (-20
°C). The crude mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude
25 product was purified by column chromatography (EtOAc/Hep/AcOH, 40/60/5 → 20/80/5,
v/v/v) and concentration of the appropriate fractions gave N-hydroxysuccinimide ester derivative
3 (0.18 g, 67%). ¹H NMR (MeOD): δ 3.67 (s, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.63 (t, 2H), 2.0-
1.0 (m, 6H).

EXAMPLE 3**Compound 4**

To a suspension of recH insulin (50 mg, 8.6 μ mol) in DMF (15 mL) was added H₂O (9.0 mL) until the solution became clear. The solution was stirred for 15 min. to adjust to room temperature. The pH of the solution was adjusted to 10 by adding dropwise 0.1 M NaOH in H₂O. After this, the reaction flask was wrapped in tin foil. A solution of 3 (5.0 mg, 8.6 μ mol) in DMF (1.0 mL) was added dropwise to the reaction mixture in 1 min. The reaction mixture was stirred by using a magnetic stirring bar and the pH was kept at 10. After 30 min an excess of 0.1% TFA in H₂O (5.0 mL) was added to quench the reaction. H₂O (200 mL) was added and the reaction mixture was lyophilised to give 4 (60 mg, >100%, max. 8.6 μ mol). HPLC (Shimadzu, reversed phase) analysis by starting with 80% eluent A (0.1% TFA in H₂O) and 20% eluent B (ACN) for 5 min., then applying a gradient to 20% eluent A and 80% eluent B in 30 min. revealed the presence of 45% of the monosubstituted product (recH insulin Rt: 12.84 min; compound 4 Rt: 13.54 min; B29/A1 disubstituted product: Rt 14.16 min). The crude product was used without purification in the next reaction.

EXAMPLE 4**Compound 6**

Crude compound 4 (60 mg) was dissolved in a degassed (by passing through N₂) 0.05 M solution of NH₂OH in 0.1 M Na₂HPO₄ buffer (25 mL, pH 7.0). The reaction mixture was stirred by using a magnetic stirring bar and degassed for 30 min (by passing through N₂). Then the pentasaccharide-spacer compound 5 (95 mg, 43 μ mol), which was prepared as described in *Angew. Chem. Intl. Ed.* (1996), 35, 331-333, was added as a solid and the reaction mixture was stirred under a nitrogen atmosphere for 16 h.

Purification of the pentasaccharide-insulin conjugate 6.

From the reaction mixture of the previous paragraph, monosubstituted pentasaccharide-insulin conjugate 6 was purified to near homogeneity by anion exchange chromatography (capture step) and size exclusion chromatography (polishing step).

5

The conjugate-containing solution was applied on a Q-Sepharose FF column, equilibrated in 20 mmol/L sodium phosphate buffer PH 8.0. After the unretained protein fraction had passed the column, an extensive wash with equilibration buffer was carried out until the A_{280} had returned to baseline level. Bound, unreacted insulin was eluted at around 0.4 mol/L NaCl and the
10 monosubstituted pentasaccharide-insulin conjugate at 0.7 mol/L NaCl as determined by analytical HP-SEC on Superdex 30 and MALDI-TOF-MS. The conjugate fraction was concentrated either by ultrafiltration or anion exchange chromatography using a 2 mol/L NaCl bump as elution step and was applied on a preparative Superdex 30 column equilibrated in phosphate-buffered saline. Fractions containing pure monoconjugate as determined by HP-SEC
15 and MALDI-MS were pooled. The final product was stored at -70°C after snapfreezing in an ethanol/dry ice mixture. The conjugate concentration was estimated by A_{280} measurement using an absorbance coefficient of 0.8 for 1 mg/mL.

Characterization of compound 6

20 The identity of the purified pentasaccharide-insulin conjugate 6 was determined by an ELISA for insulin and by Biomolecular Interaction Analysis (BIA) using the human insulin receptor and human ATIII as analytes. Purity and monomericity were assessed by HP-SEC on Superdex 30 and MALDI-MS.

As is shown in Fig. 1, two batches of pentasaccharide-insulin conjugate 6 are recognized by the
25 insulin-specific ELISA, which demonstrates the presence of an immunoreactive insulin moiety. From BIA experiments in the Biacore it can be concluded that pentasaccharide-conjugated insulin is still able to bind to the human insulin receptor (Fig. 2A). In these experiments a MoAb to human insulin (clone M3222213, 10-130, batch 223, Fitzgerald Industries International, designated MoAb 13) was immobilized on a CM5 sensor chip using standard amino coupling.
30 HBS-EP (Biacore, cat. No. 22-0512-44) was used as running buffer at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Injection of the insulin conjugate resulted in binding of the conjugate to the immobilised

antibody. The immunobound insulin conjugate was able to react with the human insulin receptor as well as with ATIII, the latter being indicative for a covalently attached pentasaccharide (Fig. 2B).

5 MALDI-TOF spectra of the pentasaccharide-insulin conjugate 6 were obtained as described under Materials and Methods. Prior to analysis, the samples were desalted and concentrated on μ C18-ZipTips (Millipore Corporation, Billerica MA, USA). Elution was directly onto a stainless steel MALDI target in 1 μ L of a solution containing 10 g/L alpha-cyano in 500 mL/L ACN/ 1 mL/L TFA. Fig. 3 represents a typical MALDI-TOF MS profile of a monosubstituted
10 pentasaccharide-insulin conjugate with peaks around m/z 6700 and 7400. The apparent heterogeneity is caused by laser-induced desulfatation of the pentasaccharide moiety resulting in a serial loss of 80 Da. No disubstituted pentasaccharide-insulin conjugate was found in the MALDI-TOF MS analysis since no peaks in the range of m/z 9400 characteristic of disubstituted insulin were found. It should be noticed that also peaks for unreacted insulin are absent (m/z
15 5808).

HP-SEC analysis (Fig. 4) shows a major peak with a retention time of 22 min. The purity was estimated at 97%. (Unreacted insulin and disubstituted conjugate appear to be absent).

20 EXAMPLE 5

Compound 11

Pentasaccharide 7 (46 mg) [which may be obtained by coupling of the derivatised monosaccharide 5, described in WO 2001/42262, with the tetrasaccharide that was obtained by
25 conducting the synthetic route towards tetrasaccharide 30 described in *Bioorg. Med. Chem.* (1994), 2, 1267-1280 in which the reducing end monosaccharide building block 12 was replaced with methyl 2,3-di-O-benzyl-6-O-methyl- α -D-glucose, using methods similar to those described in these publications, including deprotection and sulfation] and glycol derivative 10 (18 mg, 1.6 equiv.) were dissolved in DMF (5 mL) under a nitrogen atmosphere. NMM (61 μ L, 5 equiv.)
30 was added and the reaction mixture was stirred overnight at ambient temperature. The solvent was evaporated *in vacuo* and the remaining residue was purified by preparative anion exchange

27

chromatography. The appropriate fractions were combined and desalted on a preparative G25-column. The combined fractions were lyophilized to give 11 (29 mg, 57%) as a white powder. Purity >98% (analytical anion exchange, UV_{210nm}). ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz, HH-COSY): δ 5.31 (d, 1H), 5.23 (m, 1H), 4.91 (m, 1H), 4.45-4.35 (m, 1H), 4.48-3.93 (m, 11H), 3.87-3.62 (m, 9H), 3.60-3.45 (m, 39H), 3.41-3.34 (m, 15H), 3.33-3.23 (m, 7H), 3.18-3.08 (m, 2H), 2.97 (t, 2H), 2.23 (s, 3H).

EXAMPLE 6

Compound 12

10 Pentasaccharide 8 (0.2 g), which was prepared as described in WO 2001/42262, and glycol derivative 10 (53 mg, 1.3 equiv.), which was prepared as described in *Angew. Chem. Intl. Ed.* (1996), 35, 331-333, were dissolved in DMF (5.0 mL). NMM (61 µL, 5 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred overnight at ambient temperature. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by preparative anion exchange chromatography. The
15 appropriate fractions were combined and desalted on a preparative G25-column. The combined fractions were lyophilized to give 12 (0.13g, 55%) as a white powder. Purity >95% (analytical anion exchange, UV_{210nm}). ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz, HH-COSY): δ 5.12 (d, 1H), 5.03 (d, 1H), 4.70 (d, 1H), 4.34-4.18 (m, 2H), 4.09-4.03 (m, 1H), 3.98-3.90 (m, 5H), 3.85-3.74 (m, 6H), 3.66-3.48 (m, 7H), 3.43-3.24 (m, 41H), 3.23-3.15 (m, 13H), 3.12 (m, 2H), 3.10-3.01 (m, 7H), 2.99-2.88 (m, 3H), 2.78
20 (t, 2H), 2.04 (s, 3H).

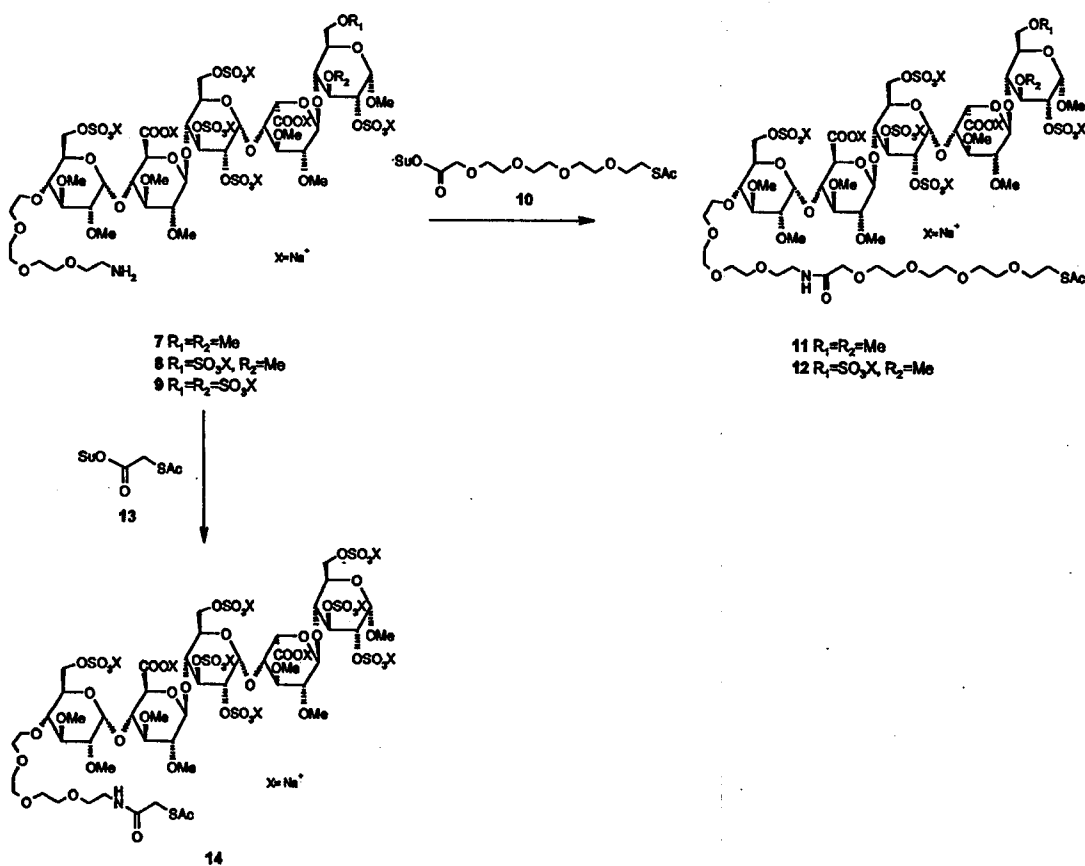
EXAMPLE 7

Compound 14

25 Pentasaccharide 9 (100 mg) [which may be obtained by coupling of the derivatised monosaccharide 5 described in WO 01/42262 with the tetrasaccharide 48 described in US 2004/0024197 using methods similar to those described in these patent applications, including deprotection and sulfation] and compound 13 (18 mg, 1.5 equiv.) were dissolved in DMF. NMM (15 µL, 2.5 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred overnight at ambient
30 temperature. The solvent was evaporated *in vacuo* and the remaining residue was purified on a preparative G25-column. The appropriate fractions were combined and lyophilized to give 14 (84 mg, 79%) as a white powder. Purity: >95% (analytical anion exchange, UV_{210nm}). ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz, HH-COSY): δ 5.12 (d, 1H), 5.09 (d, 1H), 4.82 (d, 1H), 4.40-4.26 (m, 1H), 4.10-3.87

(m, 8H), 3.82-3.73 (m, 4H), 3.67-3.43 (m, 11H), 3.41-3.35 (m, 14H), 3.31-3.26 (m, 13H), 3.24-3.15 (m, 8H), 3.14-3.02 (m, 5H), 3.01-2.87 (m, 3H), 2.08 (s, 3H).

5 *Scheme 3. Synthesis of pentasaccharide spacer derivatives 11, 12 and 14.*



EXAMPLE 8

Compound 15

RecH insulin (779 mg) was dissolved in anhydrous DMSO (25 mL) and AcOH (465 μ L). Boc₂O (73 mg, 2.5 equiv) was added to the solution and the resulting mixture was stirred for 5 h at ambient temperature. The reaction was quenched by the addition of 0.1% TFA in H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) and the solution was lyophilized four times. The residue was dissolved in 0.1% TFA in H₂O/ACN (9/1)/ACN (3:1) and the main product was isolated by preparative HPLC. The appropriate fractions were combined and lyophilized to give A1,B1-diBoc insulin 15 (200 mg, 26%) as a white powder. Purity: 98% (analytical HPLC). MS calcd. for C₂₆₇H₃₉₉N₆₅O₈₁S₆ = 6008, found on MALDI-TOF 6008 (using recH insulin as internal reference standard).

EXAMPLE 9

Compound 16

RecH insulin (752 mg) was dissolved in anhydrous DMSO (20 mL) and TEA (0.75 mL). Boc₂O (66 mg, 2.5 equiv.) in DMSO (5 mL) was added to the solution, and the reaction was stirred at ambient temperature for 1.5 h. The reaction was quenched by addition of 0.1% TFA in H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) and the mixture was lyophilized three times. The resulting residue was dissolved in 0.1% TFA in H₂O/ACN (9/1) and was subjected to preparative HPLC. The appropriate fractions were combined and lyophilized to give A1,B29-diBoc insulin 16 as a white powder (332 mg, 43%). Purity: >98% (analytical HPLC). MS calcd. for C₂₆₇H₃₉₉N₆₅O₈₁S₆ = 6008, found on MALDI-TOF 6008 (using recH insulin as internal reference standard).

EXAMPLE 10

Compound 17

A1,B1-diBoc insulin 15 (200 mg) was dissolved in anhydrous dimethyl sulfoxide (5 mL) and triethylamine (145 μ L). GMBS (45 mg, 5 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at ambient temperature. The reaction mixture was quenched by the addition of 0.1%

TFA in H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) and the resulting mixture was lyophilized to give A1,B1-diBoc-B29-GMB insulin 17 (0.5 g, crude), which was used in the next step without further purification.

5 EXAMPLE 11

Compound 18

A1,B29-diBoc insulin 16 (330 mg) was dissolved in anhydrous DMSO (5 mL) and TEA (332 μ L). GMBS (230 mg, 15 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at
10 ambient temperature. The reaction mixture was quenched by the addition of 0.1% TFA in H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) and the resulting solution was lyophilized to give A1,B29-diBoc-B1-GMB insulin 18 (0.6 g, crude), which was used in the next step without further purification.

EXAMPLE 12

15 Compound 19

A1,B1-diBoc-B29-GMB insulin 17 (0.5 g, crude) was dissolved in TFA (5 mL) and stirred for 10 min at ambient temperature. The TFA was removed under reduced pressure, the residue was dissolved in 0.1% TFA in H₂O/ACN (2/1, v/v) and the solution immediately subjected to
20 preparative HPLC. The appropriate fractions were combined and lyophilized to give B29-GMB insulin 19 as a white powder (93 mg, 47%). Purity >99% (analytical HPLC).

EXAMPLE 13

Compound 20

25

A1,B29-diBoc-B1-GMB insulin 18 (0.6 g, crude) was dissolved in TFA (5 mL) and the mixture was stirred for 10 min at ambient temperature. The TFA was evaporated *in vacuo*, the crude product was dissolved in 0.1% TFA in H₂O/ACN (9/2, v/v) and the resulting solution was immediately subjected to preparative HPLC. The appropriate fractions were combined and
30 lyophilized to give B1-GMB insulin 20 as a white powder (127 mg, 40%). Purity >99%

analytical HPLC). MS calcd. for $C_{267}H_{399}N_{65}O_{81}S_6$ = 5973, found on MALDI-TOF 5973 (using recH insulin as internal reference standard).

EXAMPLES 14-19

5 General procedure for the conjugation of GMB-insulin with pentasaccharide

GMB-insulin 19 or 20 (25 mg) was dissolved in a 0.1 M Na_2HPO_4 buffer (12 mL, pH 7.0, degassed by passing N_2 through the solution). The solution was stirred by using a magnetic stirring bar and was degassed for another 30 min.. Then pentasaccharide 5, 11, 12 or 14 (23 mg, 2.5 equiv.) was added as a solid, followed by the addition of NH_2OH (50 μ L, 0.05M). The reaction mixture was stirred under a nitrogen atmosphere at ambient temperature. After 16 hours the reaction mixture was subjected to preparative HPSEC (S75). The appropriate fractions were combined and lyophilized to give insulin-penta conjugates 24, 25, 26, 27, 28, 29 as a white powder in a typical yield of 30%-50%. Yields were determined by A_{280} measurements using the same molar extinction coefficient as for recH insulin.

15

EXAMPLE 14

Compound 24

B29-GMB insulin 19 (25 mg) was conjugated to pentasaccharide 5 (23 mg) according to the general procedure to give B29-pentasaccharide insulin derivative 24 (15 mg, 45%). ESI-MS calcd. for $C_{320}H_{487}N_{67}O_{137}S_{14}$ = 7913, found on Q-TOF 2638.7 M^{3+} ; 1979.2 M^{4+} ; 1583.6 M^{5+} , 1319.8 M^{6+} . Purity: >98% (analytical HPSEC, analytical anion exchange).

20

EXAMPLE 15

25 Compound 25

B1-GMB insulin 20 (25 mg) was conjugated to pentasaccharide 5 (23 mg) according to the general procedure to give B1-pentasaccharide insulin derivative 25 (16 mg, 47%). ESI-MS calcd. for $C_{320}H_{487}N_{67}O_{137}S_{14}$ = 7913, found on Q-TOF 2637 M^{3+} ; 1978 M^{4+} ; 1583 M^{5+} . Purity: >95% (analytical HPSEC), >98% (analytical anion exchange).

30

EXAMPLE 16**Compound 26**

B29-GMB insulin 19 (13 mg) was conjugated to pentasaccharide 14 (12 mg) according to the
5 general procedure to give B29-pentasaccharide insulin derivative 26 (5 mg, 31%). ESI-MS
calcd. for $C_{312}H_{471}N_{67}O_{133}S_{14}$ = 7737, found on Q-TOF 2578 M^{3+} ; 1934 M^{4+} . Purity: >98%
(analytical HPSEC).

EXAMPLE 17**10 Compound 27**

B1-GMB insulin 20 (15 mg) was conjugated to pentasaccharide 14 (13 mg) according to the
general procedure to give B1-pentasaccharide insulin derivative 27 (8 mg, 40%). ESI-MS calcd.
for $C_{312}H_{471}N_{67}O_{133}S_{14}$ = 7737, found on Q-TOF 2578 M^{3+} ; 1934 M^{4+} . Purity: >98% (analytical
15 HPSEC).

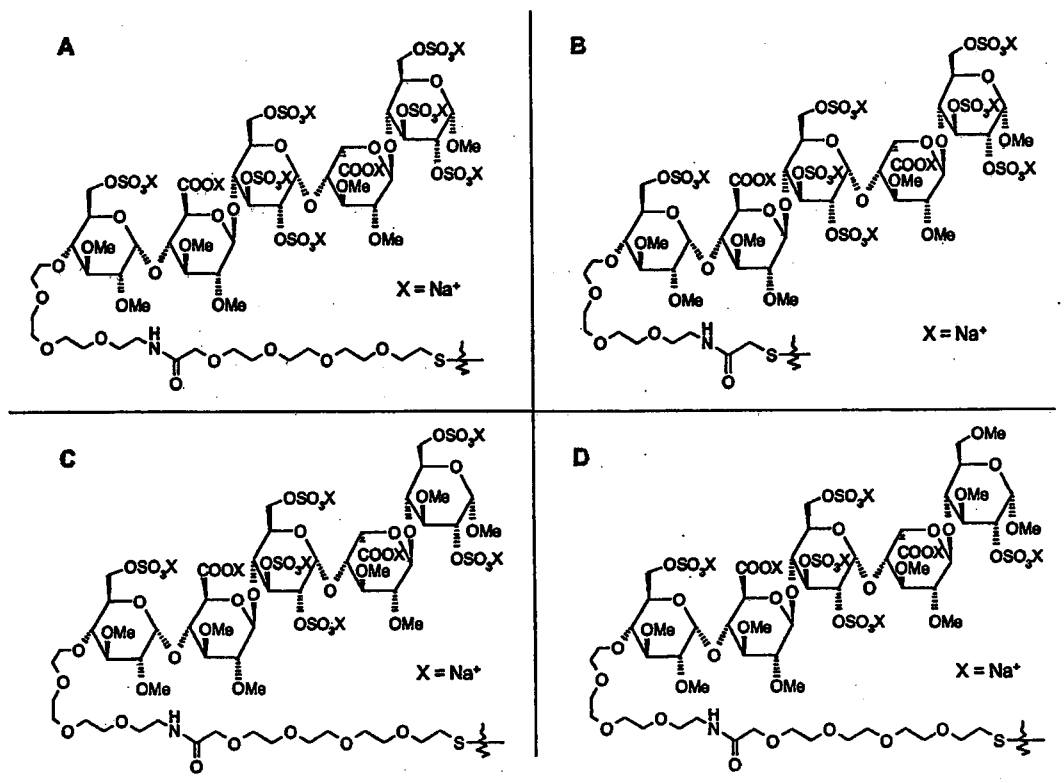
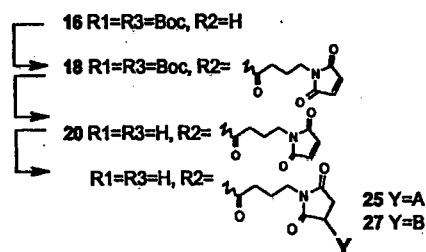
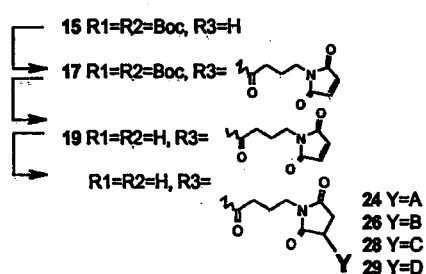
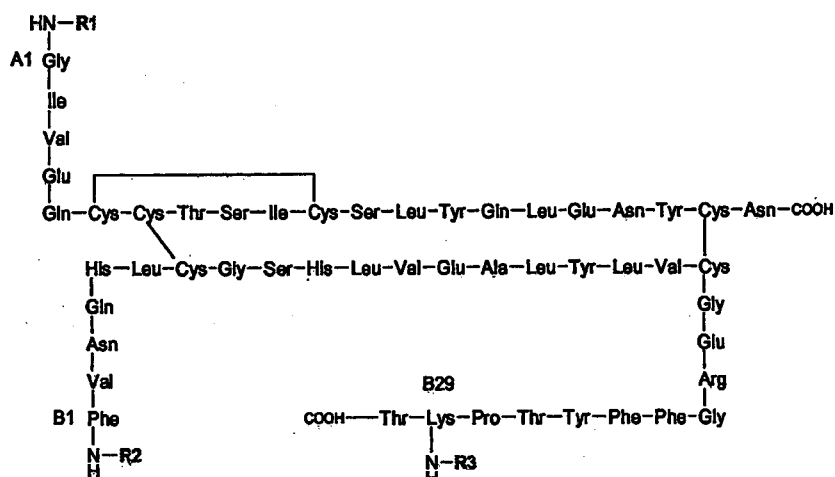
EXAMPLE 18**Compound 28**

B29-GMB insulin 19 (15 mg) was conjugated to pentasaccharide 12 (13 mg) according to the
20 general procedure to give B29-pentasaccharide insulin derivative 28 (6 mg, 30%). ESI-MS
calcd. for $C_{321}H_{489}N_{67}O_{134}S_{13}$ = 7847, found on Q-TOF 1962 M^{4+} ; 1570 M^{5+} ; 1308 M^{6+} . HPSEC
purity: >98%.

EXAMPLE 19**25 Compound 29**

B29-GMB insulin 19 (15 mg) was conjugated to pentasaccharide 11 (13 mg) according to the
general procedure to give B29-pentasaccharide insulin derivative 29 (7 mg, 33%). ESI-MS
calcd. for $C_{322}H_{491}N_{67}O_{131}S_{12}$ = 7782, found on Q-TOF 2593 M^{3+} ; 1945 M^{4+} ; 1556 M^{5+} . Purity:
30 >98% (analytical HPSEC).

Scheme 4. Synthesis of insulin-pentasaccharide conjugates 24-29



Characterisation

Analytical size exclusion chromatography

5 Compounds **24-29** were subjected to analytical HP-SEC analysis on a Superdex 75 26/10 column. Elution was performed with 50 mM ammonium acetate at a flow rate of 1.0 mL/min.

Table 1. HPSEC analyses of insulin conjugates 24-29

Compound	HPSEC (Superdex 75)	
	Rt	Purity
24	12.7 min	>98%
25	12.5 min	>95%
26	12.7 min	>98%
27	12.5 min	>98%
28	12.7 min	>98%
29	12.8 min	>98%
recH insulin	15.0 min	>98%

10 All conjugates were observed as single peaks (at least >95% purity) illustrating the absence of aggregated forms of insulin-pentasaccharide.

N-Terminal sequence analysis

15 The insulin-pentasaccharide conjugates **24-29**, as well as the corresponding precursors **15, 16, 19 and 20** were subjected to *N*-terminal sequence analysis (Edman degradation). In each of the cycles carried out, the B29 substituted insulin derivatives **15, 19, 24, 26, 28 and 29** yielded equimolar amounts of both A- and B-chain amino acids to a level comparable with that of the initial amounts of the conjugates. This indicates full accessibility of both N-termini and thus absence of conjugate moieties which are therefore confined to the B29 position. In contrast, only
20 A chain amino acids were found during N-terminal sequencing of the B1-substituted insulin derivatives **16, 20 , 25 and 27**, demonstrating conjugation at the B1 position with as a consequence inhibition of Edman degradation at the N-terminus of the B-chain.

Competitive hATIII binding assay using Biomolecular Interaction Analysis

Principle and aim of the test: Biomolecular Interaction Analysis (BIA) studies the interaction between (bio)molecules by covalent immobilisation of one of the interactants to a sensor chip surface, and injection of the other interactant in the continuous buffer flow over this surface. Binding is registered as a change in refractive index on this surface and is proportional to the molecular weight (Mw) of the interactants.

To study the interaction between hATIII and pentasaccharide conjugates, compound 9 is covalently coupled to the sensor chip surface. Binding of hATIII to the pentasaccharide generates a strong signal as a resultant of the difference in Mw between the bound (small) pentasaccharide ligand and the (large) hATIII analyte. Preincubated samples containing a constant concentration of hATIII and variable concentrations of free pentasaccharide or conjugate were injected over the surface. Binding of pentasaccharide or conjugate to ATIII during preincubation will result in a reduction of ATIII binding to the immobilised pentasaccharide. This competitive binding assay allows determination of IC₅₀ values for each pentasaccharide conjugate.

Experimental procedure: Compound 9 is covalently coupled to a CM5 sensor chip by amine coupling at pH 8.5. The sensor chip is activated by EDC/NHS for 15 min. and subsequently compound 9 is injected at a concentration of 100 µg/mL. The unreacted hydroxysuccinimide groups are reacted with ethanolamine for 7 min.. The surface is regenerated by three short injections of 5 µL 5 mol/L NaCl, at a flow rate of 25 µL/min. Immobilisation of the pentasaccharide can not be detected, however, binding of hATIII to a surface treated as described was found specific, demonstrating the presence of pentasaccharide on the surface.

A concentration series of hATIII was tested to estimate a sensitive concentration for inhibition (at 80% of maximum binding). At a flow rate of 20 µL/min three minute injections were carried out at both blank and immobilised surface in series at 25°C. A report point is generated at 170 s. The surface is regenerated by a 12s injection of 5 mol/L NaCl.

The samples were tested against a constant concentration of hATIII (i.e. 15 nmol/L) and concentrations of pentasaccharide conjugate ranging between 0.78-100 nM. The hATIII injection or report point without pentasaccharide conjugate is set at 100% binding. The relative % binding of the pentasaccharides and the conjugates compared to maximum binding was used

to generate a sigmoidal curve (with variable slope) by plotting Log [concentration] vs % binding from which the IC₅₀ values were derived.

Table 2. IC₅₀ values expressing ATIII binding potential in a competitive binding assay (BIA study)

Compound	BIA (competitive ATIII binding)	
	IC ₅₀	95% confidence interval
7 (reference)	96 nM	53.1 – 173 nM
8 (reference)	58 nM	33.7 – 99.1 nM
9 (reference)	5.5 nM	5.1 – 5.8 nM
24	8.5 nM	7.9 – 9.3 nM
25	9.1 nM	8.2 – 10.0 nM
26	4.5 nM	4.2 – 4.7 nM
27	15 nM	13.3 – 17.0 nM
28	96 nM	50.6 – 183 nM
29	68 nM	33.9 – 137 nM

Conclusion – The difference in IC₅₀’s between the reference carrier pentasaccharides 7-9 (Fig. 5, Table 2) confirms that their competitive binding potential to ATIII, a measure for the binding affinity for ATIII, can be tuned by changing the number of sulfate groups contained in these molecules. The (competitive) binding potential (IC₅₀) of all corresponding insulin-pentasaccharide conjugates (24-29) to hATIII fall in the same range when compared to the parent reference pentasaccharides 7-9 (Fig. 6, Table 2). These data indicate that the pharmacokinetic properties of the conjugates may be tuned by using alternative carrier pentasaccharides with different binding affinity for ATIII.

Mass Spectrometry

A typical mass spectrometric analysis of a pentasaccharide conjugate is depicted in Fig. 7. For instance, compound 24 with the bruto formula C₃₂₀H₄₈₇N₆₇O₁₃₇S₁₄ and a calculated mono isotopic mass of 7913, has been analysed with an ESI-QTOF system. In the ESI-MS spectrum multiple charged ions at m/z ratios 1319.8 (6+), 1583.6 (5+), 1979.2 (4+), 2638.7 (3+) in line with the charge distribution of rech insulin have been encountered. In addition, the isotope

32

distribution of a randomly selected multiple charged peak (e.g. 5+) for $C_{320}H_{487}N_{67}O_{137}S_{14}$ (compound 24) is in agreement with the theoretically calculated isotope distribution with the programme Isopro (see dotted lines in Fig. 7A).

5 **General procedure for the conjugation of GnRH antagonistic decapeptides with pentasaccharide (EXAMPLES 20, 21, 24, 25)**

Ganirelix-derivative 30 or 35 (70 mg) was dissolved in DMF (20 mL) under a nitrogen atmosphere. TBTU (14 mg, 1.05 equiv.) and NMM (25 μ L, 5 equiv.) were added and the mixture was stirred for 1 hour at ambient temperature. Pentasaccharide 8 or 9 (88 mg, 1.1 equiv.) was dissolved in DMF (10 mL) to give a suspension. This suspension was added to the reaction mixture and the remaining mixture was stirred for 16 hours at ambient temperature. The reaction mixture was diluted with water (200 mL) and was lyophilized. The resulting residue was purified on reversed phase silica (C18) with 0.01 M ammonium acetate (pH 7) and a gradient of 10 to 50% ACN in block-elutions. The appropriate fractions were combined and lyophilized to give the ganirelix pentasaccharide conjugate 31, 32, 36 or 37 as a white powder. Analytical HPLC was performed with a gradient elution by starting with 90% eluent A (0.01M ammonium acetate) and 10% eluent B (ACN) for 5 min., then applying a gradient to 100% eluent B in 30 min..

20 **EXAMPLE 20**

Compound 31

Ganirelix-derivative 30 (70 mg), which was prepared by solid phase peptide synthesis as described in *J. Med. Chem.* 1992, 35, 3942-3948, was conjugated to pentasaccharide 8 (88 mg) according to the general procedure to give 31 (16 mg, 40%). Purity 96% (analytical HPLC), 97% (analytical anion exchange). ESI-MS calcd. for $C_{126}H_{191}ClN_{18}O_{62}S_6$ = 3175.0359, found 792.7390 $[M-4H]^+$, 1057.3258 $[M-3H]^+$, 1062.9883 $[M+NH_3-3H]^+$. 1H -NMR (D_2O , 400 MHz, HH-COSY): δ 8.56 (m, 1H), 8.53 (m, 1H), 8.10 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.68 (m, 2H), 7.47 (m, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.16 (m, 3H), 7.04 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 6.63 (m, 2H), 5.35-5.25 (m, 2H), 4.95 (m, 1H), 4.68-4.61 (m, 1H), 4.61-4.51 (m, 2H), 4.50-4.38 (m, 2H), 4.38-4.25 (m, 3H), 4.24-3.96 (m, 15H), 3.90-3.84 (m, 1H), 3.84-3.67 (m, 8H), 3.67-3.20 (m, 53H), 3.19-3.09 (m, 4H), 3.09-2.98 (m, 12H), 2.98-2.84 (m,

8H), 2.77 (m, 2H), 2.13 (m, 1H), 1.96-1.72 (m, 5H), 1.68-1.42 (m, 5H), 1.42-1.20 (m, 7H), 1.18-0.89 (m, 13H), 0.85-0.71 (m, 5H).

EXAMPLE 21

5 Compound 32

Ganirelix-derivative 30 (70 mg) was conjugated to pentasaccharide 9 (88 mg) according to the general procedure to give 32 (52 mg, 35%). Mass calcd. for $C_{125}H_{189}ClN_{18}O_{65}S_7$ = 3240.9770; found on ESI-QTOF 809.2219 $[M-4H]^+$, 1079.2994 $[M-3H]^3$, 1084.9739 $[M+NH_3]^3$,
10 1090.6340, $[M+2NH_3-3H]^3$. 1H -NMR (D_2O , 400 MHz, HH-COSY): δ 8.45 (m, 1H), 8.38 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.59 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.20 (m, 3H), 7.05 (d, 2H), 6.97 (m, 2H), 6.66 (m, 2H), 5.40-5.30 (m, 2H), 5.09 (d, 1H), 4.67-4.48 (m, 2H), 4.40-3.92 (m, 18H), 3.92-3.75 (m, 7H), 3.77-3.17 (m, 56H), 3.12-3.02 (m, 11H), 3.02-2.98 (m, 8H), 2.97-2.83 (m, 4H), 2.81-2.75 (m, 2H), 2.14 (m, 1H), 1.99-1.86 (m, 5H), 1.82-1.23 (m, 12H), 1.22-0.90 (m, 13H), 0.87-
15 0.72 (m, 5H). Purity: 95% (analytical HPLC), 97% (analytical anion exchange purity).

EXAMPLE 22

Compound 34

20 Compound 30 (100 mg) was dissolved in DMF. TBTU (36 mg, 2 equiv.) and NMM (60 μ L, 10 equiv.) were added and the reaction mixture was stirred for 1 hour at ambient temperature. Then compound 33 (34 mg, 2 equiv.), which was prepared as described in WO 2005090382, was added and the reaction mixture was stirred for 16 hours at ambient temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the remaining residue was dissolved in water/CAN, the resulting solution
25 which was subjected to preparative HPLC (gradient: 80% eluent A (0.1% TFA in H_2O) and 20% eluent B (ACN) to 20% eluent A and 80% eluent B in 45 min.). The appropriate fractions were combined to give, after lyophilization, compound 34 (60 mg, 60%) as a white powder. Analytical HPLC was performed by applying a gradient starting with 75% eluent A (0.1% TFA in H_2O) and 25% eluent B (CH_3CN) to 20% eluent A and 80% eluent B in 15 min.. Mass calcd.
30 for $C_{94}H_{139}ClN_{18}O_{19}$ = 1859, found on MALDI-TOF 1860 $[M+H]^+$ and 1882 $[M+Na]^+$. Purity: >90% (analytical HPLC).

EXAMPLE 23

Compound 35

Compound 34 (60 mg) was dissolved in H₂O/TFA/ACN (7 mL, 5:1:1) and was stirred for 2 hours at ambient temperature. An extra amount of TFA (2.5 mL) was added and the reaction mixture was stirred for another 22 hours. The TFA was evaporated *in vacuo* and the remaining solution was lyophilized to give 35 (45 mg, 77%) as a white powder. Mass calcd. for C₉₀H₁₃₁ClN₁₈O₁₉ = 1803, found on MALDI-TOF 1804 [M+H]⁺ and 1826 [M+Na]⁺. Purity: >95% (analytical HPLC).

10

EXAMPLE 24

Compound 36

Ganirelix-derivative 35 (17 mg) was conjugated to pentasaccharide 8 (19 mg) according to the general procedure. Additional purification was performed by preparative HPLC (gradient: 90% eluent A (0.01 M ammonium acetate) and 10% eluent B (CH₃CN) for 5 min., then to 100% B in 50 min.). The appropriate fractions were combined and lyophilized to give 36 (2 mg, 6%). Purity: 94% (analytical HPLC), >98% (analytical anion exchange).

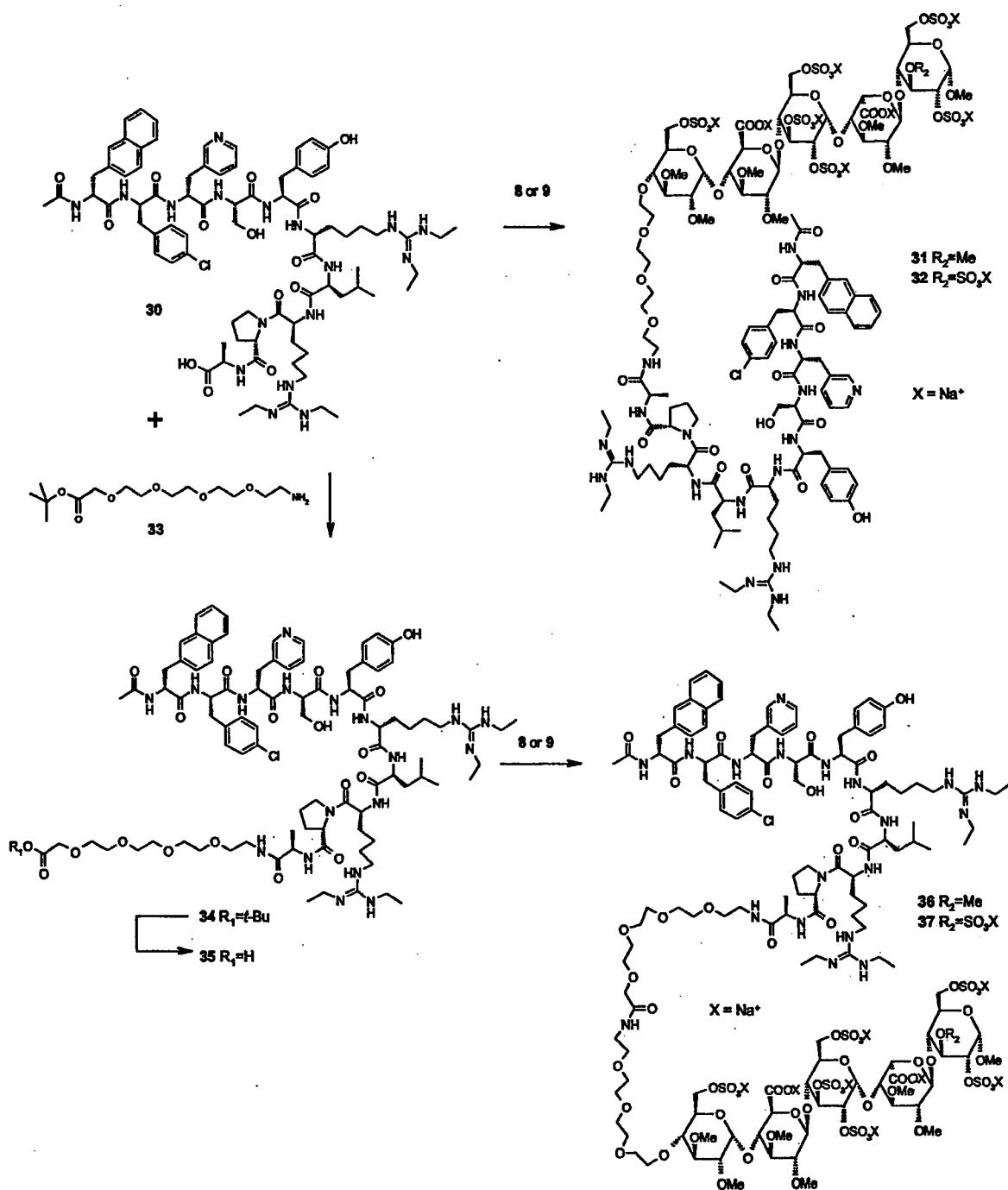
15

EXAMPLE 25

20 Compound 37

Ganirelix-derivative 35 (17 mg) was conjugated to pentasaccharide 9 (19 mg) according to the general procedure. Additional purification was performed by preparative HPLC as described for compound 36. The appropriate fractions were combined and lyophilized to give 37 (1.16 mg, 3%). Purity: 88% (analytical HPLC). Analytical anion exchange purity: >95%.

25

Scheme 5. Synthesis of compounds 31, 32, 36 and 37.

34

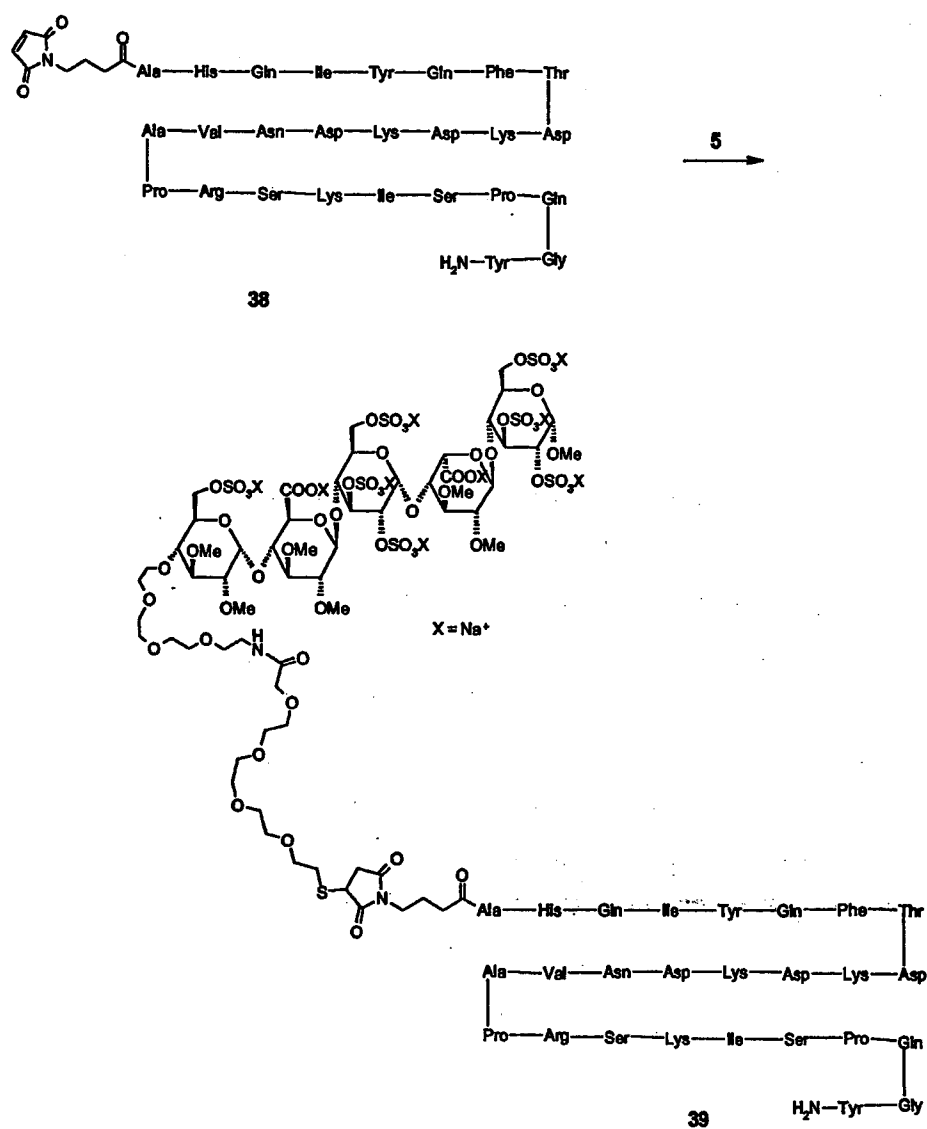
Conclusion: The differences in competitive binding potential to ATIII between on the one hand conjugates 31 and 32, and on the other hand conjugates 36 and 37 (as depicted in Fig 8) reveal that, irrespective of the length of the linking residue, the affinity for ATIII can be tuned by changing the number of sulfate groups contained in these molecules. These data further indicate that the *in-vivo* pharmacokinetic properties of these conjugates may be tunable by the choice of the pentasaccharide (see pharmacokinetic study below). Furthermore, the binding of the conjugates to ATIII is specific, since the non-conjugated parent peptide ganirelix shows no competitive binding to ATIII.

10 EXAMPLE 24

Compound 39

Compound 38 (26.5 mg, 8.4 μmol), supplied by NeoMPS (Strasbourg, France), was dissolved in degassed 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (16 mL, pH 7.0). Pentasaccharide 5 (45.5 mg, 21 μmol , 2.5 equiv.) was added under a nitrogen atmosphere and the resulting mixture was stirred for approximately 10 min.. Then an aqueous solution of NH_2OH (50 wt %, 69 μL) was added and the reaction mixture was stirred for 16h. The product was purified on a Q-Sepharose column (2M $\text{NaCl}_{(\text{aq})}/\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, 10/40/1 $\rightarrow$ 40/10/1, v/v/v). Desalting of the appropriate fractions was carried out using G25 sephadex chromatography as described above to yield compound 39 (15.7 mg, 35%). The yield was determined by A_{280} measurement using a theoretical absorbance of 0.48 for a 1 mg/mL solution. Calcd. mass for $\text{C}_{196}\text{H}_{309}\text{N}_{41}\text{O}_{101}\text{S}_8 = 5108.8$; found on ESI-Q-TOF = 1740.6 $[\text{M}+5\text{Na}]^{3+}$, 1311.2 $[\text{M}-1\text{H}+6\text{Na}]^{4+}$, 1053.5 $[\text{M}-2\text{H}+7\text{Na}]^{5+}$

Scheme 6. Synthesis of compound 39



35

Conclusion: As depicted in Fig. 9 the competitive binding potential to ATIII of conjugate 39 is conserved when compared to the parent pentasaccharide-spacer residue (see Fig. 5, compound 9). These data suggest that a significant extension of the *in-vivo* half-life of the peptide can be achieved by conjugation to an ATIII binding carrier pentasaccharide (see pharmacokinetic study below). Furthermore, the binding of the conjugate to ATIII is specific, since the non-conjugated parent peptide ADM(27-52) shows no significant competitive binding to ATIII.

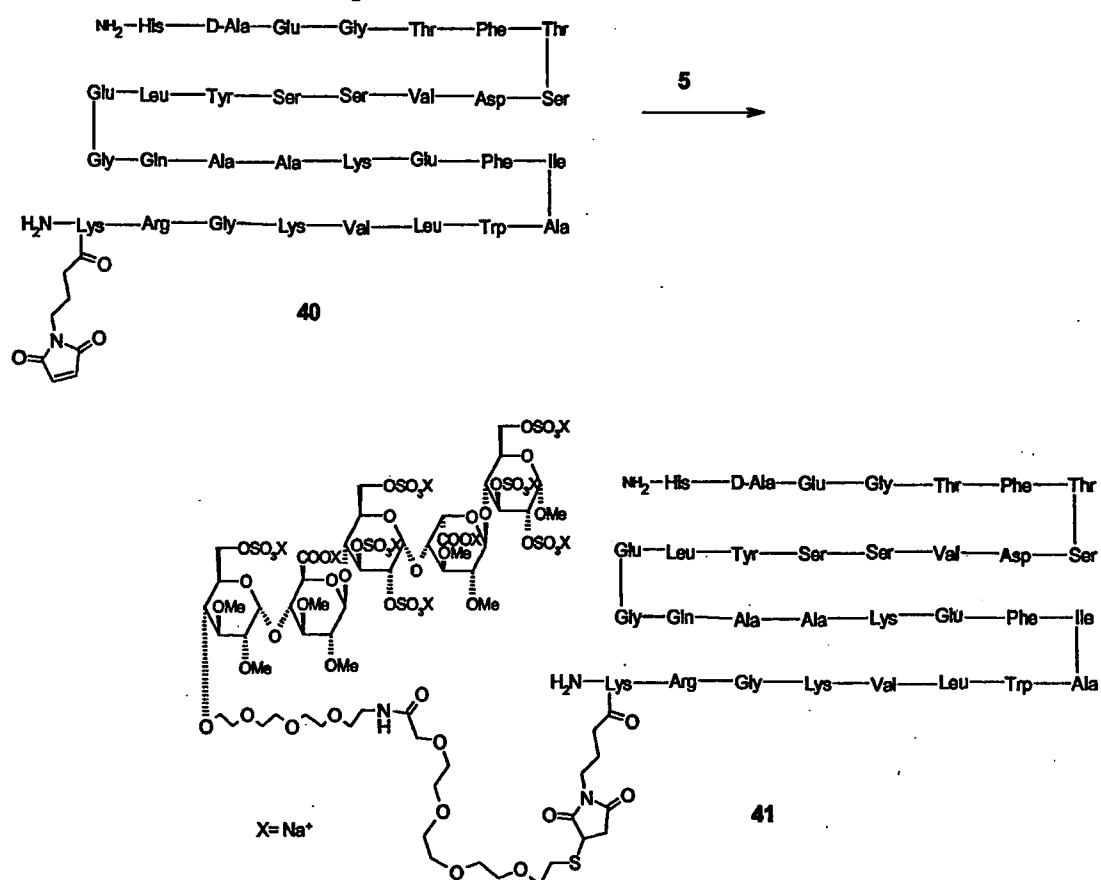
EXAMPLE 25

Compound 41

Compound 40 (15 mg, 4.2 μmol), prepared by NeoMPS (Strasbourg, France), was dissolved in degassed 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (8 mL, pH 7.0). Pentasaccharide 5 (22.7 mg, 10.4 μmol , 2.5 equiv.) was added under a nitrogen atmosphere and the mixture was stirred for approximately 10 min. Then an aqueous solution of NH_2OH (50 wt %, 0.14 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 16h. The product was purified as described for compound 39 to yield compound 41 (1.38 mg, 6%). The yield was determined by A_{280} measurement using a theoretical absorbance of 1.22 for a 1 mg/mL solution. Mass calcd. for $\text{C}_{218}\text{H}_{342}\text{N}_{44}\text{O}_{106}\text{S}_8 = 5528$; found on ESI Q-TOF = 1843.7 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1383.0 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1107 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$.

Conclusion: The competitive binding potential to ATIII of conjugate 41 is conserved when compared to the parent pentasaccharide-spacer residue compound 9 (see Fig. 10). These data suggest that a significant extension of *in-vivo* half-life of the peptide may be attained by conjugation to an ATIII binding carrier pentasaccharide (see pharmacokinetic study below).

Scheme 7. Synthesis of compound 41



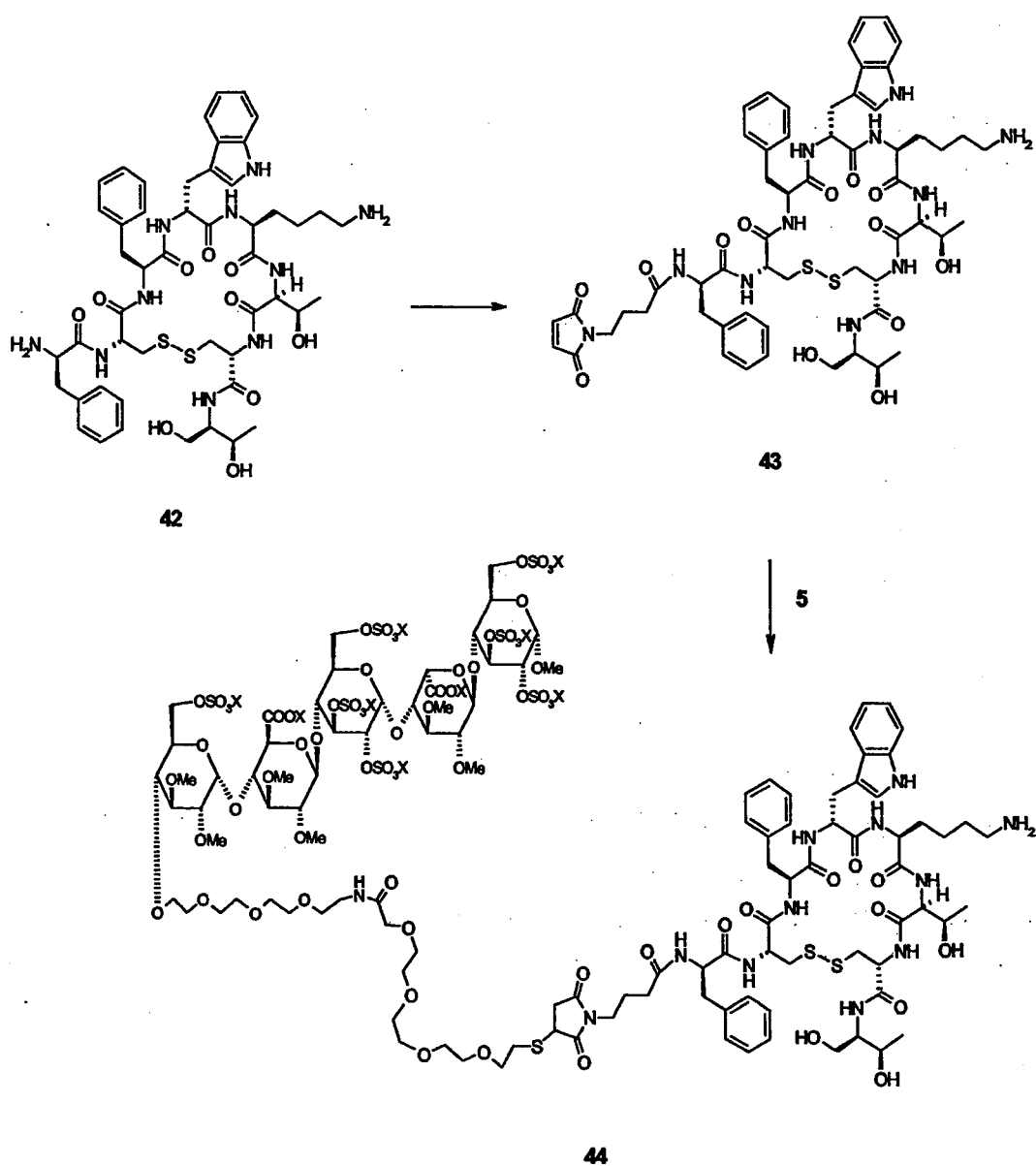
EXAMPLE 26

Compound 44

36

Octreotide (compound 42, 50 mg, 0.04 mmol), which can be obtained at commercial suppliers such as Bachem (Weil am Rhein, Germany), was dissolved in DMSO (5 mL). AcOH (7 μ L) was added to generate a slightly acidic solution. Subsequently GMBS (11.2 mg, 0.04 mmol, 1.0 equiv.) was added and the resulting solution was stirred under nitrogen for 1h. LC-MS analysis showed a near complete conversion to GMB octreotide 43 in which the GMB moiety is introduced to the N-terminal Phe residue in a highly regioselective manner. The reaction was cooled to $\sim 5^{\circ}\text{C}$ after which a solution of $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (20 mL, pH 7.0) was added. After 10 min. the mixture was allowed to reach to RT and N_2 was lead through the solution for 10 min.. Then pentaşaccharide 5 (21.8 mg, 0.01 mmol, 0.25 equiv.) was added as a solid under a nitrogen atmosphere, followed by an aqueous solution of NH_2OH (0.11 mL, 50 wt %) and the reation mixture was stirred for 16h. The product was purified by ion exchange chromatography as described above, to yield compound 44 (6.3 mg, 19%). Mass calcd. for $\text{C}_{112}\text{H}_{170}\text{N}_{12}\text{O}_{70}\text{S}_{10} = 3122.7$; found on ESI-Q-TOF = 1562.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1041.9 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$. ^1H -NMR (D_2O , 400 MHz, HH-COSY): δ 7.52-7.29 (m, 10H), 7.26-7.14 (m, 4H), 7.03 (s, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 5.12-4.89 (m, 2H), 4.77-4.60 (m, 3H), 4.45-3.97 (m, 18H), 3.95-3.76 (m, 13H) 3.75-3.35 (m, 57H), 3.33-2.59 (m, 18H), 2.22-1.16 (m, 2H), 1.85-1.76 (m, 3H), 1.71-1.38 (m, 3H), 1.32-1.15 (m, 7H), 0.81-0.61 (M, 2H).

Scheme 8. Synthesis of compound 44



5 **Conclusion:** The competitive binding potential to ATIII of conjugate 44 is conserved when compared to the parent pentasaccharide-spacer residue compound 9 (see Fig. 11). These data are indicative for a significant extension of *in-vivo* half-life of the peptide by conjugation to an ATIII binding carrier pentasaccharide.

EXAMPLE 27

Compound 46

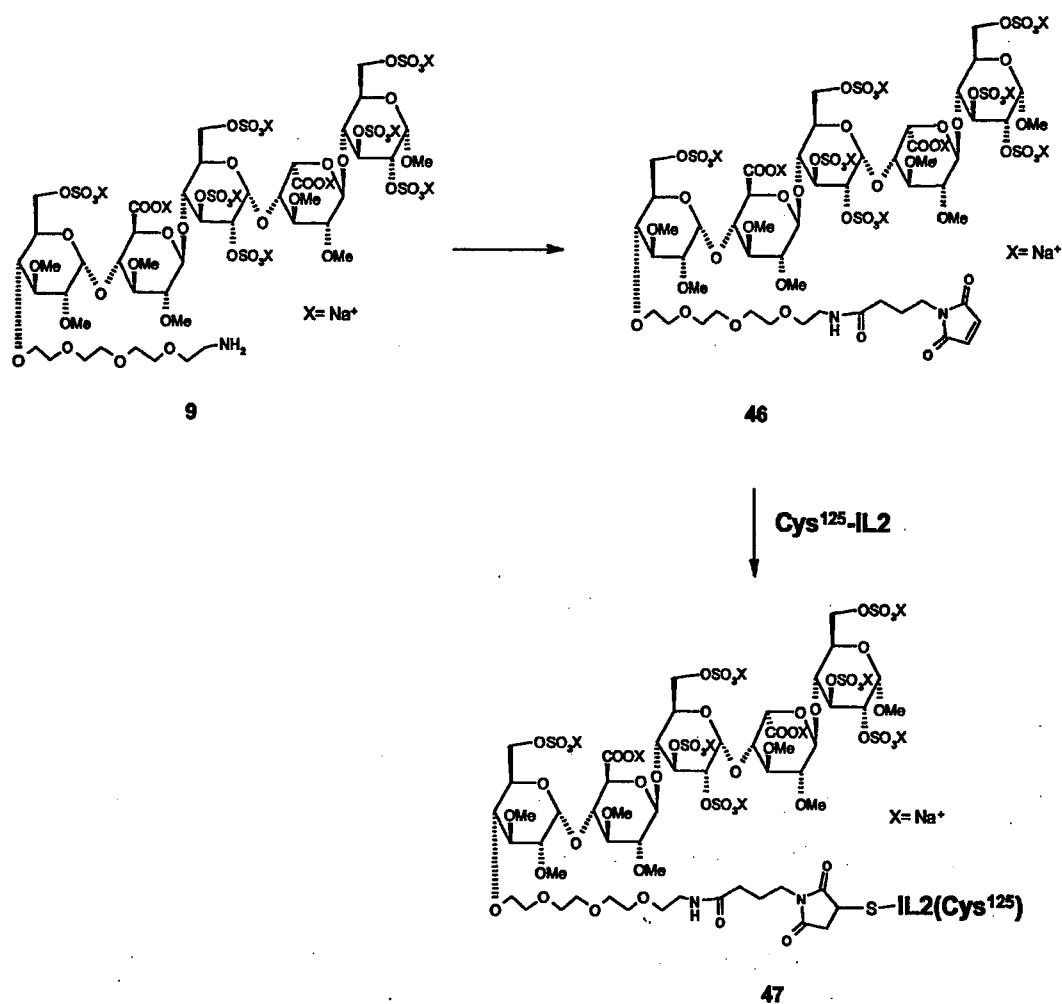
Pentasaccharide 9 (100 mg) and GMBS (22 mg, 1.5 equiv.) were dissolved in DMF (10 mL).
5 DiPEA (18 µL, 2 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred overnight at ambient temperature. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified on a preparative G25-column. The combined fractions were lyophilized to give 46 (50 mg, 46%) as a white powder. ESI-MS calcd. for $C_{53}H_{77}N_2O_{55}S_7Na_9$ = 2052; found on ESI-Q-TOF = 1027 M^{2+} .

10 EXAMPLE 28

Compound 47

Pentasaccharide maleimide derivative 46 was conjugated to the free Cys¹²⁵ of native rech-IL2 (R&D systems, 202-IL/CF). Prior to conjugation rech-IL-2 was analysed by HPSEC, SDS-
15 PAGE and MALDI-TOF MS indicating a predominant monomeric composition. Rech-IL2 (1 mg, 800 µL, 1.26 mg/mL in PBS containing 0.5% SDS) was treated overnight at RT on a roller bank with an excess of compound 46 (59 µL of a 10 mg/mL aq. solution, 5 equiv.) to achieve complete conversion of starting material. Next, unreacted maleimide 46 was blocked with a 5 times molar excess of cysteamine (16 µL, 10 mg/mL) for 3h. The reaction mixture was dialysed
20 (cut off 6-8 kDa) against 0.5% SDS in PBS to remove excess cysteamine and 46 and the final amount of product as determined by A_{280} was 0.69 mg.

The final conjugate 47 was characterized by SDS-PAGE (4-12%) and Western blot (see Fig. 12). From lanes 3 and 4 it is concluded that compound 47 has a higher Mw relative to rech-IL2 (corresponding to the presence of a pentasaccharide moiety). Western blot analysis with
25 subsequent incubations of a) 10 µg/mL hATIII (HAT 950A2L - Kordia); b) a-hATIII (MoAb HATIII 200- Kordia); c) GAM-HRP (W402B 20373201 - Promega) and final detection with DAB reagent clearly revealed specific ATIII binding to pentasaccharide-containing IL2 (lane 7 vs 8).

Scheme 9. Synthesis of conjugate 47

5 **Pharmacology**

Determination of pharmacokinetics of conjugated (poly)peptides

The pharmacokinetic properties of representative examples of compounds of the invention were determined as described in the following paragraphs.

10

Human Insulin ELISA for determination of Insulin in rat plasma

The human Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) has been developed to measure human insulin in human and rat plasma or buffer system. In this way the ELISA could be used to

38

determine the insulin concentration in plasma samples derived from pharmacokinetic experiments.

The assay is based on the immunochemical "sandwich" principle using two monoclonal antibodies, i.e. a solid phase bound, capture antibody and a detection antibody which is labeled with horseradish peroxidase (HRP).

For the determination of the pharmacokinetic properties of pentasaccharide-insulin conjugate 6 and recombinant human insulin (recH insulin, batch SIHR017, from Diosynth, The Netherlands), rat plasma samples were incubated for 1h at room temperature, while shaking at 10 Hz. During this incubation, pentasaccharide-insulin conjugate 6 or recH insulin binds to the immobilized anti-insulin antibody. After a second washing procedure, detection antibody anti-insulin conjugated with HRP was added to bind to the immobilized insulin-complex. The plate was washed to remove unbound enzyme-labeled antibody and subsequently the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine / H₂O₂ substrate solution was added. The reaction was stopped with 0.5 M sulphuric acid and the microtiter plate was read spectrophotometrically at 450 nm. The intensity of colour is directly proportional to the concentration of insulin. Then for each plasma sample the mean concentration (mol/L) of insulin was determined.

Determination of pharmacokinetic properties of compound 6

The pharmacokinetic behavior of insulin conjugate 6 and recH insulin were studied in male Wistar rats of 300 – 400 gr. The rats were anaesthetized by inhalation of a mixture of O₂/N₂O/isoflurane, after which the right jugular vein was cannulated. The next day rats were treated i.v. with doses of 3.5 nmol/kg of compound 6 or recH insulin, after which blood was sampled at several time intervals. Blood was centrifuged after which the plasma was siphoned off and stored at -20°C until use. The concentration of the tested compounds in the plasma samples were determined using the human ELISA against a calibration curve which was made of the stock solution of the tested compound itself. The concentration in the samples was expressed in nmol/L and the kinetic parameters were calculated with the noncompartment model of WinNonlin.

Conclusion: As can be seen in Fig. 13 and Table 3 the pharmacokinetic properties of pentasaccharide-insulin conjugate 6 were strongly improved compared to those of the parent recH insulin.

Table 3. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of compound 6 or recH insulin (3.5 nmol/kg) in rat. Experiment performed in n=3/treatment.

	Pentasaccharide-insulin conjugate 6	recH insulin
	Mean ± s.e.m.	Mean ± s.e.m.
T1/2 eli (h)	2.8 ± 0.1	0.033 ± 0.001
AUCinf (h.nmol/L)	72.5 ± 6.4	4.6 ± 0.8
Vss (L/kg)	0.11 ± 0.01	0.012 ± 0.002
Cl (L/h/kg)	0.049 ± 0.004	0.80 ± 0.12
MRT (h)	2.1 ± 0.1	0.014 ± 0.1

5

Determination of pharmacokinetics after labeling with ¹²⁵I

Pentasaccharide conjugates 24, 28, 29, 31, 32, 39 and 41 were labeled with ¹²⁵I using the lactoperoxidase method, according to Machaloni et al. (*Biochem J.* 1969, 113: 299-305). After labeling, the conjugate was purified by gel filtration on Sephadex G25 and anion exchanger HiTrap Q10. Kinetic experiments were repeated as described for compound 6 but using ¹²⁵I-labeled conjugates instead. In order to prevent accumulation of ¹²⁵I in the thyroid, rats were orally treated with 10 mg/kg potassium iodide prior to administration of compound.

10

The correct determination of the fate of ¹²⁵I-labeled conjugates might be affected adversely by metabolic intracellular endogenous dehalogenation to give free ¹²⁵I in circulation. Since the free ¹²⁵I itself showed an elimination half-life of 3.2 h in rats (control, data not shown), the measured overall half-life of ¹²⁵I labeled compounds with a relatively short half-life might be prolonged and the experimentally determined half-life of compounds with a relatively long half life may be shorter. Indeed, the observed elimination half-lives of conjugates 31, 32 and 39 demonstrate in a qualitative manner that conjugation of the peptides to a carrier pentasaccharide leads to prolonged residence times.

15

20

Adaptation of the above described method by measuring the radioactivity in pellet (0.1 mL) after precipitation with a 40 times higher volume of TCA (10% final concentration) yielded

pharmacokinetic parameters of compounds 24, 28, 29 and 41 which were corrected for competing endogenous ¹²⁵I-dehalogenation.

Pharmacokinetics of insulin-pentasaccharide conjugates 24, 28 and 29 compared to recH insulin

Table 4. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of insulin conjugates 24, 28 and 29. Experiment performed in n=3/treatment. For comparison recH insulin was tested in n=1 (doses expressed in cpm were normalized).

	Compound 24	Compound 28	Compound 29	recH insulin
	Mean ± s.e.m.	Mean ± s.e.m.	Mean ± s.e.m.	value (n=1)
Correlation	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00
T1/2 eli	3.0 ± 0.2	3.9 ± 0.1	5.5 ± 0.3	0.74
AUCinf (h.cpm/0.1mL)	30447 ± 4034	13756 ± 590	14397 ± 517	481
Vss (L/kg)	0.192 ± 0.022	0.428 ± 0.028	0.570 ± 0.018	2.225
Cl (L/h/kg)	0.068 ± 0.009	0.146 ± 0.007	0.139 ± 0.05	4.16
MRT (h)	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	4.1 ± 0.2	0.5

Conclusion: The pharmacokinetic properties of insulin-pentasaccharide conjugate 24 as determined by the ¹²⁵I-labeling method (Fig. 14, Table 4) were in agreement with those obtained with a similar insulin-pentasaccharide conjugate (compound 6) determined by the ELISA method (Fig. 13, Table 3). The differences in kinetic parameters for recH insulin as determined by two analytical methods can be explained by differences in curve extrapolation (to calculate Vss and Cl) due to the fast disappearance of label from the circulation during the first 15 min.

Furthermore, the observed differences in AUC, Cl and Vss of the insulin pentasaccharide conjugates 24, 28, 29 (Fig. 14, Table 4) clearly demonstrate that the pharmacokinetic properties of the conjugates can be tuned by using alternative carrier pentasaccharides with different binding affinity for ATIII (which is in agreement with the findings of the BIA study, see Fig. 6 and Table 2).

Pharmacokinetics of pentasaccharide conjugates 31 and 32

Table 5. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of the two conjugates 31 and 32. Experiment performed in n=3/treatment. (Data not corrected for dehalogenation).

5

	Compound 31	Compound 32
	Mean ± s.e.m.	Mean ± s.e.m.
Correlation	-1.00	-1.00
T1/2 eli (h)	7.1 ± 0.3	9.4 ± 0.6
Vss (ml/rat)	66.7 ± 2.3	52.5 ± 2.6
Cl (ml/h/rat)	7.9 ± 0.1	4.2 ± 0.3
MRT (h)	8.4 ± 0.2	12.6 ± 0.7

Conclusion: The half-life of free ganirelix (T1/2 1.4 h in rat, i.v., Chan *et al. Drug. Metab. Dispos* 1991, 19, 858) is significantly extended when conjugated to a carrier pentasaccharide (Fig. 15, Table 5). Comparison of the pharmacokinetics of compound 31 to that of 32 shows that an improvement in Vss, Cl and T1/2 elimination is obtained by using a pentasaccharide with a higher affinity for ATIII. These data in combination with the findings of the BIA study (see Fig. 8) indicate that the pharmacokinetic properties of the conjugates can be tuned by using alternative carrier pentasaccharides with different binding affinity for ATIII.

10

Pharmacokinetics of pentasaccharide conjugate 39 and ADM(27-52)

Table 6. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of ADM(27-52) and compound 39. Experiment performed in n=3/treatment. (data not corrected for dehalogenation).

	ADM(27-52)	Compound 39
	Mean $\pm$ s.e.m.	Mean $\pm$ s.e.m.
Correlation	-1.00	-1.00
T1/2 eli (h)	4.9 $\pm$ 0.1	11.1 $\pm$ 0.2
Vss (ml/rat)	556 $\pm$ 48	80 $\pm$ 3.3
Cl (ml/h)	112 $\pm$ 9	5.0 $\pm$ 0.1
MRT (h)	5.0 $\pm$ 0.1	14.5 $\pm$ 0.3

5

Conclusion: The pharmacokinetic properties of ADM(27-52) were improved by conjugation to an ATIII binding carrier pentasaccharide (compound 39, Fig. 16, Table 6). The T1/2 of ADM(27-52) *per se* may have been overestimated since data have not been corrected for dehalogenation. Moreover, the half-life of free adrenomedullin is only 22 min in human (Meeran *et al. J. Clin. Endocrin. Met.* 1997, 82, 95-100). These and earlier observations in the BIA study (Fig. 9) support the conclusion that an improvement of pharmacokinetic properties of a (poly)peptide can be achieved by conversion into a (carrier) conjugate with specific binding affinity to circulating ATIII.

10

Pharmacokinetics of pentasaccharide conjugate 41 compared with [D-Ala⁸]-GLP-1(7-36)

*Table 7. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of GLP-1 and compound 41
Experiment performed in n=3/treatment (data expressed in cpm were normalized)*

	[D-Ala ⁸]-GLP-1(7-36)	Compound 41
	Mean ± s.e.m.	Mean ± s.e.m.
Correlation	-0.98	-0.99
T1/2 eli (h)	2.0 ± 0.4	9.8 ± 0.4
AUCinf (h.cpm/0.1mL	1154 ± 59	108658 ± 4858
Vss (ml/kg rat)	2696 ± 456	205 ± 13
Cl (ml/h/kg)	1732 ± 86	18 ± 0.8
MRT (h)	1.6 ± 0.1	11.2 ± 0.3

Conclusion: The pharmacokinetic properties of [D-Ala⁸¹-GLP1(7-36) were improved by conjugation to an ATIII binding carrier pentasaccharide (compound 41, Fig. 17, Table 7). The Cl of compound 41 was decreased ~100 fold and Vss 13 fold, resulting in a ~100 fold increase in AUC (exposure) compared to the non-conjugated peptide. Combined with the BIA data (Fig. 10) these observations support the conclusion that an improvement of pharmacokinetic properties of a (poly)peptide can be achieved by conversion into an ATIII binding conjugate.

Determination of (poly)peptide-pentasaccharide-ATIII complex in rat plasma

To ensure that (poly)peptide pentasaccharide conjugates bind to Antithrombin III *in vivo*, a sandwich-type ELISA employing an anti-insulin Mab as capture and a HRP-conjugated anti-ATIII antibodies as detector was carried out on plasma samples from the pharmacokinetic experiment of compound 6. Obviously, only intact pentasaccharide-insulin-ATIII complex can be detected in this type of assay in which recH insulin was used as a negative control).

From the plasma sample obtained 1 min after i.v. administration of 3.5 nmol/kg compound 6 or recH insulin in rat, the binding of pentasaccharide-insulin conjugate 6 and recH insulin to rat ATIII was determined. The results are shown in Fig. 18.

41

Conclusion: Pentasaccharide-insulin conjugate 6 is bound to ATIII, in contrast with recH-insulin which cannot form a complex with ATIII. Although the anti-rabbit ATIII antibody was less sensitive, both ATIII antibodies were able to detect the pentasaccharide-insulin conjugate 6-ATIII complex. These results demonstrate that compound 6 is bound to ATIII in circulation and that the prolonged half-life of ATIII-binding pentasaccharides is the result of this complexation. Therefore, it can be concluded that the improvement of the pharmacokinetic properties of (poly)peptide-pentasaccharide conjugates (such as compound 6) compared to those of the original non-conjugated (poly)peptide can be ascribed to specific binding of the conjugate to ATIII.

Glucose suppression test in vivo in rats

The biological activities of insulin and the insulin conjugates were tested in a rat model by measuring the glucose depression levels. The animals were fasted overnight (16 hours) prior to the experiment. In the morning blood was sampled from all the rats by cutting a little piece of the tail, after which the blood was dropped on a test strip and the glucose levels were measured with an ACCU-Check Sensor blood glucose monitor (Roche Diagnostics). The pentasaccharide-insulin conjugate 6 and insulin were i.v. administered in the tail vein after pre-heating of the rats in a heating box at 39°C during 10 min.. The applied doses were 7 nmol/kg for pentasaccharide-insulin conjugate 6 and 3.5 nmol/kg for recH-insulin. At various time intervals blood samples were taken by removing the crusted blood, after which the glucose content was determined immediately as described.

Pharmacodynamics of pentasaccharide insulin conjugate 6

The improved pharmacokinetic properties of pentasaccharide-insulin conjugate 6 compared to those of recH-insulin are confirmed by the prolonged glucose suppression levels after i.v. administration (see Fig. 19).

In the experiments performed with compounds 24, 25, 26, 27 and insulin detemir (control), the rats were starved just prior to administration of compound (to warrant consistent glucose levels in control group).

Comparison of the B29-insulin conjugate 24 with B29-insulin conjugate 26 (Fig. 20), and B1-insulin conjugate 25 with B1-insulin conjugate 27 (Fig. 21), reveals that similar prolonged glucose suppression activities are obtained irrespective of spacer length.

- 5 Surprisingly, it was found that the onset of action of all insulin-conjugates tested was slower than that of recH insulin or insulin detemir (i.v. administration) and that the exposure was enhanced by the longer duration of action.

Direct comparison of B29-insulin conjugates 24, 28 and 29 within one experiment at the dose of 24 nmol/kg substantiates the difference in duration of action of their blood glucose lowering activities (see Fig. 22). Thus, suppression of glucose levels with compound 24 lasted beyond 7h, while conjugates 28 and 29 were no longer active than 5.5h after i.v. administration. The pharmacodynamic differences correspond with the earlier mentioned pharmacokinetic differences in distribution volume and clearance of compound 24 compared to compound 28 and 29, respectively. Finally, insulin detemir was tested as a comparative example showing less pronounced and less prolonged activity at doses of 24 and 48 nmol/kg (Fig. 21, 22).

10
15

CLAIMS

1. A conjugate of a polypeptide and an oligosaccharide, wherein the polypeptide is conjugated to at least one oligosaccharide-spacer residue, the oligosaccharide being a synthetic sulfated oligosaccharide comprising 4-18 monosaccharide units and *per se* having affinity to antithrombin III and the spacer being a bond or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

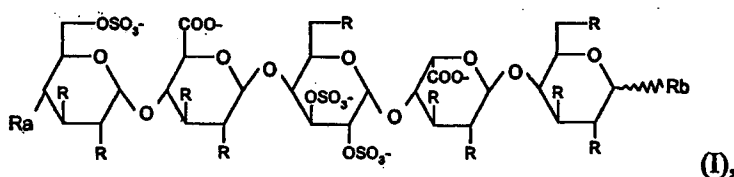
2. The conjugate of claim 1, wherein the oligosaccharide consists of 4-6 monosaccharide units.

3. The conjugate of claim 1 or 2, wherein the oligosaccharide is a pentasaccharide.

4. The conjugate of any one of claims 1 to 3, having a circulating plasma level of ≤ 50 nM.

5. The conjugate of any one of claims 1 to 4, wherein the oligosaccharide *per se* has an anticoagulant activity which is of subtherapeutic level when compared to the pharmacological activity of the polypeptide *per se*.

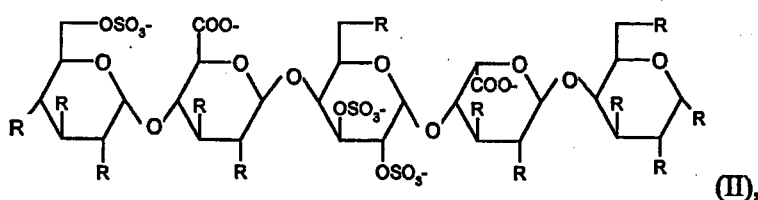
6. The conjugate of any one of claims 1 to 5, wherein the oligosaccharide-spacer residue has the structure (I)



wherein one essentially pharmacologically inactive flexible linking residue is present and wherein R is independently OSO_3^- , (1-8C)alkoxy or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, and

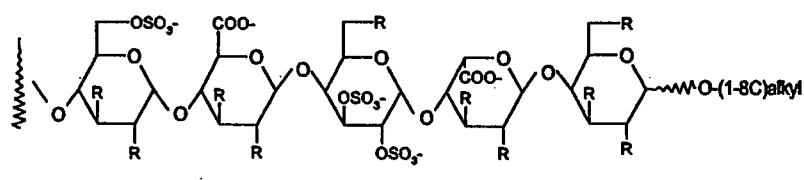
R_a is independently OSO_3^- , (1-8C)alkoxy, an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue or an oligosaccharide residue, comprising 1 – 13 monosaccharide units, and R_b is independently (1-8C)alkoxy, an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue or an oligosaccharide residue, comprising 1 – 13 monosaccharide units, the charge being compensated by positively charged counterions.

7. The conjugate of any one of claims 1 to 6, wherein the oligosaccharide-spacer residue is a pentasaccharide-spacer residue having the structure (II)



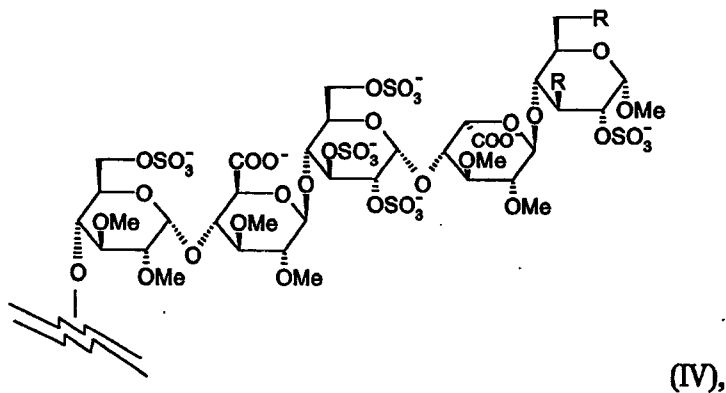
- 5 wherein one essentially pharmacologically inactive flexible linking residue is present and wherein R is independently OSO_3^- or (1-8C)alkoxy, or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, the charge being compensated by positively charged counter ions.

- 10 8. The conjugate of claim 7, wherein the pentasaccharide residue has the structure (III)



wherein R is independently OSO_3^- or (1-8C)alkoxy, the charge being compensated by positively charged counterions.

- 15 9. The conjugate of claim 8, wherein the pentasaccharide residue has the structure (IV)



wherein R is independently OCH_3 or OSO_3^- .

10. The conjugate of claim 9, wherein both R groups in (IV) are OSO_3^- .

43

11. The conjugate of any one of claims 1 to 10, wherein the polypeptide has a molecular weight of ~ 0.3 – 50 kDa.

5 12. The conjugate of any one of claims 1 to 10, wherein the polypeptide has a molecular weight ~0.3 – 20 kDa

13. The conjugate of any one of claims 1 to 10, wherein the polypeptide has a molecular weight ~0.3 – 7.5 kDa

10

14. The conjugate of claim 11, wherein the polypeptide is selected from insulin, calcitonin, ganirelix, GLP-1, [D-Ala⁸]-GLP-1(7-36), adrenomedullin, ADM(27-52), kisspeptin-10, octreotide or interleukin-2.

15 15. The conjugate of claim 14, wherein the polypeptide is selected from insulin, ADM(27-52), and [D-Ala⁸]-GLP-1(7-36).

16. The conjugate of any one of claims 1 to 15, wherein the polypeptide is monosubstituted with a pentasaccharide-spacer residue.

20

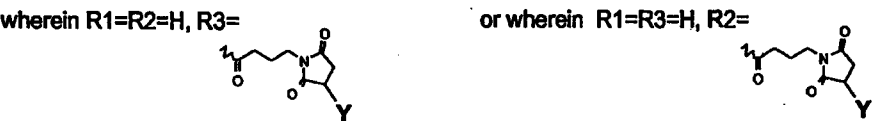
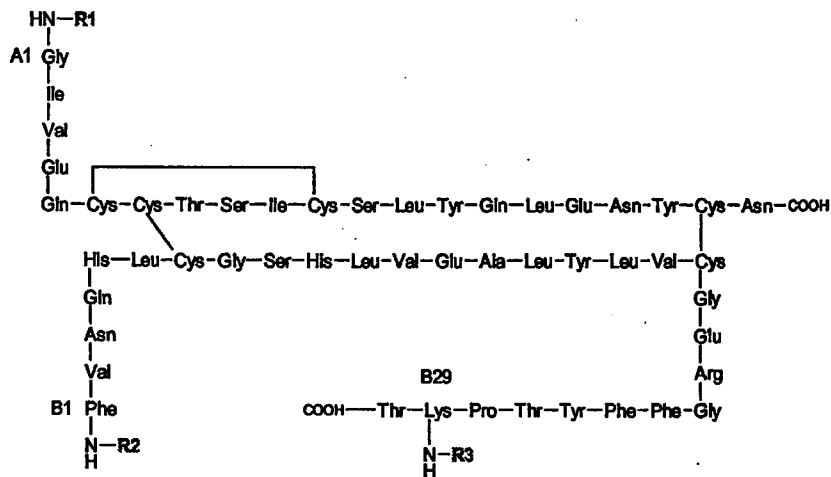
17. The conjugate of any one of claims 1 to 16, wherein the spacer is an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue.

18. The conjugate of claim 17, wherein the spacer has a length of 10-50 atoms.

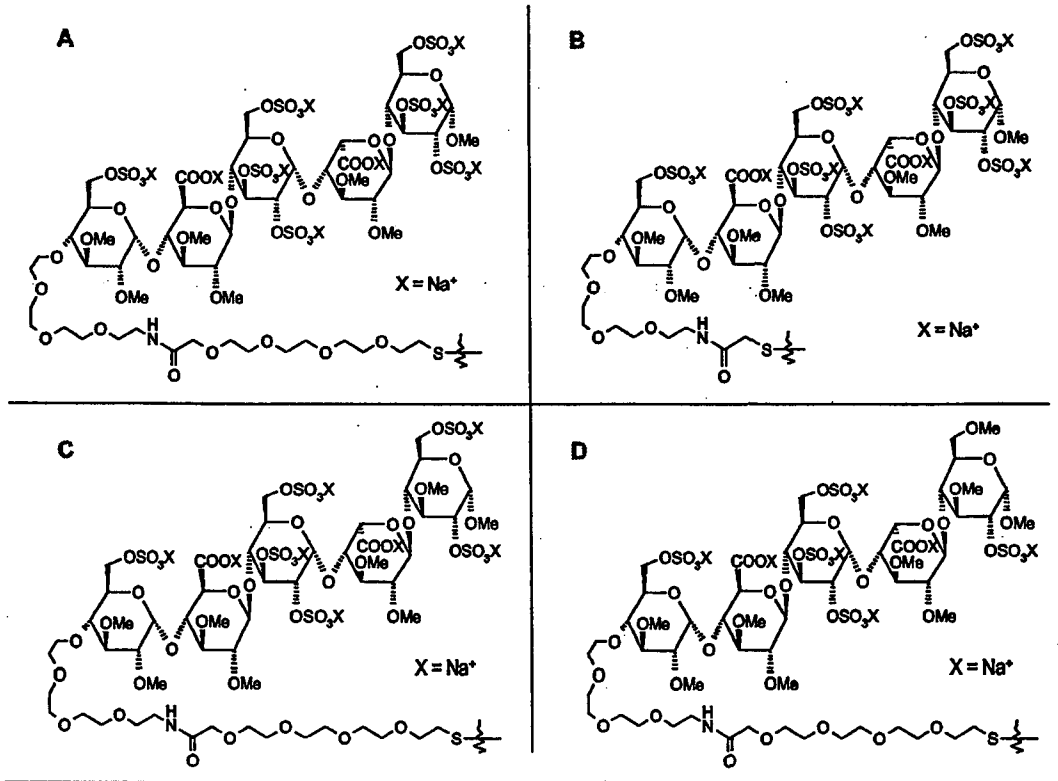
25

19. The conjugate of claim 17 or 18, the spacer comprising at least one $-(CH_2CH_2O)-$ element.

20. The conjugate of claim 1, selected from the structures



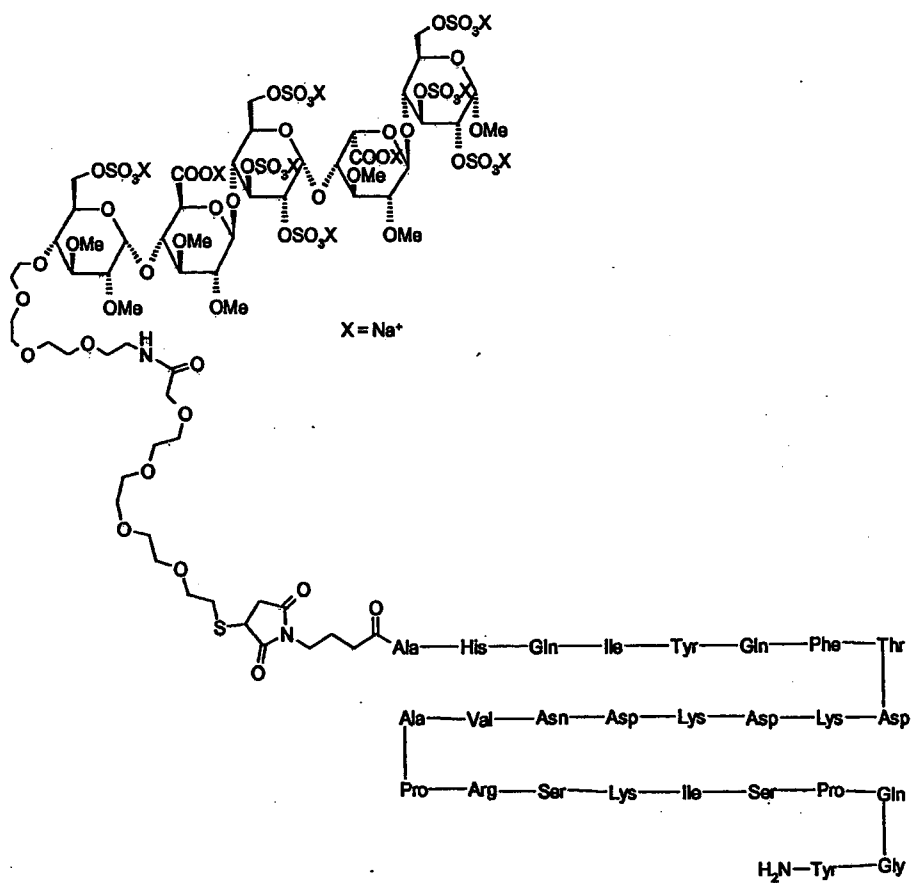
and wherein Y is selected from structures A, B, C and D



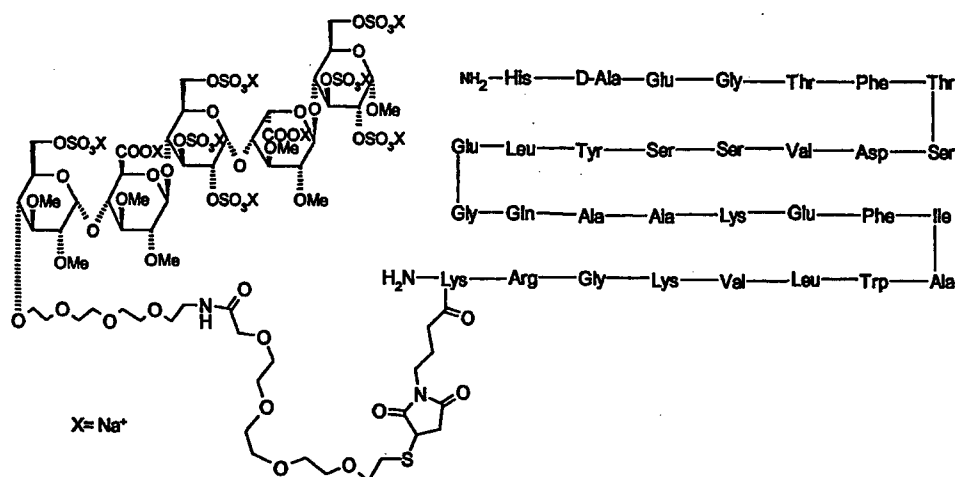
44

21. The conjugate of claim 20, wherein Y is selected from structures A and B.

22. The conjugate of claim 1, having the structure



23. The conjugate of claim 1, having the structure



24. A pharmaceutical composition comprising the conjugate of any one of claims 1 to 23 and pharmaceutically suitable auxiliaries.

25. The conjugate of any one of claims 1 to 23 for use in therapy.

26. Use of the conjugate of any one of claims 1 to 23 for the manufacture of a medicament for treating a patient in need of treatment with a certain therapeutic polypeptide, wherein the medicament comprises the conjugate of any one of claims 1 to 23 which has improved pharmacokinetic properties over said polypeptide.

27. A process for the preparation of a conjugate of a polypeptide and an oligosaccharide, wherein the polypeptide is conjugated to at least one oligosaccharide-spacer residue, the oligosaccharide being a synthetic sulfated oligosaccharide comprising 4-18 monosaccharide units *per se* having affinity to antithrombin III and the spacer being a bond or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue, or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

comprising (a) an optional step wherein the polypeptide is adapted for conjugation, and (b) a coupling step wherein the optionally adapted polypeptide is reacted with an oligosaccharide-spacer molecule.

28. The process of claim 27, wherein the oligosaccharide consists of 4-6 monosaccharide units.

29. The process of claim 27 or 28, wherein the oligosaccharide is a pentasaccharide.

5

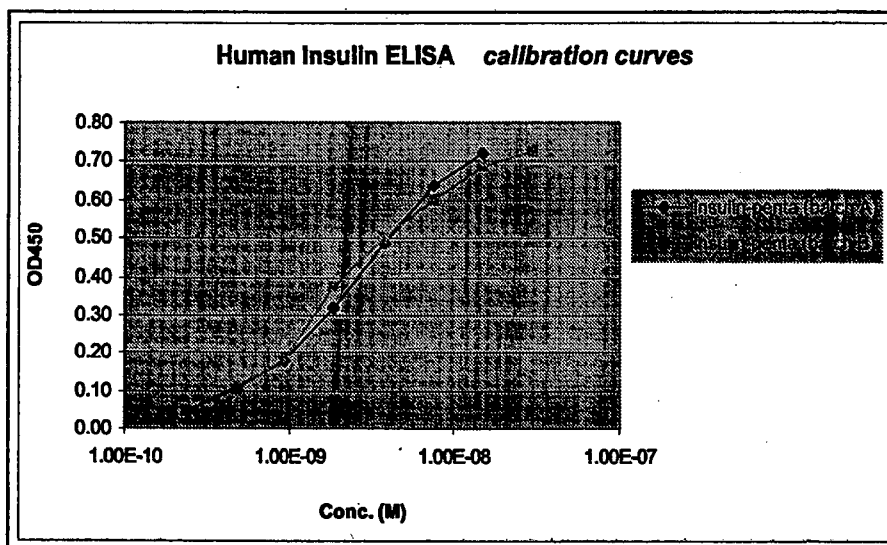
30. A process for the preparation of a therapeutically active conjugate comprising a polypeptide, the conjugate having negligible anticoagulant activity, wherein the conjugate has a longer plasma half-life than the original polypeptide while the biological activity is essentially retained, comprising a step wherein an oligosaccharide being a synthetic sulfated
10 oligosaccharide comprising 4-18 monosaccharide units, which *per se* has affinity to antithrombin III (ATIII), is covalently attached to a polypeptide through a bond or an essentially pharmacologically inactive flexible linking residue.

31. The process of claim 30, wherein the oligosaccharide consists of 4-6 monosaccharide units.

15

32. The process of claim 30 or 31, wherein the oligosaccharide is a pentasaccharide.

FIGURE 1



46

FIGURE 2A

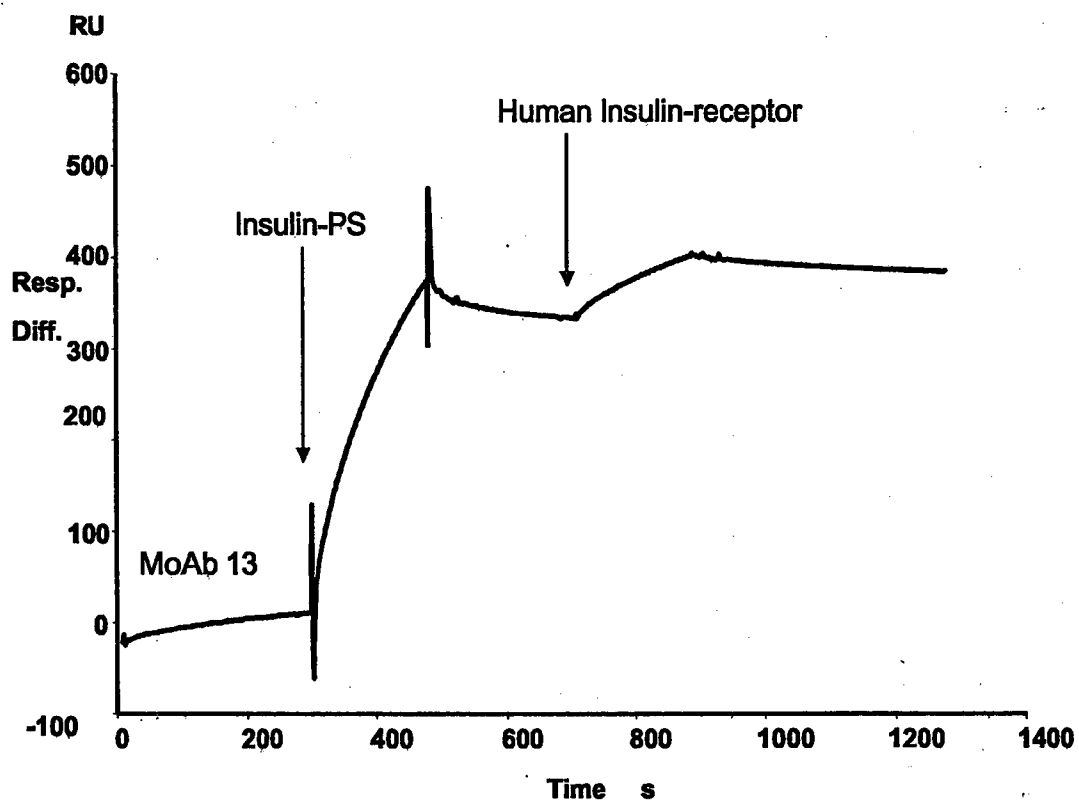


FIGURE 3

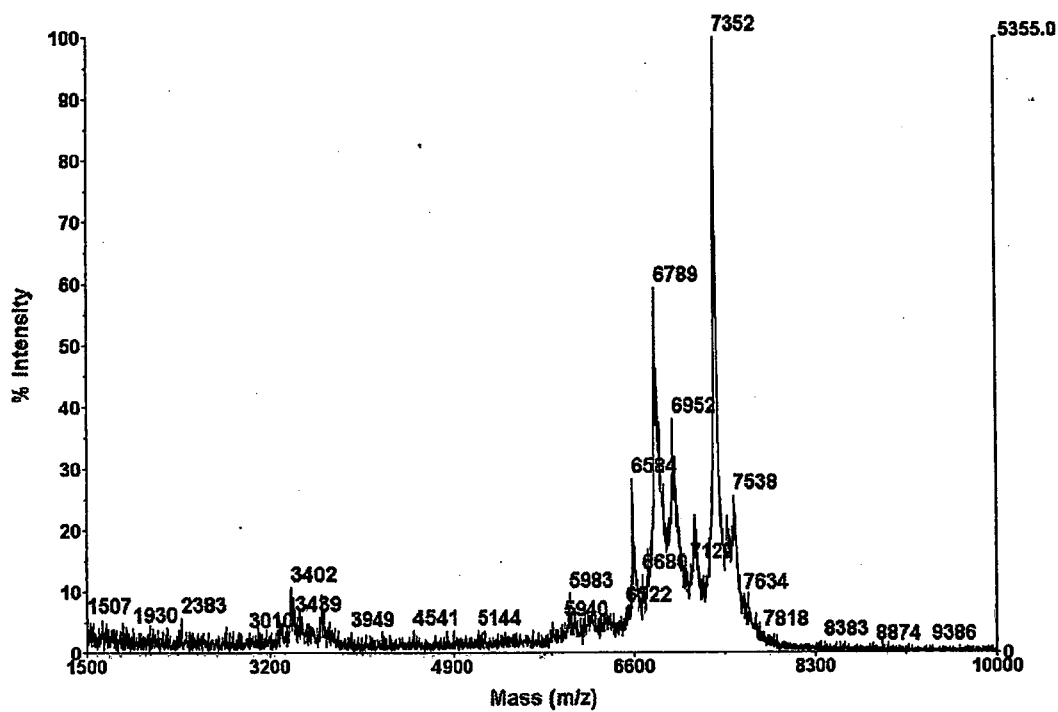


FIGURE 4

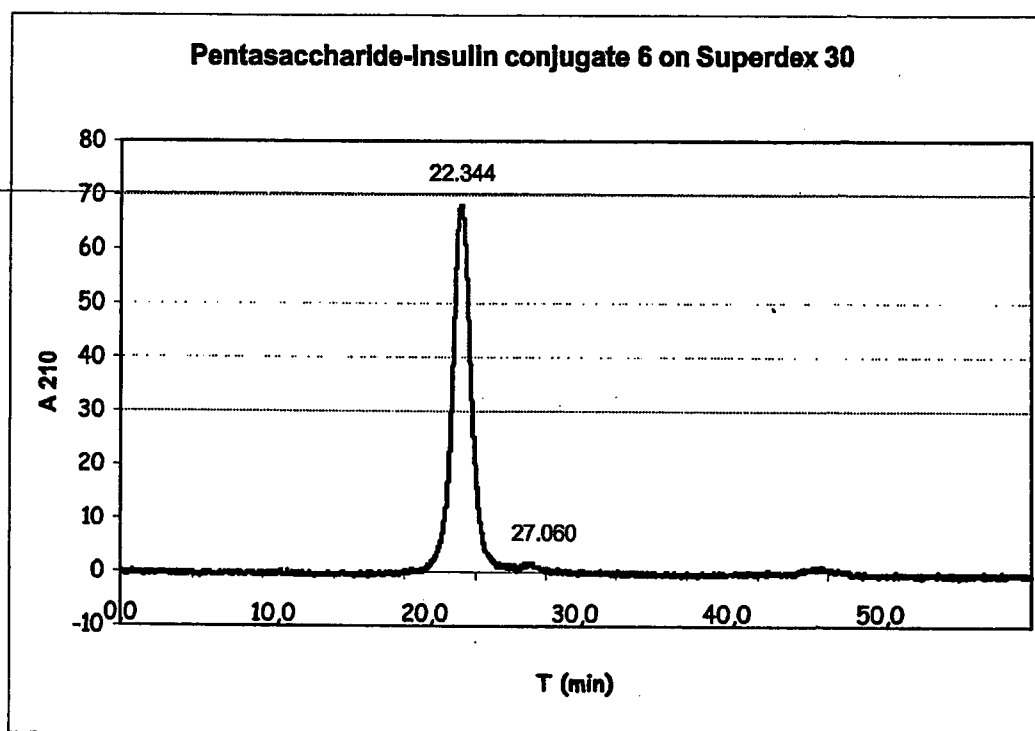


FIGURE 5

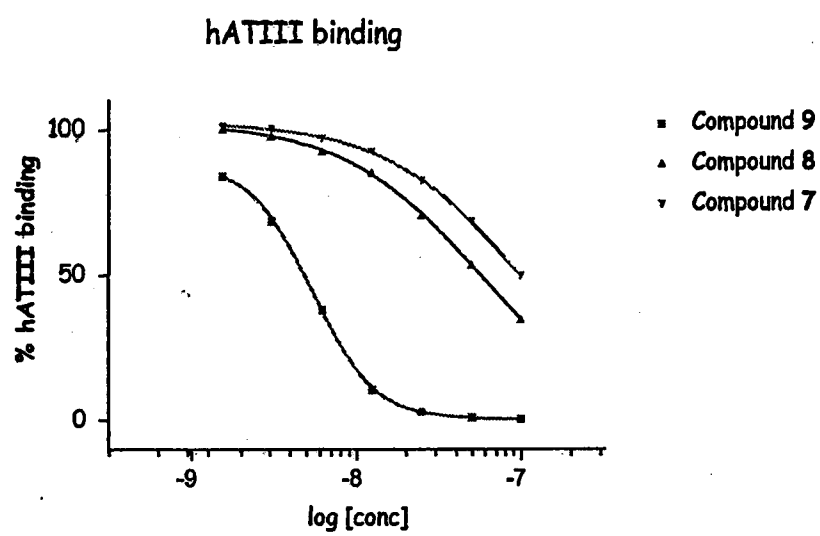


FIGURE 7

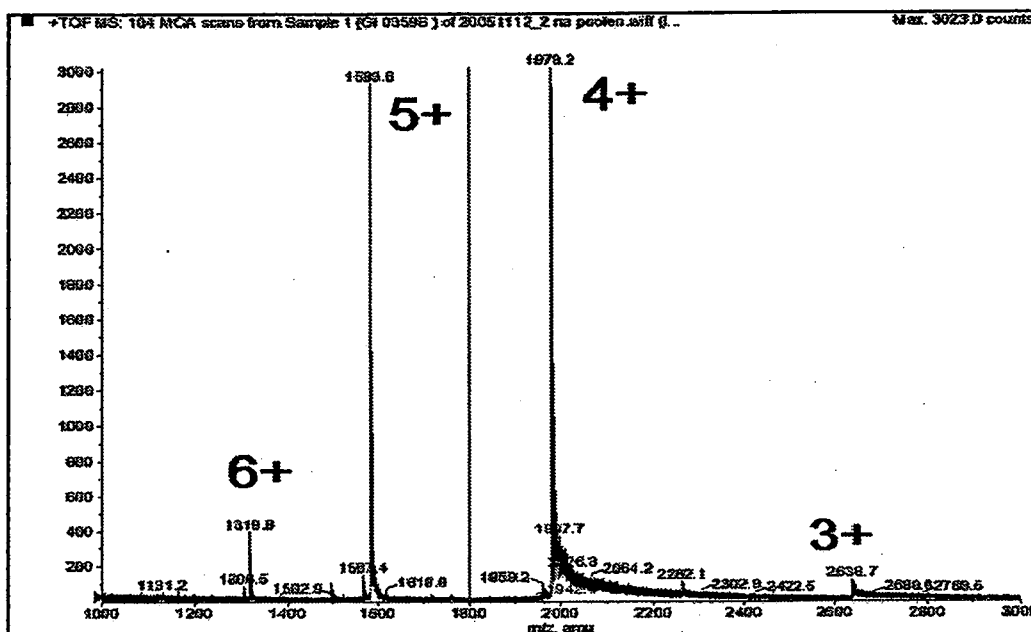


FIGURE 7A

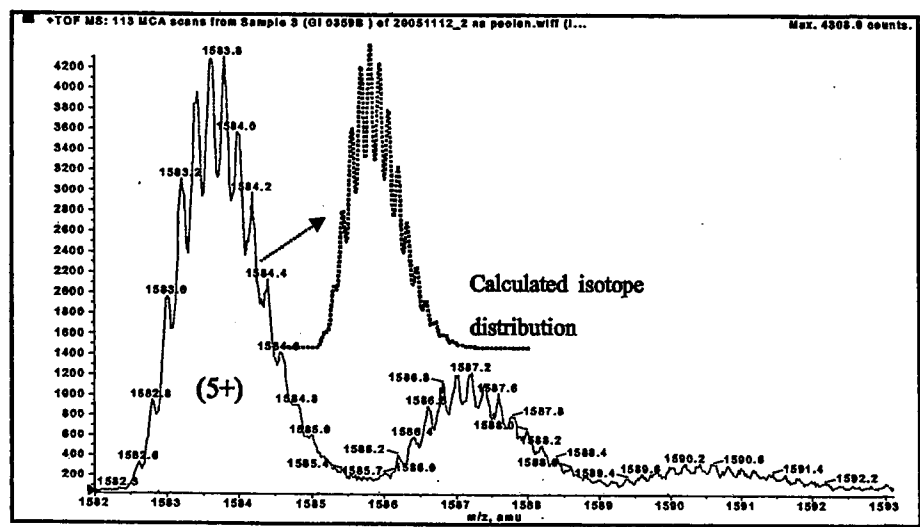


FIGURE 8

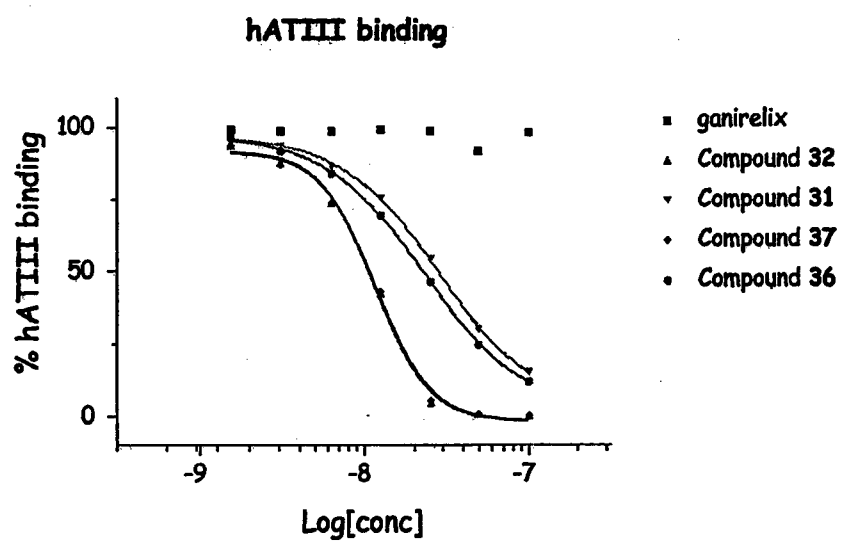


FIGURE 10

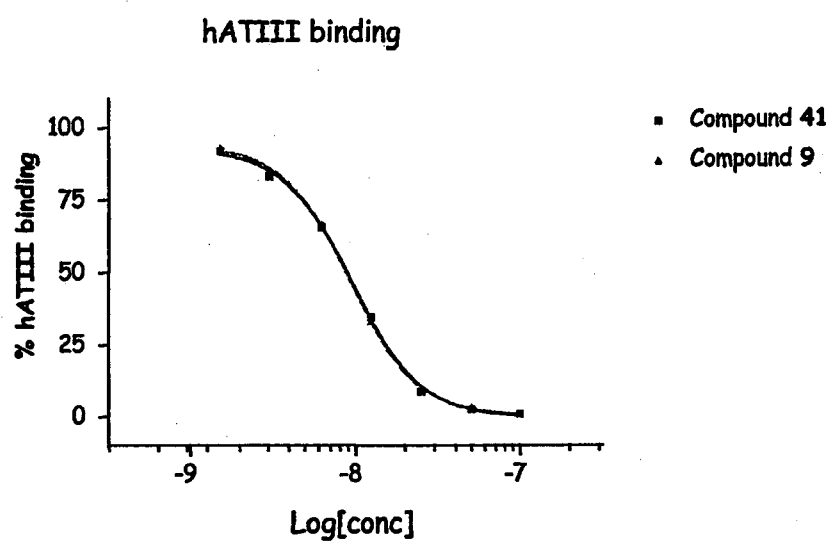


FIGURE 12

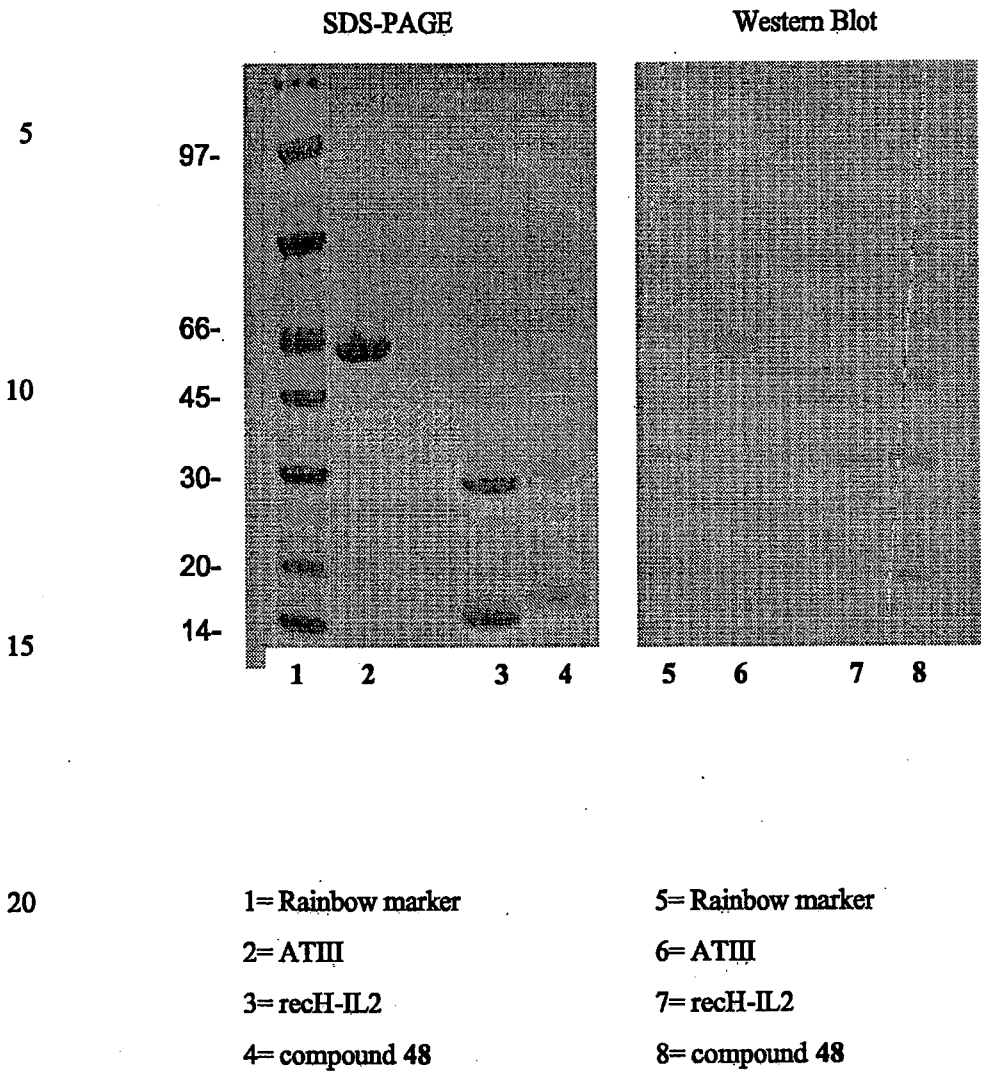


FIGURE 14

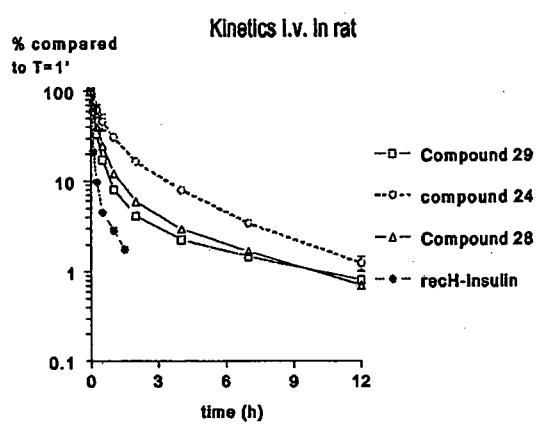


FIGURE 16

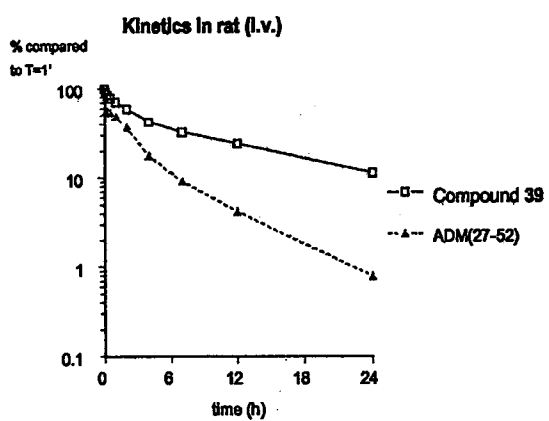


FIGURE 18

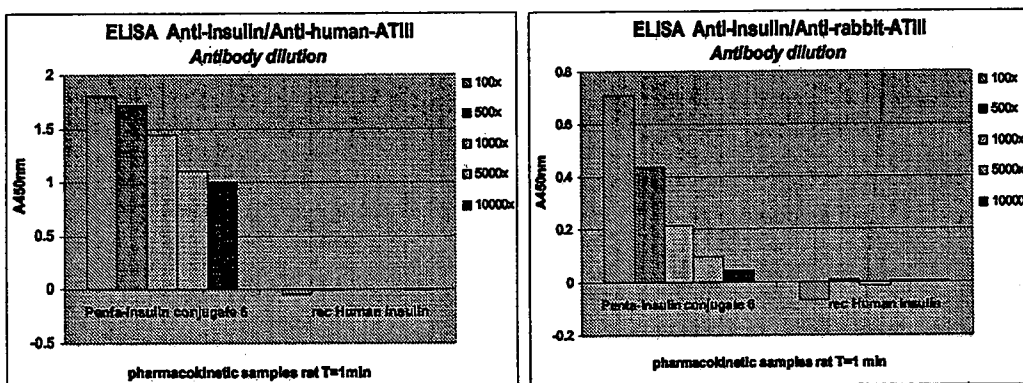
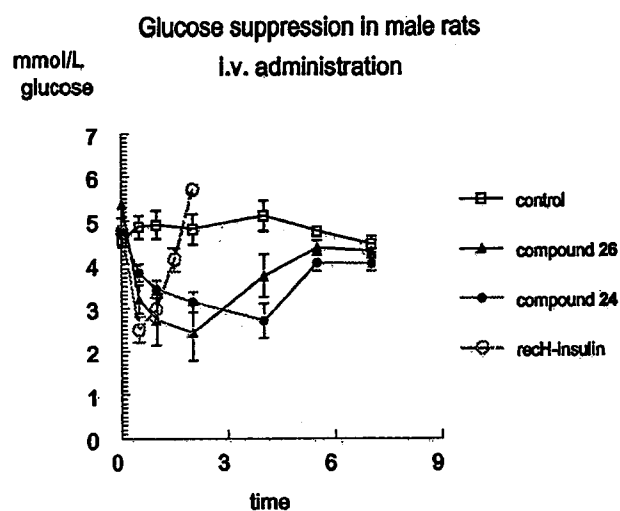
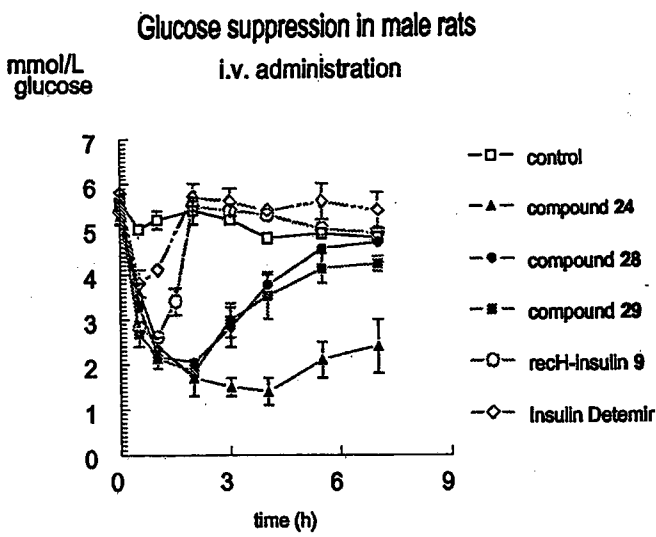


FIGURE 20



57

FIGURE 22



58

CONJUGADOS DE UN POLIPÉPTIDO Y UN OLIGOSACÁRIDO

La presente invención se relaciona con nuevos conjugados de polipéptidos y oligosacáridos, un proceso para su preparación, las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos como ingredientes activos, así como también el uso de dichos compuestos para la elaboración de medicamentos.

Desarrollos recientes de las técnicas de ADN recombinante y los métodos sintéticos de péptido avanzados han permitido la producción comercial de cantidades médicamente útiles de polipéptidos terapéuticos. La corta vida media de muchos polipéptidos terapéuticos, sin embargo, ha sido históricamente un reto para la administración de estos compuestos. Existen varias drogas importantes basadas en polipéptidos corrientemente en uso la cuales se beneficiarían de una vida media incrementada. Ejemplos son la eritropoietina, insulina, interferón α -2b, interferón β , interferón γ , factor estimulante de la colonia de granulocito, la hormona de crecimiento humano, el factor estimulante de la colonia de macrófago de granulocito, relaxina, uroquinasa, estreptoquinasa, activador de plasminógeno de tejido, calcitonina, interleuquina 2 y el factor de necrosis tumoral con vidas medias (significativamente) menores de unas pocas horas. La insulina, por ejemplo, tiene una vida media de solamente aproximadamente 12 minutos en el hombre. Otros ejemplos de polipéptidos que son desarrollados como agentes terapéuticos potenciales pero que sufren de vidas medias cortas son la adrenomedulina, el péptido similar a glucagón (GLP-1) y la quispeptina (metastina). Extender la vida media de los polipéptidos terapéuticos puede mejorar el tratamiento habitual al permitir cantidades y frecuencias de dosificación para ser reducidas (*Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* 2005, 8, 590-600).

Muchas proteínas ya han sido sometidas a estudios con el objetivo de extender la vida media in vivo que emplea por ejemplo la adaptación de PEGilación (es decir, la conjugación con un ~1-30 kDa de una porción de polietilenglicol; *Drug Discovery Today* 2005, 10, 1451-1458). Habitualmente disponibles están por ejemplo los

5 análogos PEGilados de insulina con una vida media extendida. Además de una tasa de depuración reducida, aspectos importantes de los últimos derivados de insulina son la inmunogenicidad reducida (por ejemplo la US 4,179,337) y la solubilidad creciente. Además, los desarrollos en la PEGilación de insulina también conducen a conjugados física y proteolíticamente más estables que la

10 insulina nativa (ver por ejemplo, WO 2004/091494, WO 2002/098232, US 2005/0152848).

La eritropoietina PEGilada con una vida media de sero mayor se describe por ejemplo en la WO 2004/022577. Se ha encontrado adicionalmente que al alterar la

15 glicosilación de la eritropoietina, la vida media se incrementa. Además, los análogos hiperglicosilados o eritropoietina se reportaron por tener mayor actividad *in vivo* (WO 2000/24893. Otros ejemplos de (poli)péptidos PEGilados con duración prolongada de acción son el péptido-1 similar a glucagón (GLP-1) (WO 2005/058954, WO 2004/093823; *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 377-382;

20 *Biomaterials*, 2005, 26, 3597-3606), glucose-dependent insulintropic polipéptido (GIP) (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 4114-4117), calcitonina, (*Pharm. Dev. Technol.* 1999, 4, 269-275) y octreotide (*Pharm. Res.* 2005, 22, 743-749).

Aún, el uso del PEG tiene limitaciones. El PEG se obtiene mediante síntesis

25 química y, como todos los polímeros sintéticos, es polidisperso. Esto significa que una tanda de PEG consiste de moléculas que tienen diferentes números de monómeros, que resultan en una distribución Gaussiana del los pesos

moleculares. Cuando un polipéptido es PEGilado, esto conduce a una colección de conjugados, que pueden tener diferentes propiedades biológicas, en particular en vidas medias e inmunogenicidad. La reproducibilidad de las actividades farmacológicas de los polipéptidos PEGilados puede por lo tanto ser un serio
5 inconveniente de la técnica. También, es conocido que la PEGilación de las proteínas se acompaña a menudo por la pérdida de actividad biológica. Además, el uso de PEG puede originar problemas que se relacionan con la excreción desde del cuerpo. A pesos moleculares altos los PEG pueden acumularse en el hígado, conduciendo a síndrome macromolecular. Consecuentemente, la PEGilación de
10 las drogas se debe desarrollar con gran cuidado.

Resultados similares con PEGilación se obtuvieron mediante la derivación de polipéptidos con polisacáridos, en particular con cadenas de ácido polisiálico (por ejemplo, WO 92/22331 y WO 2001/87922).

15

En la JP 02/231077, se describen conjugados de superóxido dismutasa - XXXXXXXXXX (SOD). Preferiblemente, un número de moléculas de heparina están unidas al SOD dando como resultado conjugados que tienen una vida media mayor que el SOD nativo aunque reteniendo aproximadamente el 90% de la actividad
20 enzimática.

25

Otros conjugados de polipéptidos con una vida media creciente se ejemplifican mediante derivados conjugados de insulina (WO 2003/013573, WO 05/012346 o GLP-1 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4395-4398) que se unen a la sero
albúmina circulante. La unión a la sero albúmina en aquellos componentes está basada en particular en interacciones hidrófobas de la porción de unión dentro del conjugado con la sero albúmina humana. Entre mayor sea la hidrofobicidad de esa

porción, mayor la afinidad de unión a la sero albúmina humana. Aunque un amplio rango de porciones de unión es adecuado, un inconveniente de tales conjugados es la baja afinidad y selectividad de la interacción de los conjugados con la sero albúmina humana como un resultado de una pobre predictabilidad del comportamiento farmacodinámico. De manera alternativa, fusionando el gen para la insulina humana directamente a aquel para la sero albúmina humana se resulta en una forma de larga acción de insulina que es activa para reducir los niveles de glucosa de la sangre durante un período prolongado después de la administración subcutánea (Duttaroy *et al. Diabetes* 2005, 54, 251-258). Sin embargo, en este caso la biodisponibilidad del polipéptido fusionado, así como también la afinidad de unión para el receptor objetivo, se reduce.

Además, en la WO 2000/40253 se describen conjugados de, por ejemplo, un péptido y, específicamente, la o las cadenas de glicosaminoglicano, que son consideradas como proteoglicanos sintéticos. En aquellos conjugados la actividad farmacológica del glicosaminoglicano conjugado tiene un impacto significativo sobre la actividad terapéutica de los conjugados.

También los oligosacáridos están unidos a compuestos farmacéuticamente activos con el fin de incrementar la solubilidad de estos (WO 2004/03971).

La presente invención se relaciona con nuevos conjugados de polipéptidos con vidas medias crecientes, que son conjugados de un polipéptido y un oligosacárido, en donde el polipéptido es conjugado a al menos un residuo espaciador de oligosacárido sintético sulfatado, el oligosacárido comprende 4-18 unidades de monosacárido y *per se* tiene una afinidad con la antitrombina III y el espaciador es una unión o un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente

inactivo, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. Los oligosacáridos preferidos consisten de 4-6 unidades de monosacárido y en particular son preferidos los pentasacáridos. Los conjugados de la invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas y así propiedades farmacológicas mejoradas cuando
5 se comparan con los polipéptidos originales (es decir, los correspondientes polipéptidos no conjugados *per se*).

La presente invención se relaciona además con una tecnología novedosa basada en un proceso para la preparación de un conjugado terapéuticamente activo que
10 comprende un polipéptido y tiene una actividad anti-trombótica despreciable, que comprende una etapa en donde el oligosacárido sintético sulfatado, en particular un pentasacárido, que *per se* tiene afinidad con la antitrombina III (ATIII), está covalentemente unido a un polipéptido a través de una unión o un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo.

15

El ATIII es un inhibidor de serina proteasa, presente en el plasma sanguíneo, que interrumpe la cascada de coagulación para suministrar un circuito de retroalimentación. La vida media de un pentasacárido sulfatado está esencialmente basada en su afinidad con el ATIII (*ver por ejemplo*, F. Paolucci *et al. Clin. Pharmacokinet.* 2002; 41 Suppl. 2: 11-18). En los conjugados de esta
20 invención la vida media del suero es mayor que la vida media del polipéptido original como resultado de la vida media del pentasacárido la cual cuenta de manera importante para la vida media del conjugado. Adicionalmente, los conjugados de la invención no solamente tienen una vida media mayor, sino que
25 ellos también tienen propiedades farmacocinéticas sintonizables basadas en la interacción específica entre la parte del pentasacárido del conjugado y el ATIII (la última interacción se describe por ejemplo en Westerduin *et. al. Bioorg. Med.*

63

Chem. 1994, 1267-1280; van Ámsterdam *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15;495-503). En una modalidad de la presente invención el conjugado oligosacárido-polipéptido (el oligosacárido en particular consiste de 4-6 unidades de monosacárido y más particularmente siendo un pentasacárido) tiene un nivel

5 de plasma circulante de ≤ 50 nM. Hasta esta concentración la actividad anticoagulante mediada por ATIII del oligosacárido (en particular pentasacárido) es insignificante en particular con respecto a los riesgos de sangrado. (ver por ejemplo (1) F. Donat *et al.*, *Clin, Pharmacokinet.* 2002; 41 Suppl. 2: 1-9; (2) S. J. Keam *et al. Drugs* 2002; 62 (11):1673-1685 y (3) The Rembrandt Investigators

10 *Circulation* 2000; 102: 2726-2731). De acuerdo con una modalidad de esta invención, el oligosacárido (en particular que consiste de 4-6 unidades de monosacárido y más particularmente que es un pentasacárido) utilizado en los conjugados *per se* tiene una actividad anticoagulante que es un nivel subterapéutico cuando se comparan con la actividad farmacológica del polipéptido

15 *per se*. Subterapéutico a este respecto significa: tener un efecto inferior del terapéutico y sin efectos colaterales, tal como riesgos de sangrado. Por ejemplo, los pacientes con diabetes tipo I requieren inyecciones de insulina (vida media larga) para complementar los niveles de plasma terapéutico (basales) de $\sim[0.1-1.0]$ nM, que están en el rango subterapéutico de los pentasacáridos utilizados en los

20 presentes conjugados. Una persona experta en la técnica entenderá como seleccionar los conjugados con un balance adecuado entre los niveles terapéuticos del polipéptido y el pentasacárido, respectivamente.

Los polipéptidos en los conjugados de la presente invención retienen su actividad

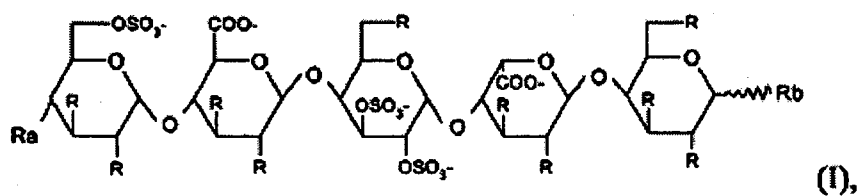
25 biológica. Adicionalmente, el comportamiento farmacocinético lineal del pentasacárido unido a ATIII en los conjugados de esta invención cuenta con un efecto terapéutico altamente predecible de los polipéptidos conjugados, en razón a

64

que los conjugados permanecen mayormente en el compartimento intravascular después de i.v. o de dosificaciones s.c.

El residuo de oligosacárido en los conjugados de esta invención es un residuo de un oligosacárido sintético sulfatado el cual *per se* tiene afinidad con la antitrombina III (ATIII). Los oligosacáridos sulfatados, y en particular los pentasacáridos, tienen generalmente afinidad con el ATIII, sin embargo, una persona experta en la técnica puede fácilmente revisar la afinidad de un oligosacárido con el ATIII (van Amsterdam *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:495-503) y seleccionar el nivel de afinidad deseado. Los residuos de oligosacárido sintéticos adecuados y en particular los residuos de pentasacáridos se pueden derivar de los oligo y pentasacáridos descritos en la EP 0,454,220, la EP 0,529,715, WO 98/03554, la WO 99/36428, *J. Med. Chem.* 2005; 48,349-352, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* 1994, 32,1671-1690 y similares.

Los residuos de oligo y pentasacárido se pueden conjugar al polipéptido directamente o por vía de un residuo de enlace unido a una cualquier posición químicamente adecuada dentro del residuo de pentasacárido. Por lo tanto, en una modalidad de esta invención los conjugados son conjugados en donde el residuo espaciador de oligosacárido tiene la estructura (I)

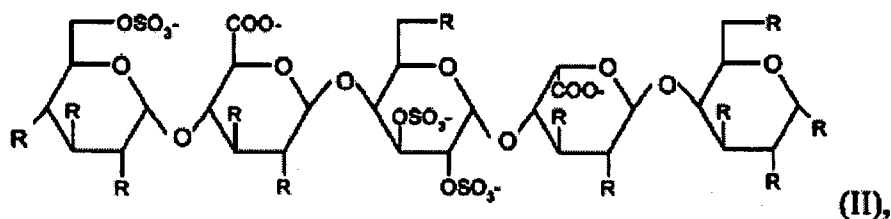


en donde un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo está presente y en donde R es independientemente OSO_3^- , alcoxi(1-8C) o un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo, y

- 5 Ra es independientemente OSO_3^- , alcoxi(1-8C), un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo o un residuo de oligosacárido, que comprende 1-13 unidades de monosacárido, y

Rb es independientemente alcoxi(1-8C), un residuo de enlace flexible
10 esencialmente farmacológicamente inactivo o un residuo de oligosacárido, que comprende 1-13 unidades de monosacárido, siendo la carga compensada por contraiones cargados positivamente.

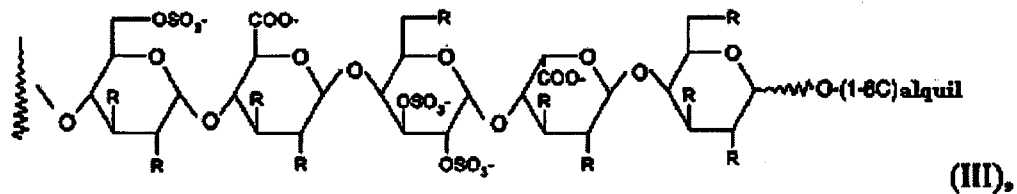
Más preferidos son los conjugados en donde el residuo de oligosacárido-
15 espaciador es un residuo pentasacárido-espaciador que tiene la estructura (II)



en donde un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo
20 está presente y en donde

R es independientemente OSO_3^- o alcoxi(1-8C), o un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo, siendo la carga compensada por contraiones cargados positivamente.

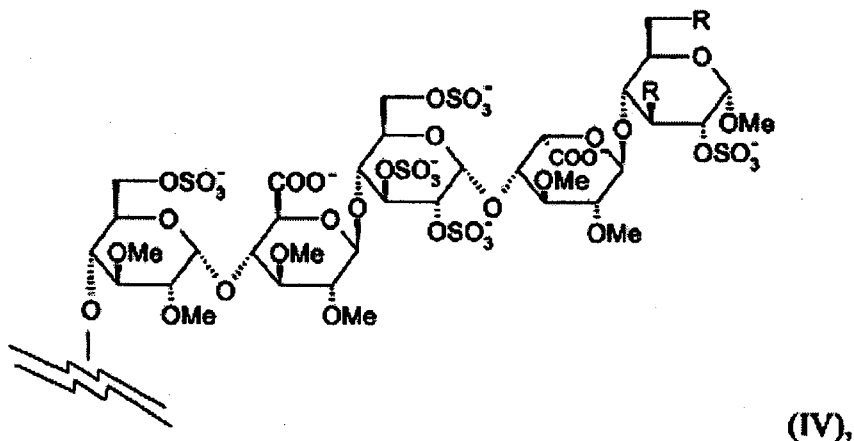
Adicionalmente preferidos son los conjugados en donde el residuo de pentasacárido tiene la estructura (III)



5

En donde R es independientemente OSO_3^- o alcoxi(1-8C), siendo la carga compensada por contraiones cargados positivamente.

Los compuestos altamente preferidos de acuerdo con la invención son
10 compuestos en donde el residuo de pentasacárido tiene la estructura (IV)



En donde R es independientemente OCH_3 u OSO_3^- , y en particular ambos grupos

15 R en (II) son OSO_3^- .

De acuerdo con esta invención, los residuos de oligosacárido sintéticos sulfatados, en particular los residuos de pentasacárido, con afinidad a ATIII se pueden conjugar a cualquier polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un péptido

67

bioactivo (por ejemplo, de 3 a 50 aminoácidos de largo) o puede ser un polipéptido mayor que puede o puede no tener actividad catalítica. Ejemplos no limitantes de péptidos bioactivos incluyen neurotransmisores tales como conantoquina G, dinorfina, endorfina, encefalina, o neurotensina; activadores gástricos tales como bombesina, motilina, o gastrina; reguladores de calcio tales como calcitonina u hormona paratiroide (PTH); moduladores de la reabsorción de hueso tales como osteoprotegerina (OPG); estimuladores de la actividad osteoblástica tales como adrenomedulina o derivados truncados de ésta tales como ADM(27-52); hormonas tales como polipéptido intestinal vasoactivo, corticotropina, secretina; inhibidores de hormona tales como somatostatina; estimuladores de hormona tales como hormona estimuladora de melanocito, factor de liberación de hormona luteinizante, o sermorelina; agentes anti-diabéticos tales como glucagones, amilina, péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) o derivados truncados de éstos tales como GLP-1(7-36), GLP-2, polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) o insulina ("Humulina", Eli Lilly); anti-infecciosos tales como lisostafina; hormonas supresoras del apetito tales como obestatina; los vasoconstrictores tales como la angiotensina II; los vasodilatadores tales como la bradiquina, la sustancia P o la calidina; los agentes natriuréticos tales como el polipéptido natriurético atrial (ANP); las hormonas antidiuréticas tales como la vasopresina o la desmopresina; y los agentes oxitócicos tales como la oxitocina. Ejemplos adicionales de polipéptidos que se pueden utilizar incluyen la hormona de crecimiento humana ("Humantropo", Genentech); rLH; rG-CSF ("Neupogen", Amgen); eritropoietina ("Epogen", Amgen); interferón α -2a, interferón β , o interferón γ ; factor VIII u otros factores de coagulación de la sangre tales como la proteína C o el Factor VIIa; la hormona estimulante del folículo (FSH); una citoquina tal como una interleuquina (IL) (por ejemplo, IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, o -18); la hemoglobina; la superóxido dismutasa; el CD4 soluble o el receptor CD4; los análogos de plaqueta

68

GpIIb/IIIa y sus receptores ("ReoPro", Johnson & Jonson); la glucocerebrosidasa ("Ceredaza" o "Cerezyme", Genzima); el ACTH; la somatotropina; la hormona paratiroide, la hormona antidiurética; la prolactina; el rHGH, tales como el pegvisomant ("Somavert", Pfizer); los agonistas GnRH, tales como el leuprolide ("Lurpon", "Leprorelin", Takeda) o nafarelina ("Synarel", Roche) y los antagonistas GnRH, tales como el ganirelix ("Antagon", Organon); los agonistas GHRH, tales como la sermorelina ("Geref", Serono); la octreotida ("Sandostatina", Novartis); o los trombolíticos tales como estreptoquinasa, estafiloquinasa, uroquinasa, o el activador de plasminógeno de tejido ("Activaza", Genentech); la metastina (KISS1 o kisseptina-54) o los derivados truncados de ésta tales como la kisseptin-10.

Los polipéptidos preferidos tienen un peso molecular de ~0.3 – 50 kDa. Otros polipéptidos preferidos tienen un peso molecular de ~0.3 – 20 kDa. También se prefieren los polipéptidos que tienen un peso molecular de ~0.3 – 7.5 kDa.

15

Los polipéptidos adicionales preferidos son insulina ($t_{1/2}$ = 12 min; Pm = 5.8 kDa), la clacitonina ($t_{1/2}$ = 20 min; Pm = 3.4 kDa), GLP-1 (7-36) ($t_{1/2}$ = 6 min; Pm = 3.4 kDa), la adrenomedulina ($t_{1/2}$ = 20 min; Pm = 6.0 kDa), ADM (27-52) (Pm 3.0 kDa), octreotida ($t_{1/2}$ = 1.7 h, Pm = 1.0 kDa), interleuquina-2 ($t_{1/2}$ = 20 min; Pm = 15 kDa) y el ganirelix ($t_{1/2}$ = 12 h; Pm = 1.6 kDa). En particular se prefiere la insulina y el [D-Ala⁸]-GLP-1(7-36). Una modalidad adicional de esta invención es un conjugado de polipéptido monosustituido con un residuo espaciador de pentasacárido.

25

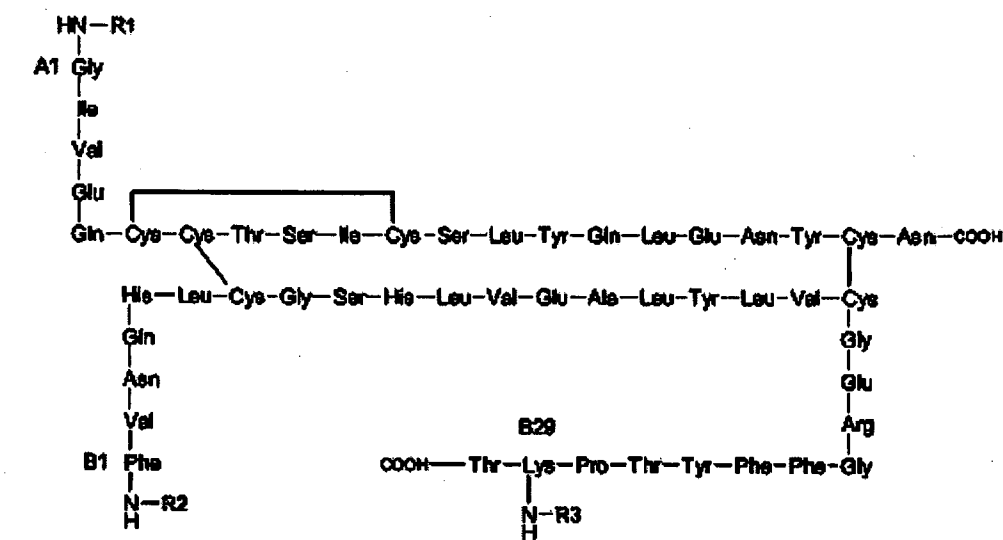
El espaciador es una unión o un residuo de enlace, flexible, esencialmente farmacológicamente inactivo. Preferiblemente, el espaciador es un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo, en particular que tiene

de 10-50 átomos contados a lo largo de la "estructura" del espaciador, el oxígeno del residuo del oligosacárido no incluido. El término "esencialmente farmacológicamente inactivo" como se utiliza aquí significa que el espaciador no contiene átomos o grupos que muestren actividad farmacológica *per se* en dosis en las cuales los compuestos de la invención son terapéuticamente efectivos. Así, en dosis en las cuales los compuestos de la presente invención se utilizan como drogas terapéuticas, la naturaleza del espaciador no conduce a efectos colaterales farmacológicos demostrables.

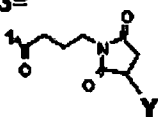
- 10 El espaciador puede comprender elementos (un poco rígidos), tales como las estructuras del anillo y uniones insaturadas. El espaciador de los compuestos de la invención es preferiblemente flexible. Los espaciadores adecuados pueden ser fácilmente diseñados por una persona experta en la técnica. Por razones sintéticas los espaciadores mayores son considerados menos adecuados, sin embargo, los espaciadores más largos pueden aún ser exitosamente aplicados en los compuestos de la presente invención. Los espaciadores preferidos comprenden al menos un elemento $-(CH_2CH_2O)-$.

- Los ejemplos representativos de los conjugados de la presente invención son
- 20 conjugados de las siguientes estructuras:

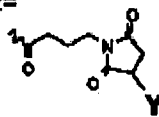
70



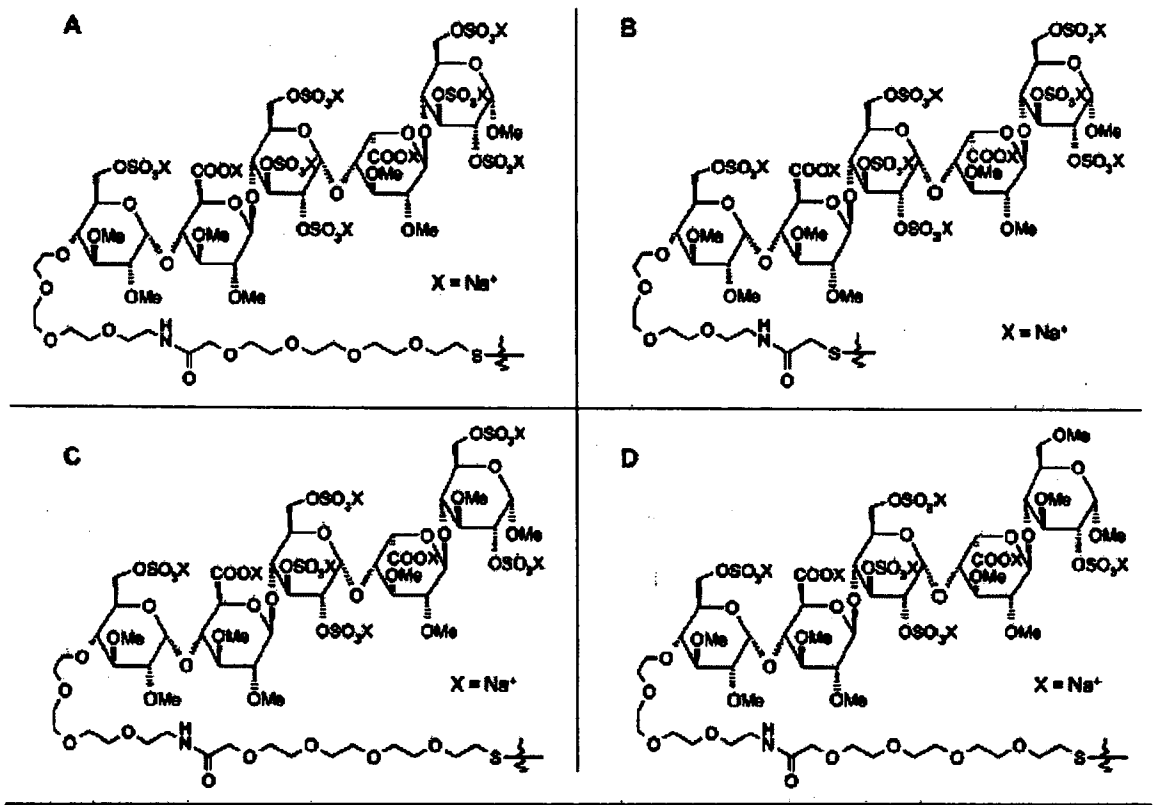
en donde R1=R2=H, R3=



o en donde R1=R3=H, R2=



y en donde Y se selecciona de las estructuras A, B, C y D



71

u otras sales de éstos, pero también conjugados en donde el espaciador es uno diferente o está unido al pentasacárido en otra posición. Se prefiere la sal de sodio. Y preferiblemente, Y se selecciona de las estructuras A y B.

- 5 Las abreviaturas químicas comúnmente utilizadas que no son explícitamente definidas en esta descripción se pueden encontrar en The American Chemical Society Style Guide, Segunda Edición, American Chemical Society, Washington, DC (1997), "2001 Guidelines for Authors" *J. Org. Chem.* 66(1), 24A (2001), "A Short Guide to Abbreviations and Their Use in Polypeptide Science" *J.*
10 *Polypeptide. Sci.* 5, 465-471 (1999).

El término polipéptido se refiere a una cadena de al menos tres aminoácidos, sin importar las modificaciones post-transduccionales. Los polipéptidos pueden ser de
15 ocurrencia natural, químicamente sintetizados, o polímeros recombinantemente producidos de aminoácidos. Los polipéptidos que tienen tres a 50 aminoácidos típicamente son clasificados como péptidos.

La frase "polipéptido con actividad catalítica" significa una enzima.

- 20 El término insulina como se utiliza aquí se refiere al polipéptido hipoglicémico de ocurrencia natural encontrado en mamíferos, incluyendo los humanos, ratas, cerdos de guinea, y conejos, así como también insulina recombinante y polipéptidos hipoglicémicos similares descritos en las patentes US 4,652,525, 4,431,740, 5,268,453, 5,506,202, 5,514,646, y 5,700,662.

25

En la descripción de los conjugados de la invención se utilizan además las siguientes definiciones.

Los términos alquilo(1-4C) y alquilo(1-8C) significan un grupo alquilo ramificado o no ramificado que tiene de 1-4 y de 1-8 átomos de carbono, respectivamente, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, hexilo y octilo. Los grupos alquilo preferibles son el metilo y el etilo.

El término alcoxi(1-8C) significa un grupo alcoxi que tiene 1-8 átomos de carbono, teniendo la porción alquilo el significado como se definió previamente. Metoxi es el grupo alcoxi preferido.

La longitud espaciadora es el número de átomos del espaciador, contado a lo largo de la cadena más corta entre el residuo de oligosacárido y el polipéptido, no contando el átomo de oxígeno del residuo de oligosacárido que se conecta al espaciador.

Una modalidad de esta invención es además un proceso para la preparación de un conjugado terapéuticamente activo que comprende un polipéptido, el conjugado tiene actividad anti-trombótica despreciable, en donde el conjugado tiene una vida media de plasma mayor que el polipéptido original aunque la actividad biológica es sometida esencialmente, comprendiendo una etapa en donde el oligosacárido sintético sulfatado, en particular en donde el oligosacárido consiste de 4-6 unidades de monosacárido, y más particularmente es un pentasacárido sulfatado, *per se* que tiene afinidad con la antitrombina III está unido al polipéptido, opcionalmente a través de un residuo de enlace flexible esencialmente farmacológicamente inactivo.

Aspectos sintéticos y analíticos generales

Síntesis de pentasacáridos

5 El oligosacárido que se une a ATIII, en particular el pentasacárido, de los compuestos de la presente invención se puede preparar como se describe por ejemplo en *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* 1994, 32,1671-1690. Diferentes oligo y pentasacáridos con afinidad alterada para ATIII se pueden obtener al variar los bloques de construcción intermedios mono, di o tetrasacárido, por ejemplo, mediante la introducción de grupos alquilo (permanentes) o la aplicación de diferentes grupos protectores (temporales) dando acceso a diferentes oligo y pentasacárido sulfatados en una forma controlada (por ejemplo Westerdu en *et. al. Bioorg. Med. Chem.* 1994, 1267). El espaciador se puede introducir como se describe por ejemplo en la WO 2001/42262. La molécula espaciadora oligo y pentasacárida puede además ser derivada con residuos enlazantes tales como un grupo gama-maleimido butiril (GMB), el grupo N-hidroxiscinimida (NHS) o el grupo tiol opcionalmente protegido (por ejemplo, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* 1996, 35, 331-333) para permitir el acoplamiento directo con un polipéptido opcionalmente modificado.

20

Conjugación

En general, los conjugados de la invención son producidos de acuerdo a un proceso que comprende (a) una etapa opcional en donde el polipéptido se adapta para conjugación, y (b) una etapa de acoplamiento en donde el polipéptido opcionalmente adaptado reacciona con una molécula espaciadora de oligo o pentasacárido.

25

74

Los métodos sintéticos generales para la producción de bioconjugados se describen en "Bioconjugate Techinques" por Greg T. Hermanson, 1996, Academic Press. Además, la conjugación se puede considerar una ligación Staudinger (tal como se describió por K.L. Kück *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002; 99:19-24) o una cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen utilizando un derivado de pentasacárido y el polipéptido independientemente modificado con un grupo funcional alquino o ácido. Alternativamente, las reacciones enzimáticas tales como la elongación mediada por proteasa IgA regioselectiva de los polipéptidos en el terminal N (como se describe por M. Lewinska *et al. in Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 231-234) o la introducción de transglutaminasa catalizada de un espaciador amino que contiene oligosacáridos (como se describe por M. Sato *et al. en J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14013-14022) se pueden adaptar para la conjugación de un residuo espaciador de pentasacárido a un polipéptido opcionalmente modificado.

Además, la PEGilación de por ejemplo insulina, GLP-1 y octreotide están bien documentadas. En estas proteínas, una porción PEG de ~5-30 kDa se puede introducir sin abolir sus actividades biológicas; tales estrategias se pueden seguir para la introducción (específica de sitio) de una porción pentasacárido(espaciadora). Además, es un prerrequisito que la unión del pentasacárido-conjugado al ATIII (~50 kDa) no tenga un efecto deleterio sustancial sobre la actividad biológica del polipéptido.

Insulina: las funciones amino lisina N-terminal B-1 y C-terminal B-29 cercano no son esenciales para la bioactividad de la insulina. La insulina B1-PRGilada ha sido preparada (S.W. Kim *et al., Adv. Drug Del. Rev.* 2002, 54, 505-530) en 20% de rendimiento total por vía de reacción con un derivado de PEG activado con N-

75

hidroxisuccinimida (NHS) con insulina protegida con di-N-Boc. Reacción similar del reactivo de acoplamiento bifuncional tal como el éster de N-maleimidobutiriloxi succinimida (GMBS) da acceso a conjugados de pentasacárido de insulina modificada con B1. Alternativamente, el residuo Lys B29 de la insulina Zn^{2+} se puede modificar selectivamente con un exceso de éster NHS a un pH de ~10-11 con un rendimiento de ~60%. Otros métodos bien establecidos para la conjugación regioselectiva a la insulina se pueden adaptar de la WO 98/02460, WO 2004/091494, WO 2005/012346, US2005/0152848, Jensen *et al.* *J. Pept. Sci.* 2005, 11, 339-346, Lee *et al.* *Bioconj. Chem.* 2005, 16, 615-620, Jain *et al.* *Biochim. Biophys. Act.* 2003, 1622, 42-49, Tessmar *et al.* *Tissue Engin.* 2004, 10, 3, 441-453).

Ganirelix: los derivados de éster NHS de un pentasacárido se pueden conjugar al grupo amino N-terminal libre del ganirelix de-N-Ac o un espaciador amino que tiene el derivado de pentasacárido puede ser conjugado, opcionalmente por vía de un espaciador adicional, al grupo ácido carboxílico terminal libre desamido ganirelix que puede a su vez ser obtenido mediante síntesis de péptido adelantada (fase sólida) como se describe por ejemplo, en *J. Med. Chem.* 1992, 35, 3942-3948.

20

Octreotide: El residuo de amino ácido D-Phe N-terminal de octreotide, un péptido comercialmente disponible, se puede modificar con hasta 4 kDa de PEG sin abolir la bioactividad (D. Hee *et al.* *Pharm. Res.* 2005, 22, 743-749). La funcionalización regioespecífica del grupo amino N-terminal se puede lograr con un exceso de reactivo enlazante de éster NHS bifuncional a un pH de ~6, luego de lo cual se puede efectuar la conjugación adicional a un vehículo pentasacárido de acuerdo con los métodos sintéticos generales para la producción de bioconjugados como

25

76

se describió anteriormente (por ejemplo mediante la conjugación de un residuo espaciador pentasacárido que contiene un grupo tiol a un derivado de maleimida de octreotride).

- 5 ADM(27-52): La mitad N-terminal de la adrenomedulina de longitud completa (ADM) no es esencial para su actividad osteogénica y el efecto inhibitorio sobre la calcificación vascular. La conjugación regioespecífica de un residuo espaciador pentasacárido al residuo Ala N-terminal de ADM(27-52) se puede lograr al sintetizar opcionalmente un ADM(27-52) N-terminalmente modificado utilizando
- 10 métodos bien establecidos que emplean síntesis de péptido de fase sólida y métodos sintéticos generales para la producción de los bioconjugados como se describió anteriormente.

- [D-Ala⁸]-GLP-1(7-36): La porción C-terminal de GLP-1(7-36) y sus derivados tales
- 15 como la Exendin-4(1-39) forman una estructura α -helicoidal en la cual los residuos de amino ácido están expuestos que son importantes para la unión al receptor. La extensión de esta secuencia de amino ácido con un residuo de lisina adicional que es modificado en la posición N^ε con una función de maleimida, utilizando una síntesis de péptido de fase sólida adaptada como se describe por ejemplo en la
- 20 WO 2005/058954, exhibe aún una unión al receptor y una actividad funcional *in vivo* después de la unión covalente del amino ácido Cys³⁴ de la sero albúmina humana, aunque la estabilidad proteolítica se puede mejorar (adicionalmente) al incorporar un residuo D-Ala en la posición 2 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4395-4398). De una manera similar el GLP-1(7-36) o análogos de éste se pueden
- 25 conjugar a una porción espaciadora de pentasacárido adecuadamente funcionalizada (por ejemplo, que contiene un grupo tiol). Alternativamente, un amino ácido Cys se puede incorporar en la secuencia de péptido, preferiblemente

77

en la ó las posiciones 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 34, 35 o 36 o ser agregada en la posición 37, y la cual se puede acoplar a una porción espaciadora de pentasacárido adecuadamente funcionalizada (por ejemplo, que contiene un grupo maleimida), utilizando métodos similares como se describieron para la

5 PEGilación de los derivados GLP-1 (WO 2004/093823). Adicionalmente, los conjugados del GLP-1 se pueden obtener mediante acoplamiento directo a un reactivo enlazante de éster NHS bifuncional a GLP-1, seguido mediante la separación de isómeros posicionales (como se describió por ejemplo, para la PEGilación directa de GLP-1 por Lee *et al. Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 377-

10 382) y el acoplamiento a una porción espaciadora de pentasacárido adecuadamente funcionalizada.

Interleuquina-2 (IL-2): El amino ácido Cys¹²⁵ libre de recH-IL2 nativo comercialmente disponible, o los aminoácidos Cys libres (adicionales) de las

15 muteínas IL2 que son aún biológicamente activos, pueden reaccionar con una porción espaciadora de pentasacárido que contiene un grupo maleimida de acuerdo a un protocolo similar a como se describió para la PEGilación de IL2 (US 5,206,344) con PEG-maleimida.

20 El péptido acoplante, una etapa de procedimiento posible en el método anteriormente descrito para preparar los compuestos de la invención, se puede llevar a cabo mediante los métodos comúnmente conocidos en la técnica para el acoplamiento o condensación de los fragmentos de péptido tal como el método

25 del carbodiimida, o, preferiblemente bajo la influencia de sales de amonio/uronio como TBTU, especialmente con la adición de compuestos de supresión catalítico y racemización similares a N-hidroxisuccinimida, N-hidroxibenxotriazol y 7-aza-N-

78

hidroxibenzotriazol. Revisiones son dadas en The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, E. Gross y J. Meienhofer, eds. (Academic Press, New York, 1981) y Peptides: Chemistry and Biology, N. Sewald y H.-D. Jakubke (Wiley-VCH, Weinheim, 2002).

5

Las funciones amina presentes en los compuestos se pueden proteger durante el procedimiento sintético por un grupo N-protector, que significa un grupo comúnmente utilizado en la química de péptido para la protección de un grupo α -amino, como el grupo terc-butiloxicarbonilo (Boc), el grupo benzyloxycarbonilo (Z),
10 el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) o el grupo eftaloilo (Phth), o se puede introducir al desenmascarar una porción ácida. Las revisiones de los grupos protectores amino y los métodos para su remoción es dada en The Péptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3 y Péptidos: Química y Biología anteriormente mencionados.

15

Los compuestos de la invención, que pueden ocurrir en la forma de una base libre, se pueden aislar de la mezcla de reacción en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden obtener al tratar la base libre de la formula (I) con un ácidos orgánico o
20 inorgánico tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, yoduro de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácidos fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido maléico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido ascórbico y similares.

25

Los compuestos de esta invención o intermedios de éste pueden poseer átomos de carbono quiral y pueden por lo tanto ser obtenidos como un enantiómero puro,

59

o como una mezcla de enantiómeros, o como una mezcla que contiene diaesterómeros. Los métodos para obtener los enantiómeros puros son bien conocidos en la técnica, por ejemplo la cristalización de las sales que se obtiene de los ácidos óptimamente activos y de la mezcla racémica, o la cromatografía utilizando columnas quirales. Para los idaestereómeros se pueden utilizar columnas de fase recta o inversa.

Análisis Físico y Bioquímico

10 Varias técnicas par monitorear el efecto de la reacción con los ligadores bifuncionales y/o porciones de pentasacárido reactivas sobre la bioactividad de la proteína están disponibles. A este respecto, el análisis de interacción biomolecular (BIA), que utiliza moléculas receptoras solubles como agentes de unión complementarios (insulina) y determinación de la actividad de enzima son
15 herramientas valiosas. Los estudios de unión del conjugado de pentasacárido a ATIII se pueden incluir en estos ensayos también. El intercambio de ión, la cromatografía de exclusión de tamaño y la cromatografía de afinidad ATIII son métodos disponibles para el subfraccionamiento de los conjugados de pentasacárido, mientras que las técnicas de electroforesis son adecuadas para
20 caracterización ortogonal, cualitativa y cuantitativa (por ejemplo, SDS-PAGE, CZE). Los sitios de conjugación se pueden identificar mediante análisis MALDI-TOF MS y secuenciación N-terminal de los conjugados.

Estudios de Farmacocinética (PK)

25

Los estudios PK para determinar la vida media *in vivo* del polipéptido no modificado y los correspondientes conjugados de pentasacárido se puede llevar a

cabo en ratas. Varias opciones están disponibles, por ejemplo radiomarcando con ^{125}I empleando Yodogeno o ionización con lactoperoxidaza para inducir sustitución electrofílica o utilizando un reactivos Bolton-Hunter como porción marcadora y determinando la radiación gama en muestras de plasma. Otros métodos
5 conocidos en la técnica están basados en inyección de conjugados no marcados seguido por análisis inmunoquímico a través de ELISA o tecnología Luminex.

Evaluación Farmacológica

10 Los efectos farmacológicos de la conjugación de polipéptidos de la invención a un pentasacárido de unión ATIII se pueden estudiar en ensayos *in vitro* y en modelos animales *in vivo* como se describe adelante.

La insulina es una proteína de 5.8 kDa que consiste de dos cadenas de péptido
15 que son mantenidas juntas mediante dos puentes disulfuro. La modificación química específica de sitio en uno de los grupos Lys ϵ -amino o N-terminal α amino están bien documentados. El efecto de la conjugación del pentasacárido a insulina se puede estudiar al analizar las muestras de suero para glucosa, contenido de insulina y péptido C (un biomarcador para corregir la secreción de insulina
20 endógena). Un glucómetro y los radioinmunoensayos para insulina humana y péptido CD están comercialmente disponibles. Los efectos *in vivo* de la insulina en los niveles de glucosa de la sangre se pueden medir en ratas o perros Beagle.

La farmacología *in vitro* y los efectos *in vivo* de la conjugación de pentasacárido
25 del antagonista GnRH mimético decapeptido ganirelix se puede estudiar en ensayos establecidos en modelos animales. La síntesis de polipéptido avanzada suministrará una molécula bien definida de las cuales los efectos se pueden

81

comparar con la maduración de oocito de bloqueo ganirelix y la ovulación en ratones y ratas. La comparación de la vida media biológica del ganirelix y su contraparte el conjugado pentasacárido puede ser estudiado por ejemplo al determinar en que momento después de la administración se ha restablecido el

5 proceso natural de maduración y ovulación.

El GLP-1(7-36) es una hormona endocrina insulínica bien conocida y bien estudiada que induce numerosos efectos biológicos tal como estimular la secreción de insulina, inhibir la secreción de glucagón, la motilidad gástrica o

10 intestinal, mejorar la utilización de glucosa e inducir la pérdida de peso. Ésta se degrada rápidamente por medio de dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). La degradación prematura posterior se puede por ejemplo enredar por el reemplazo del residuo amino ácido en la posición 8 (por ejemplo mediante D-alanina). Otras aproximaciones tales como la modificación con cadenas de ácido graso largas o

15 PEG han resultado en GLP-1 biológicamente activo o análogos de éstos (como se definió en por ejemplo, la WO 2004/093823). El efecto estabilizante (adicional) de conjugar un derivado GLP-1(7-36) opcionalmente modificado a un vehículo pentasacárido se puede estudiar al medir la estabilidad del conjugado *in vitro* en la presencia de DPPIV e *in vivo* al medir la vida media del plasma utilizando análisis

20 inmunoquímico. La actividad funcional del conjugado pentasacárido GLP-1 se puede determinar *in vitro* al medir la capacidad de unirse y activar el receptor GLP-1 y los efectos farmacodinámicos *in vivo* se pueden estudiar al analizar las muestras de suero para glucosa e insulina.

25 La adrenomedulina es un polipéptido de 52 aminoácidos con numerosas funciones biológicas tales como la vasodilatación, la broncodilatación, la neurotransmisión, la regulación del crecimiento y la regulación de la formación ósea. El fragmento

truncado ADM(27-52) le faltan los requisitos estructurales para la actividad vasodilatadora pero es aún capaz de estimular el crecimiento de los osteoblastos de rata cultivados de una manera dependiente de dosis (*Regulatory Peptides* 2003, 112, 79-86). Además, se estableció recientemente que el ADM(27-52) inhibe la calcificación vascular en ratas (*Regulatory Peptides* 2005, 129, 125-132) y puede así tener aplicación terapéutica potencial en la prevención de calcificación de arterias. El efecto de conjugar ADM(27-52) a un vehículo pentasacárido se puede evaluar mediante ensayos bien establecidos, midiendo la actividad osteogénica *in vitro* en cultivos de osteoblastos de ratas fetales que crecen activamente o el incremento *in vivo* del índice de formación de hueso (sin afectar la reabsorción de hueso).

El octreotide es un análogo de octapéptido sintético de somatostatina y utilizado clínicamente para el tratamiento de acromegalia y ciertos tumores endocrinos. Se ha mostrado que las formulaciones de depósito de larga acción (por ejemplo, Sanostatina LAR depot, Novartis Farma, Basel, Suiza) son al menos tan efectivos en la disminución de la hormona de crecimiento de plasma y los niveles del factor de crecimiento similares a insulina (IGF-1) comparados con tres inyecciones subcutáneas diarias. El efecto de la conjugación del octreotide a un pentasacárido sobre sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas se pueden estudiar en ratas macho al utilizar radio inmunoensayos establecidos para determinar los niveles de octreotide conjugado y los niveles alterados de IGF-1.

La interleuquina-2 (IL-2) es una proteína producida naturalmente en el cuerpo por células sanguíneas blancas (linfocitos T) y es una proteína importante del sistema inmune. Es comercialmente disponible (Aldesleuquin, Proleukin®, Chiron, U.S.) como una droga y se utiliza en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (leucemia

de las células vellosas) y se utiliza en conjunto con la terapia anti-HIV para inducir incrementos en los conteos de célula CD4. La bioactividad específica de los conjugados de pentasacárido IL-2 se puede determinar *in vitro* utilizando el bioensayo de proliferación de célula IL-2 descrito por Gillis et al. (*J. Immunol.* 5 1978, 120, 2027-2032).

Formulaciones farmacéuticas

Los conjugados de la invención se pueden administrar enteralmente o 10 parenteralmente. La dosis exacta y el régimen de estos compuestos y composiciones de éstos necesariamente serán dependientes de la actividad biológica del polipéptido *per se*, las necesidades del sujeto individual a quien esta siendo administrado el medicamento, el grado de aflicción o necesidad y el juicio del médico practicante. En general, la administración parenteral requiere dosis 15 inferiores de otros métodos de administración que son más dependientes de absorción. Sin embargo, las dosis diarias son para humanos preferiblemente 0.0001-1 mg por kg de peso de cuerpo, más preferiblemente 0.001-0.1 mg por kg de peso de cuerpo.

20 El medicamento fabricado con los compuestos de esta invención también se puede utilizar como adyuvante en terapia. En tal caso, el medicamento se administra con otros compuestos útiles para tratar tales estados de enfermedad.

Mezclado con auxiliares farmacéuticamente adecuados, por ejemplo, como se 25 describe en la referencia estándar, Gennaro *et al.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, (18° ed., Mack Publishing Company, 1990, ver especialmente Parte 8: Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture) los compuestos se pueden

comprimir en unidades de dosis sólidas, tal como píldoras, tabletas, o ser procesados en cápsulas o supositorios. Por medio de líquidos farmacéuticamente adecuados los compuestos también se pueden suministrar en la forma de una solución, suspensión, emulsión, por ejemplo, para uso de una preparación de
5 inyección, o como un pulverizado.

Para la elaboración de unidades de dosis, por ejemplo, tabletas, el uso de aditivos convencionales tales como llenadores, colorantes, ligadores poliméricos y similares se contempla. En general, cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable
10 que no interfiera con la función de los compuestos activos se puede utilizar. Los vehículos adecuados con los cuales las composiciones se pueden administrar incluyen lactosa, almidón, derivados de celulosa y similares, o mezclas de éstos, utilizados en cantidades adecuadas. Cuando la administración es intravenosa, las composiciones farmacéuticas se pueden dar como un bolo, o como dos o más
15 dosis separadas en tiempo, o como una infusión de flujo constante o no lineal. Así, las composiciones de la invención se pueden formular mediante cualquier ruta de administración.

Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones
20 en amortiguadores acuosos isotónicos estériles. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante, un agente estabilizante, y un anestésico local tal como la lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes a ser suministrados separadamente, por ejemplo, en un kit, o mezclados juntos en una forma de dosis
25 unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua. La composición se puede almacenar en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o saco que indica la cantidad de agente activo en

unidades de actividad. Cuando la composición se administra mediante infusión, ésta se puede suministrar con una botella de infusión que contiene el "agua para inyección", grado farmacéutico estéril, solución salina, u otros fluidos intravenosos adecuados. Cuando la composición se va a administrar por inyección, una ampolla

5 de agua estéril para inyección o solución salina se puede suministrar de tal forma que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración. Las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden los compuestos de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables de éstos, con cualquier ingrediente, excipiente, portador, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente

10 aceptable.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque métodos y

15 materiales similares o equivalentes aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen en este documento. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las

20 definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

La invención se ilustra adicionalmente por medio, pero no limitada a, los siguientes ejemplos. Se entenderá que varias modificaciones se pueden hacer con diferentes

25 polisacáridos, espaciadores y polipéptidos sin apartarse del espíritu y alcance de esta invención.

Leyendas a las Figuras

Figura 1.

Reconocimiento del conjugado de pentasacárido-insulina **6** (Insulina-penta)
5 mediante ELISA específico de insulina.

Figura 2.

Análisis de interacción biomolecular de conjugado **6** de pentasacárido (PS)-
insulina.

10 Reacción de anticuerpo de anti-insulina inmovilizada con conjugado de insulina
con la subsecuente unión al receptor de insulina humana.

Figura 2B.

Análisis biacore de conjugado **6** de pentasacárido (PS).

15 Reacción de anticuerpo anti-insulina inmovilizada con conjugado de insulina con la
subsecuente unión del ATIII humano.

Figura 3.

Análisis MALDI-TOF de conjugado **6** de pentasacárido monosustituido-insulina.

20

Figura 4.

Análisis HP-SEC de conjugado **6** de pentasacárido monosustituido-insulina sobre
Superdex 30.

25 **Figura 5.**

Unión hATIII de los residuos **7, 8 y 9** del pentasacárido de referencia-espaciador
(estudio BIA).

Figura 6.

Unión hATIII de los conjugado **24**, **28** y **29** de insulina-pentasacárido (estudio BIA).

5 Figura 7.

Análisis espectrométrico de masas (ESI_QTOF) de conjugado de insulina-pentasacárido **24**.

Figura 7A.

- 10 Comparación de una distribución de isotipo típica determinada y calculada experimentalmente de un conjugado de insulina-pentasacárido (ESI-QTOF, M^{5+} , compuesto **24**).

Figura 8.

- 15 Unión de hATIII de los compuestos **31**, **32**, **36**, **37** (estudio Biacore).

Figura 9.

Unión hATIII del compuesto **39** (como se determinó mediante el BIA).

20 Figura 10.

Perfil de unión hATIII del compuesto **41** (determinado mediante BIA).

Figura 11.

Perfil de unión hATIII del compuesto **44** (determinado mediante BIA).

25

Figura 12.

SDS-PAGE y análisis Western blot del compuesto **47**.

**Figura 13.**

Niveles de plasma medio (media $\pm$ s.e.m.) determinada mediante la medición de concentración de insulina después de administración i.v. de 3.5 nmol/kg de insulina rech (círculos abiertos) o conjugado 6 de pentasacárido-insulina (triángulos).

Figura 14.

Niveles de plasma medio (media $\pm$ s.e.m.) expresada como % de concentración medida como T = 1 minuto después de administración i.v. del conjugado ^{125}I -marcado 29 (cuadrados abiertos), 24 (círculos abiertos) y 28 (triángulos abiertos) y de insulina rech mismo (balas cerradas).

Figura 15.

Niveles de plasma medio (media $\pm$ s.e.m.) expresada como % de la concentración medida a T = 1 minuto después de administración i.v. del conjugado ^{125}I -marcado 31 (cuadrados abiertos) y 32 (triángulos cerrados). (Datos no corregidos para deshalogenación).

Figura 16.

Niveles de plasma medio (media $\pm$ s.e.m.) expresada como % de la concentración medida en T = 1 minuto después de administración i.v. del conjugado 39 ^{125}I -marcado (cuadrados abiertos) y de ^{125}I -marcado con ADM(27-52)(triángulos cerrados). (Datos no corregidos para deshalogenación).

Figura 17.

Niveles de plasma media (media $\pm$ s.e.m.) expresada como % de la concentración medida en T = 1 minuto después de administración i.v. del conjugado **41** 125 I-marcado (triángulos cerrados) y de GLP-1 125 I-marcado (cuadrados abiertos).

5 Figura 18.

Detección del conjugado **6** de pentasacárido-insulina complejo ATIII con los anticuerpos anti-humanos y anti-conejo ATIII.

Figura 19.

- 10** Niveles de glucosa media (media $\pm$ s.e.m.) después de administración i.v. de 7 nmol/kg de conjugado **6** de pentasacárido-insulina (triángulos abiertos) o 3.5 nmol/kg de rech-insulina (círculos abiertos).

Figura 20.

- 15** Niveles de glucosa media (media $\pm$ s.e.m.) después de administración i.v. de 12 nmol/kg de conjugado de pentasacárido-insulina **26** (triángulos cerrados) o **24** (círculos cerrados) comparados con los niveles de glucosa después del tratamiento con 9 nmol/kg de rech-insulina (círculos abiertos).

20 Figura 21.

Niveles de glucosa media (media $\pm$ s.e.m.) después de administración i.v. de 24 nmol/kg de conjugado **27** de pentasacárido-insulina (cuadrados cerrados) o **25** (diamantes cerrados) comparados con los niveles de glucosa después del tratamiento con 9 nmol/kg de rech-insulina (círculos abiertos) o 48 nmol/kg de

- 25** Insulina Detemir (triángulos abiertos).

Figura 22.

Niveles de glucosa media (media $\pm$ s.e.m.) después de administración i.v. de 24 nmol/kg de conjugado **24** de pentasacárido-insulina (triángulos cerrados), **28** (círculos cerrados) o **29** (cuadrados cerrados) comparados con los niveles de glucosa después del tratamiento con 9 nmol/kg de rech-insulina (círculos abiertos) o 24 nmol/kg de Insulina Detemir (diamantes abiertos).

EJEMPLOS

Abreviaturas utilizadas:

10

ACN acetonitrilo

AcOH ácido acético

ADM adrenomedulina

(h)ATIII anti-trombina III (humana)

15

AUC área bajo la curva

BIA análisis de interacción biomolecular

Boc₂O di-terc-butil bicarbonato

Cl depuración

DCCI N,N'-diciclohexilcarbodiimida

20

DIPEA diisopropiletilamina

DMF N,N'-dimetilformamida

DMSO dimetil sulfóxido

EDTA etilenodiamina tetra-acetato

ELISA ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

25

Equiv. Equivalentes

ESI ionización por rociado de electrón

GLP-1 péptido 1 similar a glucagon

91

	GMB	gama-maleimidobutiril
	GMBS	éster-N-hidroxi succinimico de ácido gama-maleimidobutirico
	HBS-EP	solución salina amortiguada de hepes que contiene EDTA y polietilenglicol
5	HPLC	cromatografía líquida de alto desempeño
	HP-SEC	cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño
	HRP	peroxidasa de cola de caballo
	i.v.	intravenoso
	IL-2	interleuquina-2
10	MALDI-TOF	tiempo de vuelo de ionización desabsorción de láser ayudado por matriz
	MoAb	anticuerpo monoclonal
	MRT	tiempo medio de residencia
	MS	espectrometría de masa
15	NMM	N-metil morfolino
	NMR	resonancia magnética nuclear
	PAGE	electroforesis de gel de poliacrilamida
	PBS	solución salina amortiguada con fosfato
	PS	pentasacárido
20	Q-TOF	tiempo de vuelo de cuadrupolo
	rech	humano recombinante
	RT	temperatura ambiente
	Rt	tiempo de retención
	SDS	dodecil sulfato de sodio
25	TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniotetrafluroborato
	TCA	ácido tricloroacético
	TEA	trietilamina

92

TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
Vss	volumen de distribución a estado constante

5 Materiales y Métodos

Los espectros RMN ^1H fueron registrados a 400 MHz sobre un Broker DRX-400 (ultra pantalla). Los cambios químicos en solventes orgánicos fueron reportados en ppm (δ) con relación a tetrametilsilano.

10

DMF, 1,4-dioxano, NMM, acetato de amonio, Boc_2O , TFA, DMSO, DCCl (Acros), hidroxilamina (50 % en peso en H_2O), anhídrido yodoacético, GMBS (Sigma Aldrich), insulina rech (Diosynth), TEA, ácido 6-aminocapróico, N-hidroxisuccinimida (Janssen), THF (Biosolve), 2-ácido mercapto-[S-acetil]acético y
15 éster de N-hidroxisuccinimida (13), TBTU (Fluka), ACN (Merck), AcOH y Na_2HPO_4 (J.T. Baker) fueron utilizados como recibidos de los abastecedores comerciales mencionados.

La cromatografía de columna se desarrolló sobre un kieselgel 60 de MP
20 Biomedicals Germany GmbH (MP silica 32-63, 60 Å) y en Merck LiChroprep RP-18 (40-63 μm). El análisis TLC se desarrolló sobre placas TLC Merck kieselgel 60 F₂₅₄. Los compuestos son visualizados mediante absorción UV (254 nm) y/o indicando con reactivo USUI (ácido fosfor molibdenico/AcOH/ H_2SO_4 en EtOH).

25 El espectro MALDI se obtuvo con un Voyager DE PRO (Applied Biosystem, Framingham, MA, USA) en un modo de extracción lineal retrazado en modo de ión positivo y negativo. El ácido hidroxi cinámico alfa-ciano recristalizado (CHCA, 3 g/L

en 500 mL/L ACN /1mL/L TFA) se utilizó como matriz. Los pesos moleculares se midieron utilizando una calibración de dos puntos (por ejemplo, al asignar la insulina recH y una de sus cadenas de fragmento, o la mioglobina a m/z 16953 y m/z 8477).

5

El espectro Q-TOF se obtuvo con un PE Sciex API Q-star Pulsar en modo de ión positivo con una fuente ESI. Las muestras se disolvieron en H₂O y desalinizadas mediante el uso de Zip Tip[®] de fase inversa. El HPLC analítico se condujo sobre un auto-muestreador Gilson 234 con un sistema de gradiente de bombas Gilson (305) utilizando una columna Luna[™] C18(2)(fase inversa, 150 x 4.6 mm, 5µm). Se utilizó un detector Gilson UV (118) para la detección a 210 nm. La elusión del gradiente se desarrolló a una temperatura de columna de 40°C y una tasa de flujo de 1 mL/min al partir con 95% de eluyente A (0.1% TFA en H₂O/ACN, 9:1) y 5% de eluyente B (0.1% TFA en ACN) durante 5 min, luego aplicar un gradiente lineal de 15 a 50% de ACN en 25 min.

Análisis analítico (HPLC) del compuesto 4 se condujo sobre un sistema de gradiente de bomba de dos vías Shimadzu SCL-10A vp (controlador de sistema) utilizando una columna Luna[™] C18(2) (fase inversa, 150 x 2.0 mm, 5µm). Un detector UV con arreglo de diodo Shimadzu (SPD-M10A vp) se utilizó para la detección a 214 nm. La elusión del gradiente se desarrolló a una temperatura de columna de 40°C y la tasa de flujo de 0.4 mL/min.

El HPLC preparativo se condujo sobre un manejador de muestra Waters 2769 con un sistema de gradiente de bomba simple (Waters 600) utilizando una columna Luna[™] C18(2)(fase inversa, 250 x 50 mm, 10µm). Un detector Gilson UV (2996, arreglo de fotoyodo) se utilizó para la detección a 210 nm. La elusión del gradiente

se desarrolló a una tasa de flujo de 50 mL/min al partir con 90% de eluyente A (0.1% TFA en H₂O/ACN, 9:1) y 10% de eluyente B (0.1% TFA en ACN) durante 10 min, luego aplicando un gradiente lineal de 15 a 50% de eluyente B en 50 min.

- 5 La cromatografía de intercambio de anión analítico se condujo sobre un Explorador Farmacia Akta con un sistema de gradiente de bomba Farmacia (P-900) utilizando una columna de Farmacia Biotech MonoQ HR 5/5. Se utilizó un detector Farmacia UV (UV 900) para la detección a 210 nm en combinación con un pH de Farmacia y un detector de conductividad (pH/C 900). Se utilizó un
- 10 detector AD (AD900) en combinación con un Chiralyser (IBZ). Además el recolector de fracción de Pharmacia (Frac 950) y el automuestreador de Farmacia (A 900) se utilizaron. La elusión por defecto se desarrolló con una tasa de flujo de 1 mL/min partiendo con 74% de eluyente A (ACN/H₂O 2:8) y 26% de eluyente B (ACN/2M NaCl 2:8) durante 5 min, luego aplicando un gradiente lineal de 20% de
- 15 eluyente A y 80% de eluyente B en 15 min.

- La cromatografía de intercambio de anión preparativo se condujo sobre un sistema Farmacia con una bomba (P-50) y un sistema de gradiente de mezclador de gradiente Farmacia (LKB GP-10) utilizando una columna Fast-Flow Q-sefarosa
- 20 Farmacia Biotech XK16. Un detector Farmacia UV (LKB-UV-MII) se utilizó para la detección a 214 nm en combinación con un detector de conductividad Biotechnics. La elusión del gradiente por defecto se desarrolló a una tasa de flujo de 4.6 mL/min al partir con 80% de eluyente A (H₂O) y 20% de eluyente B (NaCl 2M en H₂O) durante 20 min, luego aplicando un gradiente a 20% de eluyente A y 80% de
- 25 eluyente B en 210 min.

95

La filtración de gel preparativa sobre Sefadex G25 (desalinizando) se condujo sobre un sistema Farmacia con una bomba Watson-Marlow (101V) utilizando una columna fina Sefadex-G25 XK26 Farmacia Biotech. Se utilizó un detector de UV Farmacia (LKB-UV-MII) para la detección a 214 nm en combinación con detector de conductividad Biotechnics. La elusión se desarrolló con H₂O una tasa de flujo de 1mL/min de H₂O durante 10 h.

Se llevó a cabo un HP-SEC analítico con el compuesto 6 sobre una columna Farmacia SuperdexTM 30 HR 10/30 montada en un sistema de cromatografía HP1100. La elusión se desarrolló con un amortiguador de fosfato de sodio 0.2 mol/L.

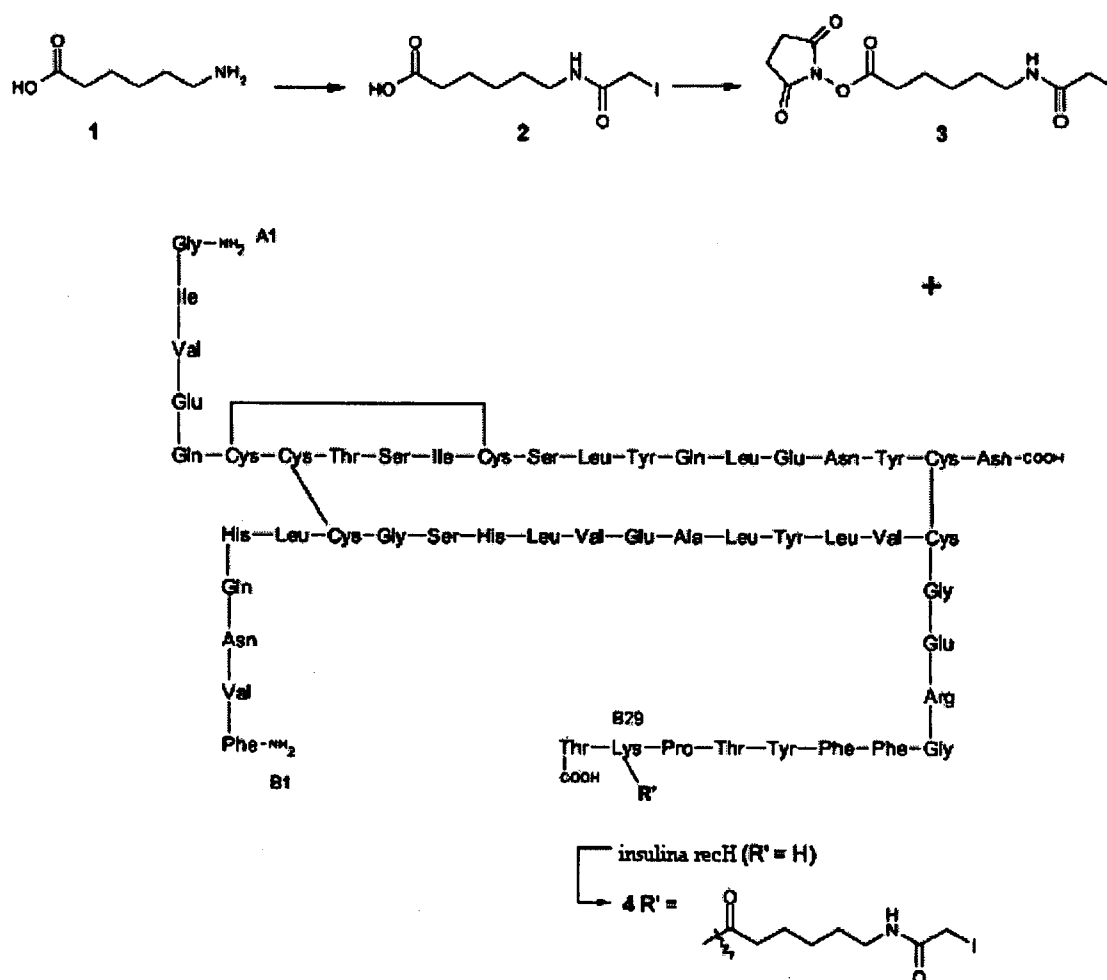
El HP-SEC analítico con los otros conjugados se condujo sobre el sistema Akta Explorer como se describió para la cromatografía Q-sefarose analítica, con una columna Farmacia SuperdexTM 75 HR 10/30. Una elusión isocrática se desarrolló con 50 mM de acetato de amonio a una tasa de flujo de 1 mL/min.

El HPSEC preparativo se condujo sobre el mismo sistema Explorador Akta como se describió para la cromatografía de Q sefarosa analítica, con una columna pregrado Farmacia SuperdexTM 75 xk26 Hiloal 26/60. La elusión isocrática se desarrolló con 50 mM de acetato de amonio a una tasa de flujo de 1.32 mL/min

Estudios de unión de conjugados de pentasacárido a ATIII, anticuerpo de antiinsulina y receptor de insulina se desarrollaron utilizando un BIAtechnology. Los sensogramas y los puntos de reporte fueron analizados con sustracción de célula de flujo blanco utilizando BIAevaluation 3.2. IC₅₀ se calcularon utilizando un graphpad Prism 3.0

La mediciones de A_{280} se desarrollaron sobre un espectrofotómetro Nano Drop® ND-1000 UV-VIS.

5 **Esquema 1. Síntesis del compuesto 4**



EJEMPLO 1

10 **Ácido 6-(2-Yodo-acetilamino)-hexanóico (2)**

A una suspensión de ácido 6-amino-hexanóico (1) (0.37 g, 2.8 mmol) en 1,4-dioxano (60 mL) se agregó anhídrido yodoacético (0.50 g, 1.4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 3 h y durante 16 h a temperatura ambiente

97

después de lo cual el análisis TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$, 98/10/1, v/v/v) reveló la conversión completa del compuesto 1 en un producto menos lipofílico. Se agregó EtOAc (100 mL) y la mezcla de reacción se lavó con solución HCl acuosa 0.10 M (50 mL). La capa orgánica se lavó entonces dos veces con solución salina (50 mL) y las capas de agua combinadas se extrajeron dos veces en EtOAc (75 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4) y se concentraron *in vacuo*. El residuo se cromatografió sobre sílica gel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$, 98/10/1, v/v/v para dar ácido 6-(2-yodo-acetilamino)-hexanóico (2) (0.45 g, > 100%). RMN ^1H (MeOD): δ 3.67 (s, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.29 (t, 2H), 1.66-1.33 (m, 6H).

EJEMPLO 2

2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de Ácido 6-(2-Yodo-acetilamino)-hexanóico

A una solución de ácido 6-(2-Yodo-acetilamino)-hexanóico (2) (0.20 g, 0.67 mmol) en THF (10 mL) se agregó a N-hidroxisuccinamida (85 mg, 0.74 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0.21 g, 10 mmol). La mezcla de reacción se agitó en la oscuridad durante 16 h. Cuando el análisis TLC (EtOAc/Hep/AcOH, 80/20/1, v/v/v) revelaron la conversión completa en el éster activado 3, se agregaron siete gotas de ácido acético. La mezcla se almacenó entonces en un congelador durante toda la noche (-20°C). La mezcla cruda se filtró y el filtrado se concentró *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna (EtOAc/Hep/AcOH, 40/60/5 $\rightarrow$ 20/80/5, v/v/v) y la concentración de las fracciones apropiadas dieron un derivado de N-hidrocisuccinimida éster 3 (0.18 g, 67%). RMN ^1H (MeOD): δ 3.67 (s, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.63 (t, 2H), 2.0-1.0 (m, 6H).

EJEMPLO 3

Compuesto 4

98

A una suspensión de insulina rech (50 mg, 8.6 μ mol) en DMF (15 mL) se agregó H₂O (9.0mL) hasta que la solución se volvió clara. La solución se agitó durante 15 min. para ajustar la temperatura ambiente. El pH de la solución se ajustó a 10 al
5 agregar gota a gota 0.1 M de NaOH en H₂O. Después esté, el recipiente de reacción se envolvió con hoja de estaño. Una solución de 3 (5.0 mg, 8.6 μ mol) en DMF (1.0mL) se agregó gota a gota a la mezcla de reacción en 1 min. La mezcla de reacción se agitó utilizando una barra agitadora magnética y el pH se mantuvo a 10. Después de 30 min un exceso de 0,1% de TFA en H₂O (5.0mL) se agregó
10 para apagar la reacción. Se agregó H₂O (200mL) y la mezcla de reacción se liofilizó para dar 4 (60 mg, >100%, max. 8.6 μ mol). El análisis HPLC (Shimadzu, fase inversa) al partir con 80% de eluyente A (0.1% de TFA en H₂O) y 20% de eluyente B (ACN) durante 5 min, aplicando luego un gradiente de 20% de eluyente A y 80% de eluyente B en 30 min., revelaron la presencia de 45% del producto
15 monosustituido (insulina rech Rt: 12.84 min; compuesto 4 Rt: 13.54 min; B29/A1 producto distribuido: Rt 14.16 min). El producto crudo se utilizó sin purificación en la siguiente reacción.

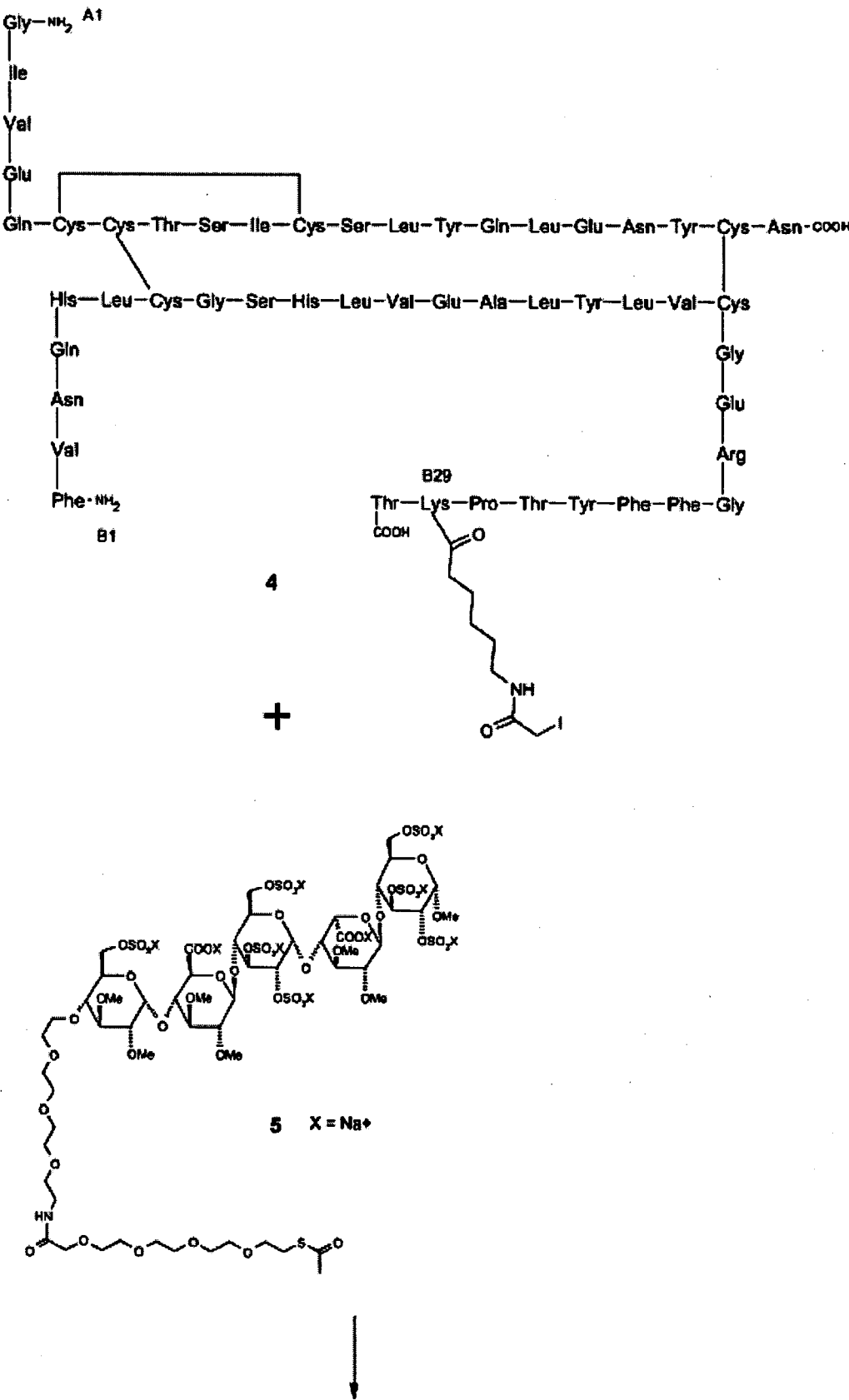
EJEMPLO 4

20 Compuesto 6

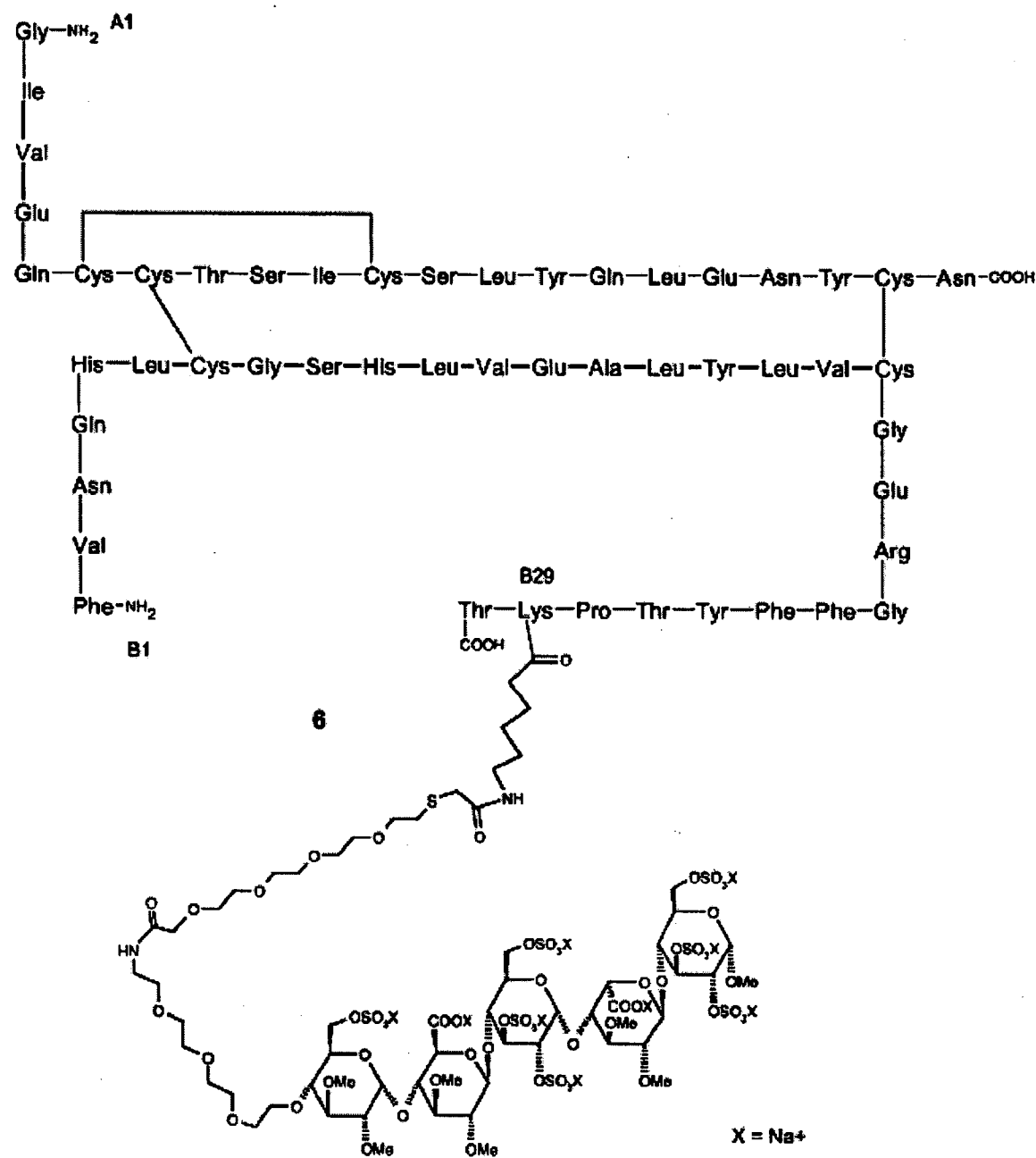
El compuesto crudo 4 (60 mg) se disolvió en una solución 0.05 M de NH₂OH (al pasar a través de N₂) desgasificado en 0.1 M de amortiguador Na₂HPO₄ (25 mL, pH 7.0). La mezcla de reacción se agitó al utilizar una barra agitadora magnética y
25 se desgasificó durante 30 min (al pasar a través de N₂). Luego el compuesto espaciador pentasacárido 5 (95 mg, 43 μ mol), que se preparó como se describió en *Angew. Chem. Intl. Ed.* (1996), 35, 331-333, se agregó como un sólido y la mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 h.

99

Esquema 2. Síntesis del compuesto 6



100



Purificación del conjugado 6 pentasacárido-insulina

De la mezcla de reacción del párrafo previo, el conjugado 6 de pentasacárido-insulina monosustituido se purificó hasta cerca de homogeneidad mediante cromatografía de intercambio de anión (paso de captura) y cromatografía de exclusión de tamaño (etapa de pulido).

La solución que contiene el conjugado se aplicó sobre una columna de FF Q-Sefarose, equilibrada en 20 mmol/L de amortiguador de fosfato de sodio PH 8.0.

101

Después de que la fracción de proteína no retenida había pasado la columna, un lavado extensivo con amortiguador de equilibrio se llevó a cabo hasta que el A_{280} había regresado al nivel de línea base. La insulina no reaccionada unida se eluyó alrededor de 0.4 mol/L de NaCl y el conjugado de pentasacárido-insulina monosustituido a 0.7 mol/L de NaCl como se determinó mediante HP-SEC analítico sobre Superdex 30 y MALDI-TOF-MS. La fracción del conjugado se concentró mediante ultrafiltración o cromatografía de intercambio de anión utilizando 2 mol/L de choque NaCl como etapa de elusión y se aplicó sobre una columna Superdex 30 preparativa equilibrada en solución salina amortiguada con fosfato. Las fracciones que contienen monoconjugado como se determinó por HP-SEC y MALDI-MS fueron agrupadas. El producto final se almacenó a -70°C después de congelamiento por estallido en una mezcla de etanol/hielo seco. La concentración del conjugado se estimó mediante una medición de A_{280} utilizando un coeficiente de absorbancia de 0.8 durante 1 mg/mL.

Caracterización del compuesto 6

La identidad del conjugado 6 de pentasacárido-insulina purificado se determinó mediante un ELISA para insulina y un Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) utilizando el receptor de insulina humano y ATIII humano como analitos. La pureza y la monomericidad se evaluaron mediante HP-SEC sobre Superdex 30 y MALDI-MS.

Como se muestra en la Fig. 1, dos tandas de conjugado 6 de pentasacárido-insulina se reconocen mediante el ELISA específico de insulina, que demuestra la presencia de una porción de insulina inmunoreactiva. De los experimentos BIA en el Biacore se puede concluir que la insulina conjugada con pentasacárido es

5 todavía capaz de unirse al receptor de insulina humano (Fig. 2A). En estos experimentos un MoAb a insulina humana (clon M3222213, 10-130, tanda 223, Fitzgerald Industries International, designado MoAb 13) se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 utilizando un acoplamiento amino estándar. Se utilizó HBS-EP
10 (Biacore, cat. No. 22-0512-44) utilizada como un amortiguador de corrimiento a una tasa de flujo de 5 μ L/min. La inyección del conjugado de insulina resultó en la unión del conjugado al anticuerpo inmovilizado. El conjugado de insulina inmunounido fue capaz de reaccionar con el receptor de insulina humano así como también con el ATIII el último siendo indicativo de un pentasacárido covalentemente unido (Fig. 2B).

El espectro MALDI-TOF del conjugado 6 del pentasacárido-insulina se obtuvo como se describió bajo Materiales y Métodos. Antes del análisis las muestras fueron desalinizadas y concentradas sobre el μ C18-ZipTips (Millipore Corporation,
15 Billerica MA, USA). La elusión estuvo directamente sobre un blanco MALDI de acero inoxidable en 1 μ L de solución que contiene 10 g/L de alfa-ciano y 500 mL/L ACN/1mL/L TFA. La Fig. 3 representa un perfil MALDI-TOF típico de un conjugado de pentasacárido-insulina monosustituido con picos alrededor m/z 6700 y 7400. la heterogeneidad aparente es originada por la desulfatación inducida por láser de la
20 porción de pentasacárido que resulta en la pérdida serial de 80 Da. Ningún conjugado de pentasacárido-insulina disustituido se encontró en el análisis MALDI-TOF MS en razón a que ningún pico en el rango de m/z 9400 característico de la insulina disustituida se encontró. Se debe notar que también los picos para insulina no reaccionada están ausentes (m/z 5808).

El análisis HP-SEC (Fig. 4) muestra un pico principal con un tiempo de retención de 22 min. La pureza se estimó en 97%. (la Insulina no reaccionada y el conjugado disustituido parecen estar ausentes)

5 EJEMPLO 5

Compuesto 11

Pentasacárido **7** (46 mg) [que se puede obtener mediante el acoplamiento del
10 monosacárido **5** derivado, descrito en la WO 2001/42262, con el tetrasacárido que se obtuvo al conducir la ruta sintética hacia el tetrasacárido **30** descrito en *Bioorg. Med. Chem.* (1994), 2, 1267-1280 en el cual el bloque de construcción monosacárido del extremo reductor **12** se reemplazó con metil 2,3-di-O-bencil-6-O-metil- α -D-glucosa, utilizando métodos similares a aquellos descritos en estas
15 publicaciones, incluyendo la desprotección y sulfatación] y el derivado de glicol **10** (18 mg, 1.6 equiv.) se disolvieron en DMF (5 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. NMM (61 μ L, 5 equiv.) se agregaron y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El solvente se evaporó *in vacuo* y el residuo restante se purificó mediante cromatografía de intercambio de anión preparativo.
20 Las fracciones apropiadas fueron combinadas y desalinizadas sobre una columna G25 preparativa. Las fracciones combinadas fueron liofilizadas para dar **11** (29 mg, 57%) como un polvo blanco. Pureza >98% (intercambio de anión analítico, UV_{210nm}). ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz, HH-COSY): δ 5.31 (d,1H), 5.23 (m,1H), 4.91 (m,1H), 4.45-4.35 (m, 1H), 4.48-3.93 (m,11H), 3.87-3.62 (m,9H), 3.60-3.45
25 m,39H), 3.41-3.34 (m,15H), 3.33-3.23 (m,7H), 3.18-3.08 (m,2H), 2.97 (t,2H), 2.23 (s,3H).

EJEMPLO 6

Compuesto 12

Pentasacárido 8 (0.2 g), que se preparó como se describió en WO 2001/42262, y
5 derivado de glicol 10 (53 mg, 1.3 equiv.), que se preparó como se describe en
Angew. Chem. Intl. Ed. (1996), 35, 331-333, se disolvió en DMF (5.0 ml). NMM (61
μL, 5 equiv.) se agregaron y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche
a temperatura ambiente. El solvente se evaporó *in vacuo* y el residuo se purificó
mediante cromatografía de intercambio de anión preparativo. Las fracciones
10 apropiadas se combinaron y desalinizaron sobre una columna G25 preparativa.
Las fracciones combinadas fueron liofilizadas para dar 12 (0.13 g, 55%) como un
polvo blanco. Pureza >95% (intercambio de anión analítico, UV_{210nm}). ¹H-NMR
(D₂O, 400 MHz, HH-COSY): δ 5.12 (d,1H), 5.03 (d,1H), 4.70 (d,1H), 4.34-4.18 (m,
21H), 4.09-3.03 (m,1H), 3.98-3.90 (m,5H), 3.85-3.74 (m,6H), 3.66-3.48 (m,7H),
15 3.43-3.24 (m,41H), 3.23-3.15 (m,13H), 3.12 (m,2H), 3.10-3.01 (m,7H), 2.99-2.88
(m,3H), 2.78 (t,2H), 2.04 (s,3H).

EJEMPLO 7

Compuesto 14

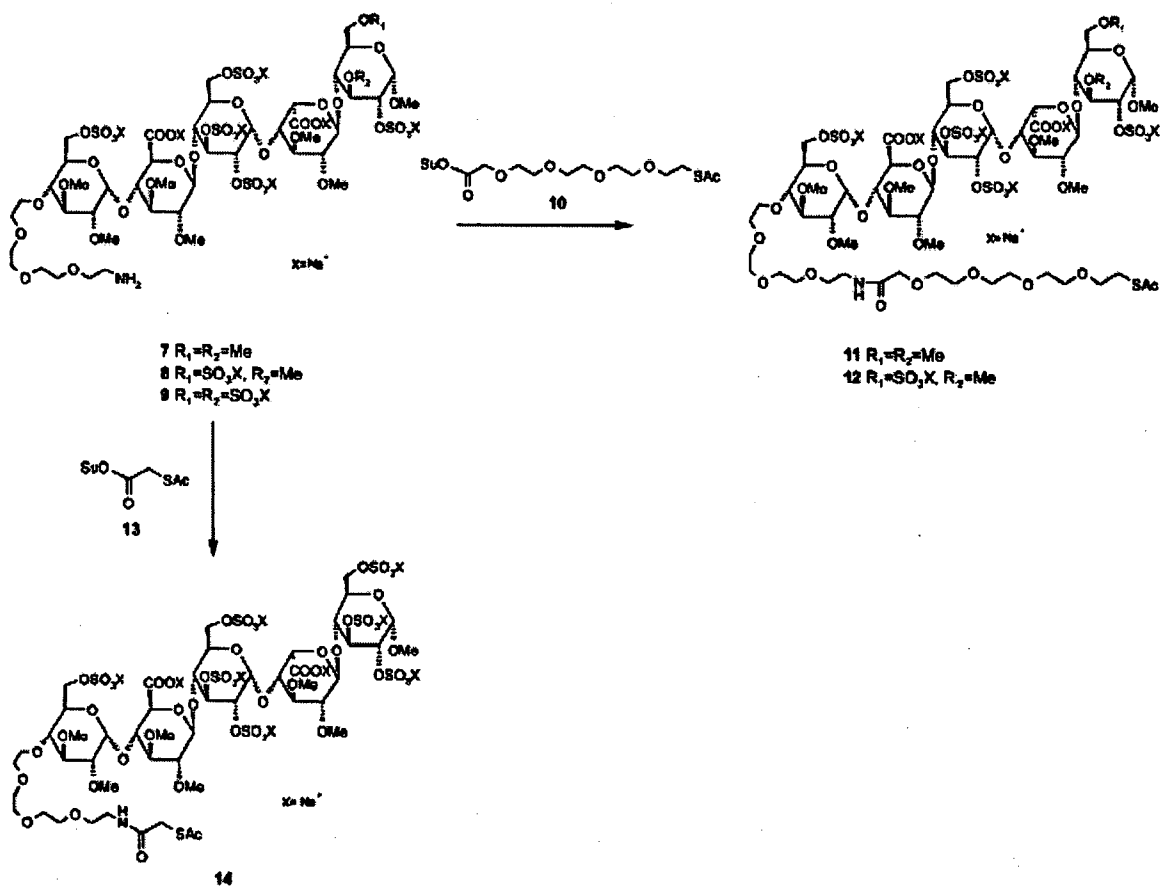
20

Pentasacárido 9 (100 mg) [que se puede obtener al acoplar el monosacárido
derivado 5 descrito en la WO 01/42262 con el tetrasacárido 48 descrito en la US
2004/0024197 utilizando métodos similares a aquellos descritos en estas
solicitudes de patente, incluyendo la desprotección y sulfatación] y el compuesto
25 13 (18 mg, 1.5 equiv.) se disolvieron en DMF. NMM (15 μL, 2.5 equiv.) se
agregaron y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura
ambiente. El solvente se evaporó *in vacuo* y el residuo restante se purificó sobre

105

una columna G25 preparativa. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para dar **14** (84 mg, 79%) como un polvo blanco. Pureza: >95% (intercambio de anión analítico, UV_{210nm}). ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz, HH-COSY): δ 5.12 (d,1H), 5.09 (d,1H), 4.82 (d,1H), 4.40-4.26 (m,1H), 4.10-3.87 (m,8H), 3.82 - 3.73 (m,4H), 3.675-3.43 (m,11H), 3.41-3.35 (m,14H), 3.31-3.26 (m,13H), 3.24-3.15 (m,8H), 3.14-3.02 (m,5H), 3.01-2.87 (m,3H), 2.08 (s,3H).

Esquema 3. Síntesis de derivados de espaciador pentasacárido 11, 12 y 14.



10

EJEMPLO 8

Compuesto 15

15 Insulina rech (779 mg) se disolvió en DMSO anhidro (25 mL) y AcOH (465 µL). Boc₂O (73 mg, 2,5 equiv) se agregaron a la solución y la mezcla resultante se

106

agitó durante 5 h a temperatura ambiente. La reacción se apagó mediante la adición de 0.1% de TFA en H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) y la solución se liofilizó cuatro veces. El residuo se disolvió en 0.1% de TFA en H₂O/ACN (9/1)/ACN (3:1) y el producto principal se aisló mediante HPLC preparativo. Las fracciones
5 apropiadas se combinaron y liofilizaron para dar insulina **15** A1,B1-diBoc (200 mg, 26%) como un polvo blanco. Pureza: >98% (HPLC analítico). MS calculado para C₂₆₇H₃₉₉N₆₅O₈₁S₆ = 6008, encontrado sobre MALDI-TOF 6008 (utilizando insulina rech como estándar de referencia interna).

10 EJEMPLO 9

Compuesto 16

Insulina rech (752 mg) se disolvieron en DMSO anhidro (20 mL) y TEA (0.75 mL). Boc₂O (66 mg, 2,5 equiv) en DMSO (5 mL) se agregaron a la solución, y la
15 reacción se agitó durante a temperatura ambiente durante 1.5 h. La reacción se apagó mediante la adición de 0.1% de TFA en H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) y la mezcla se liofilizó tres veces. El residuo resultante se disolvió en 0.1% de TFA en H₂O/ACN (9/1) y se sometió a HPLC preparativo. Las fracciones apropiadas se combinaron y liofilizaron para dar A1,B29-diBoc insulina **16** como un polvo blanco
20 (332 mg, 43%). Pureza: >98% (HPLC analítico). MS calculado para C₂₆₇H₃₉₉N₆₅O₈₁S₆ = 6008, encontrado sobre MALDI-TOF 6008 (utilizando insulina rech como estándar de referencia interna).

EJEMPLO 10

25 Compuesto 17

107

Insulina **15** A1,B1-diBoc (200 mg) se disolvió en dimetil sulfóxido anhidro (5 mL) y trietilamina (145 µL). GMBS (45 mg, 5 equiv,) se agregó y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se apagó mediante la adición de 0.1% de TFA en H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) y la mezcla
5 resultante se liofilizó para dar insulina **17** A1,B1-diBoc-B29-GMB (0.5 g, crudo), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

EJEMPLO 11

Compuesto 18

10

Insulina **16** A1,B1-diBoc (330 mg) se disolvió en DMSO anhidro (5 mL) y TEA (332 µL). Se agregó GMBS (230 mg, 15 equiv,) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se apagó mediante la adición de 0.1% de TFA en H₂O/ACN (9/1, v/v, 150 mL) y la solución
15 resultante se liofilizó para dar insulina **18** A1,B29-diBoc-B1-GMB (0.6 g, cruda), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

EJEMPLO 12

Compuesto 19

20

Insulina **17** A1,B1-diBoc-B29-GMB (0.5 g, cruda) se disolvió en TEA (5 mL) y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. El TFA se removió bajo presión reducida, el residuo se disolvió en 0.1% de TFA en H₂O/ACN (2/1, v/v) y la solución se sometió inmediatamente a HPLC preparativo. Las fracciones
25 apropiadas se combinaron y liofilizaron para dar insulina **19** B29-GMB como un polvo blanco (93 mg, 47%). Pureza: >99% (HPLC analítico).

EJEMPLO 13

Compuesto 20

Insulina 18 A1,B29-diBoc-B1-GMB (0.6 g, crudo) se disolvió en TEA (5 mL) y la
5 mezcla se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. El TFA se evaporó *in vacuo*, el producto crudo se disolvió en 0.1% de TFA en H₂O/ACN (9/2, v/v) y la
solución resultante se sometió inmediatamente a HPLC preparativo. Las
fracciones apropiadas se combinaron y liofilizaron para dar insulina 20 B1-GMB
como un polvo blanco (127 mg, 40%). Pureza: >99% HPLC analítico). MS
10 calculado para C₂₆₇H₃₉₉N₆₅O₈₁S₆ = 5973, encontrado en MALDI-TOF 5973
(utilizando insulina rech como estándar de referencia interno).

EJEMPLOS 14-19

15 **Procedimiento general para la configuración de insulina GMB con pentasacárido**

La insulina GMB 19 o 20 (25 mg) se disuelve en un amortiguador de Na₂HPO₄ 0.1
M (12 mL, pH 7.0, desgasificado mediante el paso de N₂ a través de la solución).
20 La solución se agita utilizando una barra de agitación magnética y se desgasifica
durante otros 30 min.. Luego se agrega pentasacárido 5, 11, 12 o 14 (23 mg, 2.5
equiv.) como un sólido, seguido por la adición de NH₂OH (50 µL, 0.05 M). La
mezcla de reacción se agita bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura
ambiente. Después de 16 horas la mezcla de reacción se somete a HPSEC
25 preparativo (S75). Las fracciones apropiadas se combinan y se liofilizan para dar
los conjugados de penta-insulina 24, 25, 26, 27, 28, 29 como un polvo blanco en
un rendimiento típico de 30%-50%. Los rendimientos se determinan por

mediciones A_{280} utilizando el mismo coeficiente de extinción molar como para la insulina rech.

EJEMPLO 14

5 **Compuesto 24**

La insulina B29-GMB **19** (25 mg) se conjuga con pentasacárido **5** (23 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar derivado de insulina pentasacárido B29 **24** (15 mg, 45%). ESI-MS calculado para $C_{320}H_{487}N_{67}O_{137}S_{14}$ = 7913, encontrado en Q-TOF 2638.7 M^{3+} ; 1979.2 M^{4+} ; 1583.6 M^{5+} , 1319.8 M^{6+} . Pureza: >98% (HPSEC analítico, intercambio de anión analítico).

EJEMPLO 15

15 **Compuesto 25**

La insulina GMB B1 **20** (25 mg) se conjuga con pentasacárido **5** (23 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar derivado de insulina pentasacárido B1 **25** (16 mg, 47%). ESI-MS calculado para $C_{320}H_{487}N_{67}O_{137}S_{14}$ = 7913, encontrado en Q-TOF 2637 M^{3+} ; 1978 M^{4+} ; 1583 M^{5+} . Pureza: >95% (HPSEC analítico), >98% (intercambio de anión analítico).

EJEMPLO 16

25 **Compuesto 26**

La insulina B29-GMB **19** (13 mg) se conjuga con pentasacárido **14** (12 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar derivado de insulina pentasacárido

B29 26 (5 mg, 31%). ESI-MS calculado para $C_{312}H_{471}N_{67}O_{133}S_{14}$ = 7737, encontrado en Q-TOF 2578 M^{3+} ; 1934 M^{4+} . Pureza: >98% (HPSEC analítico).

EJEMPLO 17

5 Compuesto 27

La insulina GMB B1 20 (15 mg) se conjuga con pentasacárido 14 (13 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar derivado de insulina pentasacárido B1 27 (8 mg, 40%). ESI-MS calculado para $C_{312}H_{471}N_{67}O_{133}S_{14}$ = 7737, encontrado en Q-TOF 2578 M^{3+} ; 1934 M^{4+} . Pureza: >98% (HPSEC analítico).

EJEMPLO 18

Compuesto 28

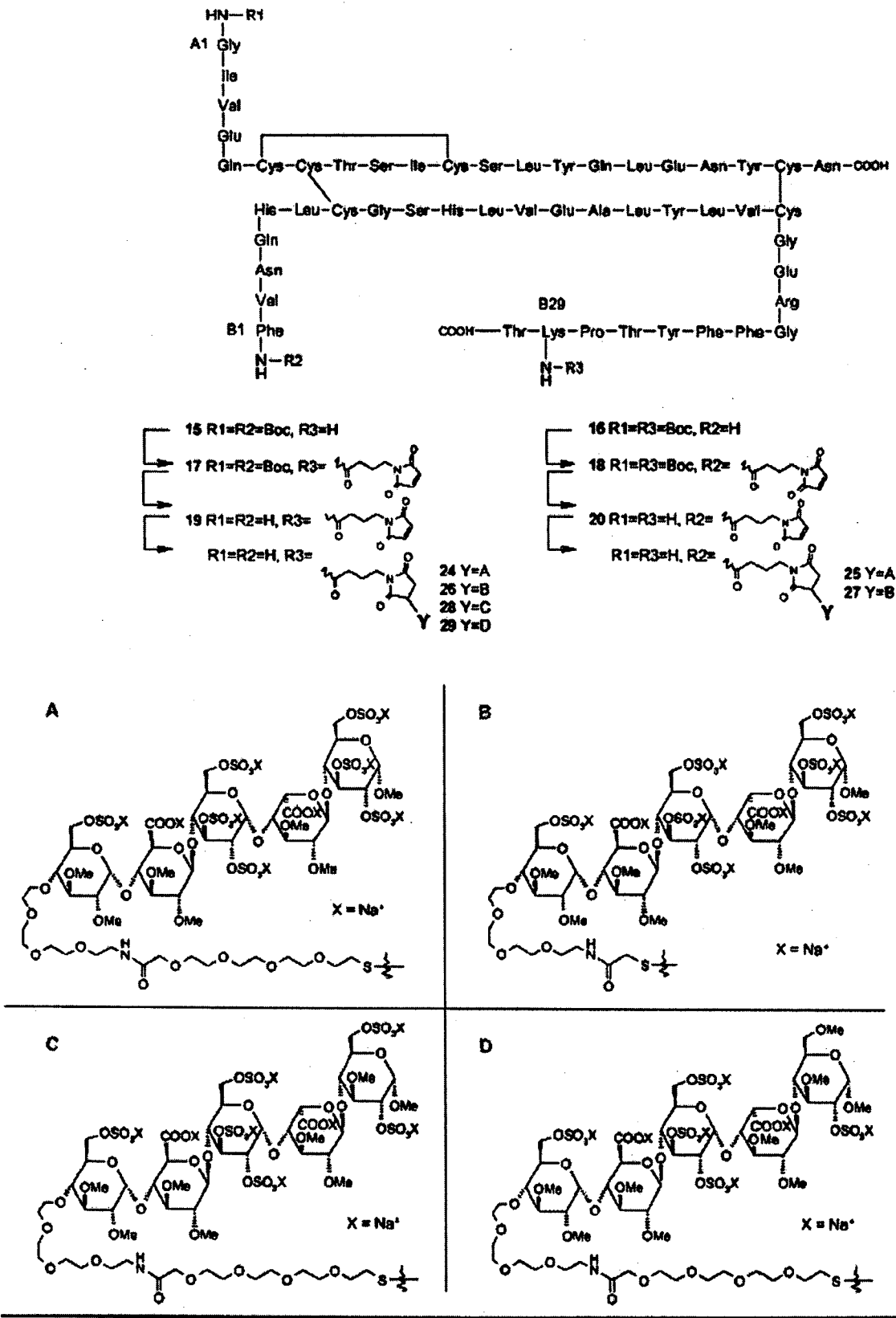
15 La insulina B29-GMB 19 (15 mg) se conjuga con pentasacárido 12 (13 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar derivado de insulina pentasacárido B29 28 (6 mg, 30%). ESI-MS calculado para $C_{321}H_{489}N_{67}O_{134}S_{13}$ = 7847, encontrado en Q-TOF 1962 M^{4+} ; 1570 M^{5+} ; 1308 M^{6+} . Pureza HPSEC: >98%.

20 EJEMPLO 19

Compuesto 29

La insulina B29-GMB 19 (15 mg) se conjuga con pentasacárido 11 (13 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar derivado de insulina pentasacárido B29 29 (7 mg, 33%). ESI-MS calculado para $C_{322}H_{491}N_{67}O_{131}S_{12}$ = 7782, encontrado en Q-TOF 2593 M^{3+} ; 1945 M^{4+} ; 1556 M^{5+} . Pureza: >98% (HPSEC analítico).

Esquema 4. Síntesis de conjugados de insulina-pentasacárido 24-29



Caracterización

Cromatografía de exclusión de tamaño analítico

- 5 Los compuestos **24-29** se someten a análisis HP-SEC analítico en una columna Superdex 75 26/10. La elusión se desarrolla con 50 mM de acetato de amonio a un índice de flujo de 1.0 mL/min.

Tabla 1. Análisis HPSEC de conjugados de insulina 24-29

10

Compuesto	HPSEC (Superdex 75)	
	Ta	Pureza
24	12.7 min	>98%
25	12.5 min	>95%
26	12.7 min	>98%
27	12.5 min	>98%
28	12.7 min	>98%
29	12.8 min	>98%
Insulina rech	15.0 min	>98%

Se observan todos los conjugados **como picos únicos (pureza de al menos >95%)** que ilustran la ausencia de formas agregadas de insulina-pentasacárido.

15 ***Análisis de secuencia de Terminal N***

Los conjugados de insulina-pentasacárido **24-29**, así como también los precursores correspondientes **15, 16, 19 y 20** se someten a análisis de secuencia

de terminal *N* (degradación Edman). En cada uno de los ciclos que se llevan a cabo, los derivados de insulina sustituida B29 **15, 19, 24, 26, 28 y 29** producen cantidades equimolares de ambos aminoácidos de cadena A- y B- a un nivel comparable con aquel de las cantidades iniciales de los conjugados. Esto indica

5 accesibilidad completa de ambos terminales *N* y así la ausencia de porciones conjugadas que son por lo tanto confinadas en la posición B29. En contraste, solo los aminoácidos de cadena A se encuentran durante el secuenciamiento del terminal *N* de los derivados de insulina sustituida B1 **16, 20, 25 y 27**, que demuestra la conjugación en la posición B1 como una consecuencia de la

10 inhibición de la degradación Edman en el terminal *N* de la cadena B.

Ensayo de unión hATIII competitivo utilizando Análisis de Interacción Biomolecular

15 **Principio y propósito del ensayo:** el Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) estudia la interacción entre (bio)moléculas por inmovilización covalente de uno de los interactuantes en una superficie chip de sensor, e inyección del otro interactuante en el flujo de amortiguador continuo sobre esta superficie. La unión se registra como un cambio en el índice de refracción sobre esta superficie y es

20 proporcional al peso molecular (Mw) de los interactuantes.

El estudio de la interacción entre hATIII y conjugados de pentasacárido, el compuesto **9** se acopla covalentemente a la superficie chip del sensor. La unión de hATIII con el pentasacárido genera una señal fuerte como una resultante de la

25 diferencia en Mw entre el enlace pentasacárido ligando (pequeño) y el analito hATIII (grande). Muestras preincubadas que contienen una concentración constante de concentraciones variables y hATIII del pentasacárido libre o

114

conjugado se inyectan sobre la superficie. La unión de pentasacárido o conjugado a ATIII durante la preincubación resultará en una reducción de la unión ATIII en el pentasacárido inmovilizado. Este ensayo de unión competitiva permite la determinación de los valores IC_{50} para cada conjugado de pentasacárido.

5

Procedimiento experimental: El compuesto 9 se acopla covalentemente a un chip sensor CM5 por acoplamiento de amina a pH 8.5. El chip sensor se activa por EDC/NHS durante 15 min. y posteriormente el compuesto 9 se inyecta en una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Los grupos hidroxisuccinimida no reactivos se hacen reaccionar con etanolamina durante 7 min. La superficie se regenera por tres inyecciones pequeñas de 5 μL 5 mol/L de NaCl, a un índice de flujo de 25 $\mu\text{L/min}$. La inmovilización del pentasacárido no se puede detectar, sin embargo, la unión de hATIII a una superficie tratada como se describe se encuentra específica, demostrando la presencia de pentasacárido sobre la superficie. Unas series de concentraciones de hATIII se ensayan para estimar una concentración sensitiva para inhibición (a 80% de unión máxima). Se llevan acabo inyecciones de tres minutos a una tasa de flujo de 20 $\mu\text{L/min}$, en ambas superficies, blanco y la superficie inmovilizada en serie a 25° C. Un punto de reporte se genera a 170 s. La superficie se regenera mediante 12 inyecciones de 5 mol/L de NaCl.

20

Se ensayan las muestras contra una concentración constante de hATIII (es decir 15 nmol/L) y las concentraciones de conjugado de pentasacárido varían entre 0.78-100 nM. La inyección hATIII o punto de reporte conjugado de pentasacárido es un conjunto a 100% de unión. Se utiliza el % de unión relativo de los pentasacáridos y los conjugados comparados con la unión máxima para generar una curva simoide (con pendiente variable) al graficar la [concentración] log versus el % de unión del cual se derivan los valores IC_{50} .

25

115

Tabla 2. Valores IC_{50} que expresan potencial de unión ATIII en un ensayo de unión competitivo (estudio BIA)

Compuesto	BIA (unión ATIII competitiva)	
	IC_{50}	95% de intervalo de confianza
7 (referencia)	96 nM	53.1-173 nM
8 (referencia)	58 nM	33.7-99.1 nM
9 (referencia)	5.5 nM	5.1-5.8 nM
24	8.5 nM	7.9-9.3 nM
25	9.1 nM	8.2-10.0 nM
26	4.5 nM	4.2-4.7 nM
27	15 nM	13.3-17.0 nM
28	96 nM	50.6-183 nM
29	68 nM	33.9-137 nM

5

Conclusión – La diferencia en IC_{50} entre la referencia de pentasacáridos portadora 7-9 (Figura 5, Tabla 2) confirma su potencial de unión competitivo a ATIII, una medida para la afinidad de unión para ATIII, se pueden ajustar al cambiar el número de grupos sulfato contenidos en estas moléculas. El potencial de unión (competitivo) (IC_{50}) de todos los conjugados de insulina-pentasacárido correspondientes (24-29) para hATIII que cae en el mismo rango cuando se compara con los pentasacáridos de referencia parientes 7-9 (Figura 6, Tabla 2). Estos datos indican que las propiedades farmacocinéticas de los conjugados se pueden ajustar al utilizar pentasacáridos portadores alternativos con diferentes afinidades de unión para ATIII

10

15

Espectroscopia de masa

Un análisis de espectroscopia de masa típico de un conjugado de pentasacárido se describe en la Figura 7. Por ejemplo, el compuesto **24** con la fórmula bruta $C_{320}H_{487}N_{67}O_{137}S_{14}$ y una masa monoisotópica calculada de 7913, se ha analizado con un sistema ESI-QTOF. En el múltiple espectro ESI-MS cargado con iones a proporciones m/z de 1319.8 (6+), 1583.6 (5+), 1979.2 (4+), 2638.7 (3+) en línea con la distribución de carga de la insulina recH se ha encontrado. Adicionalmente, la distribución de isótopo de una aleatoriedad seleccionada de picos de carga múltiples (por ejemplo 5+) para $C_{320}H_{487}N_{67}O_{137}S_{14}$ (compuesto **24**) está de acuerdo con la distribución de isótopo calculada con el programa Isopro (ver líneas punteadas en la Figura 7A).

Procedimiento general para la configuración de decapeptidos antagonistas de GnRH con pentasacárido (EJEMPLOS 20, 21, 24, 25)

El derivado de Ganirelix **30** o **35** (70 mg) se disuelve en DMF (20 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agregan TBTU (14 mg, 1.05 equiv.) y NMM (25 μ L, 5 equiv.) y la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. El pentasacárido **8** o **9** (88 mg, 1.1 equiv.) se disuelve en DMF (10 mL) para dar una suspensión. Esta suspensión se agrega a la mezcla de reacción y la mezcla restante se agita durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye con agua (200 mL) y se liofiliza. El residuo resultante se purifica en sílice de fase inversa (C 18) con 0.01 M de acetato de amonio (pH 7) y un gradiente de 10 a 50% de ACN en eluciones en bloque. Las fracciones apropiadas se combinan y se liofilizan para dar el conjugado pentasacárido de ganirelix **31**, **32**, **36** o **37** como un polvo blanco. Se desarrolla HPLC analítico con un gradiente de elución al

(17)

iniciar con 90% de eluyente A (0.01 M de acetato de amonio) y 10% de eluyente B (ACN) durante 5 min., luego se aplica un gradiente a 100% de eluyente B en 30 min.

5 EJEMPLO 20

Compuesto 31

El derivado de ganirelix 30 (70 mg), que se prepara mediante síntesis de péptido de fase sólida como se describe en *J. Med. Chem.* 1992, 55, 3942-3948, se
10 conjuga con pentasacárido 8 (88 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar 31 (16 mg, 40%). Pureza 96% (HPLC analítico), 97% (intercambio de anión analítico). ESI-MS calculado para $C_{126}H_{191}ClN_{18}O_{62}S_6$ = 3175.0359, encontrado 792.7390 $[M-4H]^4$, 1057.3258 $[M-3H]^3$, 1062.9883 $[M+NH_3-3H]^3$ RMN 1H (D_2O , 400 MHz, HH-COSY): δ 8.56 (m, 1H), 8.53 (m, 1H), 8.10 (m, 1H), 7.76
15 (m, 2H), 7.68 (m, 2H), 7.47 (m, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.16 (m, 3H), 7.04 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 6.63 (m, 2H), 5.35-5.25 (m, 2H), 4.95 (m, 1H), 4.68- 4.61 (m, 1H), 4.61-4.51 (m, 2H), 4.50-4.38 (m, 2H), 4.38-4.25 (m, 3H), 4.24-3.96 (m, 15H), 3.90-3.84 (m, 1H), 3.84-3.67 (m, 8H), 3.67-3.20 (m, 53H), 3.19-3.09 (m, 4H), 3.09-2.98 (m, 12H), 2.98-2.84 (m, 8H), 2.77 (m, 2H), 2.13 (m, 1H), 1.96-1.72 (m, 5H), 1.68-1.42
20 (m, 5H), 1.42-1.20 (m, 7H), 1.18-0.89 (m, 13H), 0.85-0.71 (m, 5H).

EJEMPLO 21

Compuesto 32

25 El derivado de ganirelix 30 (70 mg) se conjuga con pentasacárido 9 (88 mg) de acuerdo con el procedimiento general para dar 32 (52 mg, 35%). Masa calculada para $C_{125}H_{189}ClN_{18}O_{65}S_7$ = 3240.9770; encontrado en ESI-QTOF 809.2219 $[M-4H]^4$

118

, 1079.2994 [M-3H]³⁻, 1084.9739 [M+NH₃]³⁻, 1090.6340, [M+2NH₃-3H]³⁻ RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, HH-COSY): δ 8.45 (m, 1H), 8.38 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.59 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.20 (m, 3H), 7.05 (d, 2H), 6.97 (m, 2H), 6.66 (m, 2H), 5.40-5.30 (m, 2H), 5.09 (d, 1H), 4.67-4.48 (m, 2H),
5 4.40-3.92 (m, 18H), 3.92-3.75 (m, 7H), 3.77-3.17 (m, 56H), 3.12-3.02 (m, HH), 3.02-2.98 (m, 8H), 2.97-2.83 (m, 4H), 2.81-2.75 (m, 2H), 2.14 (m, 1H), 1.99-1.86 (m, 5H), 1.82-1.23 (m, 12H), 1.22-0.90 (m, 13H), 0.87- 0.72 (m, 5H). Pureza: 95% (HPLC analítico), 97% (pureza de intercambio de anión analítico).

10 EJEMPLO 22

Compuesto 34

El compuesto 30 (100 mg) se disuelve en DMF. Se agregan TBTU (36 mg, 2 equiv.) y NMM (60 µL, 10 equiv.) y la mezcla de reacción se agita durante 1 hora a
15 temperatura ambiente. Luego el compuesto 33 (34 mg, 2 equiv.), que se prepara como se describe en WO 2005090382, se agrega y la mezcla de reacción se agita durante 16 horas a temperatura ambiente. El disolvente se remueve en vacío y el residuo restante se disuelve en agua/CAN, la solución resultante se somete a HPLC preparativo (gradiente: 80% de eluyente A (0.1% de TFA en H₂O) y 20% de
20 eluyente B (ACN) a 20% de eluyente A y 80% de eluyente B en 45 min.). Las fracciones apropiadas se combinan para dar, luego de liofilización, el compuesto 34 (60 mg, 60%) como un polvo blanco. Se desarrolla HPLC analítico al aplicar un gradiente de partida con 75% de eluyente A (0.1% de TFA en H₂O) y 25% de eluyente B (CH₃CN) a 20% de eluyente A y 80% de eluyente B en 15 min. Masa
25 calculada para C₉₄H₁₃₉ClN₁₈O₁₉ = 1859, encontrado en MALDI-TOF 1860 [M+H]⁺ y 1882 [M+Na]⁺. Pureza: >90% (HPLC analítico).

EJEMPLO 23

Compuesto 35

El compuesto **34** (60 mg) se disuelve en H₂O/TFA/ACN (7 mL, 5:1:1) y se agita
5 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agrega una cantidad extra de TFA
(2.5 mL) y la mezcla de reacción se agita durante otras 22 horas. El TFA se
evapora en vacío y la solución restante se liofiliza para dar **35** (45 mg, 77%) como
un polvo blanco. Masa calculada para C₉₀H₁₃₁ClN₁₈O₁₉= 1803, encontrado en
MALDI-TOF 1804 [M+H]⁺ y 1826 [M+Na]⁺. Pureza: >95% (HPLC analítico).

10

EJEMPLO 24

Compuesto 36

El derivado de ganirelix **35** (17 mg) se conjuga con pentasacárido **8** (19 mg) de
15 acuerdo con el procedimiento general. Se desarrolla purificación adicional
mediante HPLC preparativo (gradiente: 90% de eluyente A (0.01 M de acetato de
amonio) y 10% de eluyente B (CH₃CN) durante 5 min., then a 100% de B en 50
min.). Las fracciones apropiadas se combinan y se liofilizan para dar **36** (2 mg,
6%). Pureza: 94% (HPLC analítico), >98% (intercambio de anión analítico).

20

EJEMPLO 25

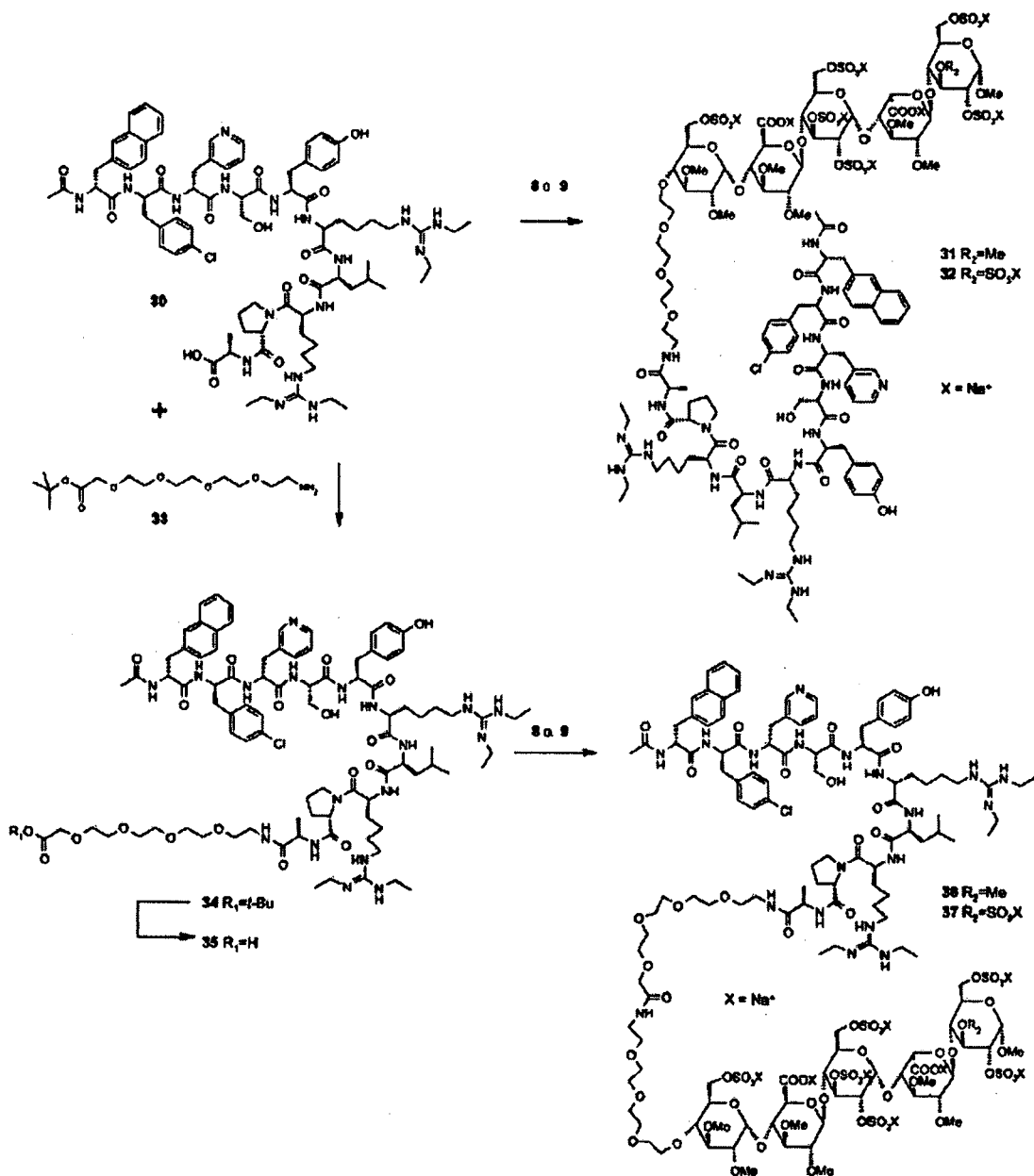
Compuesto 37

El derivado de ganirelix **35** (17 mg) se conjuga con pentasacárido **9** (19 mg) de
25 acuerdo con el procedimiento general. Se desarrolla purificación adicional
mediante HPLC preparativo como se describe para el compuesto **36**. Las

fracciones apropiadas se combinan y se liofilizan para dar **37** (1.16 mg, 3%).
Pureza: 88% (HPLC analítico). Pureza de intercambio de anión analítico: >95%.

Esquema 5. Síntesis de los compuestos 31, 32, 36 y 37.

5



Conclusión: Las diferencias en potencial de unión competitivo de ATIII entre por una parte los conjugados **31** y **32**, y por otra parte los conjugados **36** y **37** (como se describe en la Figura 8) revela que, sin tomar en consideración la longitud del

121

residuo ligado, la afinidad para ATIII se puede ajustar al cambiar el número de grupos sulfato contenidos en estas moléculas. Estos datos indican adicionalmente que las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de estos conjugados pueden ser ajustados por la elección del pentasacárido (ver estudios farmacocinéticos adelante). Adicionalmente, la unión de los conjugados a ATIII es específica, desde que el péptido ganirelix pariente no conjugado no muestra unión competitiva a ATIII.

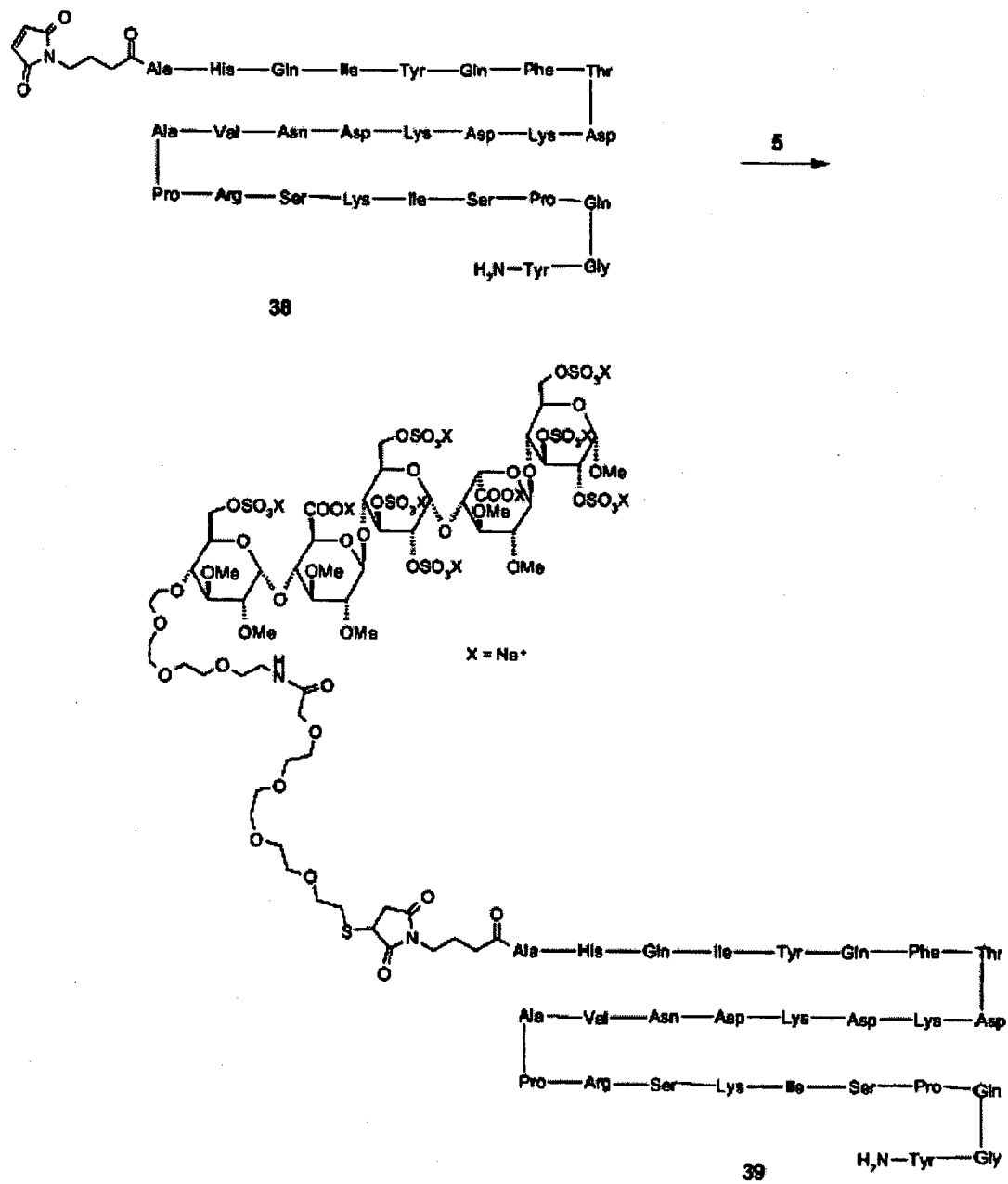
EJEMPLO 24

10

Compuesto 39

El compuesto 38 (26.5 mg, 8.4 μmol), suministrado por NeoMPS (Strasbourg, Francia), se disuelve en amortiguador $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M desgasificado (16 mL, pH 7.0). Se agrega pentasacárido 5 (45.5 mg, 21 μmol , 2.5 equiv.) bajo una atmósfera de nitrógeno y la mezcla resultante se agita durante aproximadamente 10 min. Luego se agrega una solución acuosa de NH_2OH (50% en peso, 69 μL) y la mezcla de reacción se agita durante 16 h. El producto se purifica en una columna Q-Sefarosa ($2\text{M NaCl}_{(\text{ac})}/\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, 10/40/1 $\rightarrow$ 40/10/1, v/v/v). La desalinización de las fracciones apropiadas se lleva a cabo utilizando cromatografía sephadex G25 como se describió anteriormente para proporcionar el compuesto 39 (15.7 mg, 35%). El rendimiento se determina por medición utilizando una absorbancia teórica de 0.48 para una solución 1 mg/mL. Masa calculada para $\text{C}_{196}\text{H}_{309}\text{N}_{41}\text{O}_{101}\text{S}_8 = 5108.8$; encontrado en ESI-Q-TOF = 1740.6 [M+5Na] $^{3+}$, 1311.2 [M-1H+6Na] $^{4+}$, 1053.5 [M-2H+7Na] $^{5+}$

Esquema 6. Síntesis de compuesto 39



5 Conclusión: Como se describe en la Figura 9 el potencial de unión competitivo de ATIII del conjugado 39 se conserva cuando se compara con el residuo espaciador pentasacárido pariente (ver Figura 5, compuesto 9). Estos datos sugieren que una extensión significativa de la vida media *in vivo* del péptido se puede alcanzar mediante la conjugación de pentasacárido portador de unión ATIII (ver estudio

10 farmacocinético adelante). Adicionalmente, la unión del conjugado a ATIII es

específica, desde que el péptido pariente no conjugado ADM(27-52) no muestra unión competitiva significativa a ATIII.

EJEMPLO 25

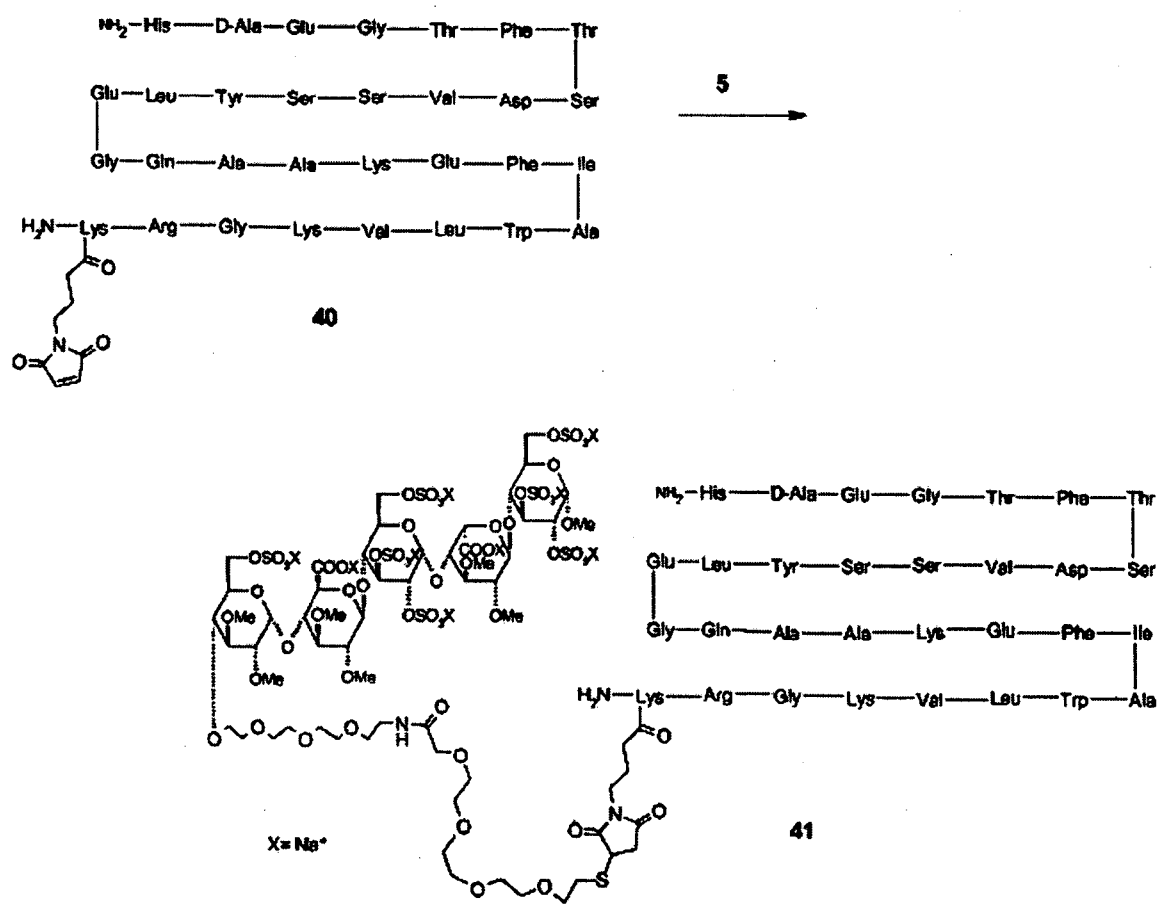
5

Compuesto 41

El compuesto **40** (15 mg, 4.2 μmol), preparado por NeoMPS (Strasbourg, Francia), se disuelve en amortiguador $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M desgasificado (8 mL, pH 7.0). Se agrega pentasacárido **5** (22.7 mg, 10.4 μmol , 2.5 equiv.) bajo una atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agita durante aproximadamente 10 min. Luego se agrega una solución acuosa de NH_2OH (50% en peso, 0.14 mL) y la mezcla de reacción se agita durante 16 h. El producto se purifica como se describe para el compuesto **39** para proporcionar compuesto **41** (1.38 mg, 6%). El rendimiento se determina por medición A_{280} utilizando una absorbancia teórica de 1.22 para una solución 1 mg/mL. Masa calculada para $\text{C}_{218}\text{H}_{342}\text{N}_{44}\text{O}_{106}\text{S}_8 = 5528$; encontrado en ESI Q-TOF = 1843.7 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1383.0 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1107 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$.

Conclusión: El potencial de unión competitivo de ATIII del conjugado **41** se conserva cuando se compara con el compuesto residuo espaciador pentasacárido pariente **9** (ver Figura 10). Estos datos sugieren que una extensión significativa de vida media *in vivo* del péptido se puede alcanzar por conjugación de pentasacárido portador de unión ATIII (ver estudio farmacocinético adelante).

Esquema 7. Síntesis de compuesto 41



EJEMPLO 26

10 **Compuesto 44**

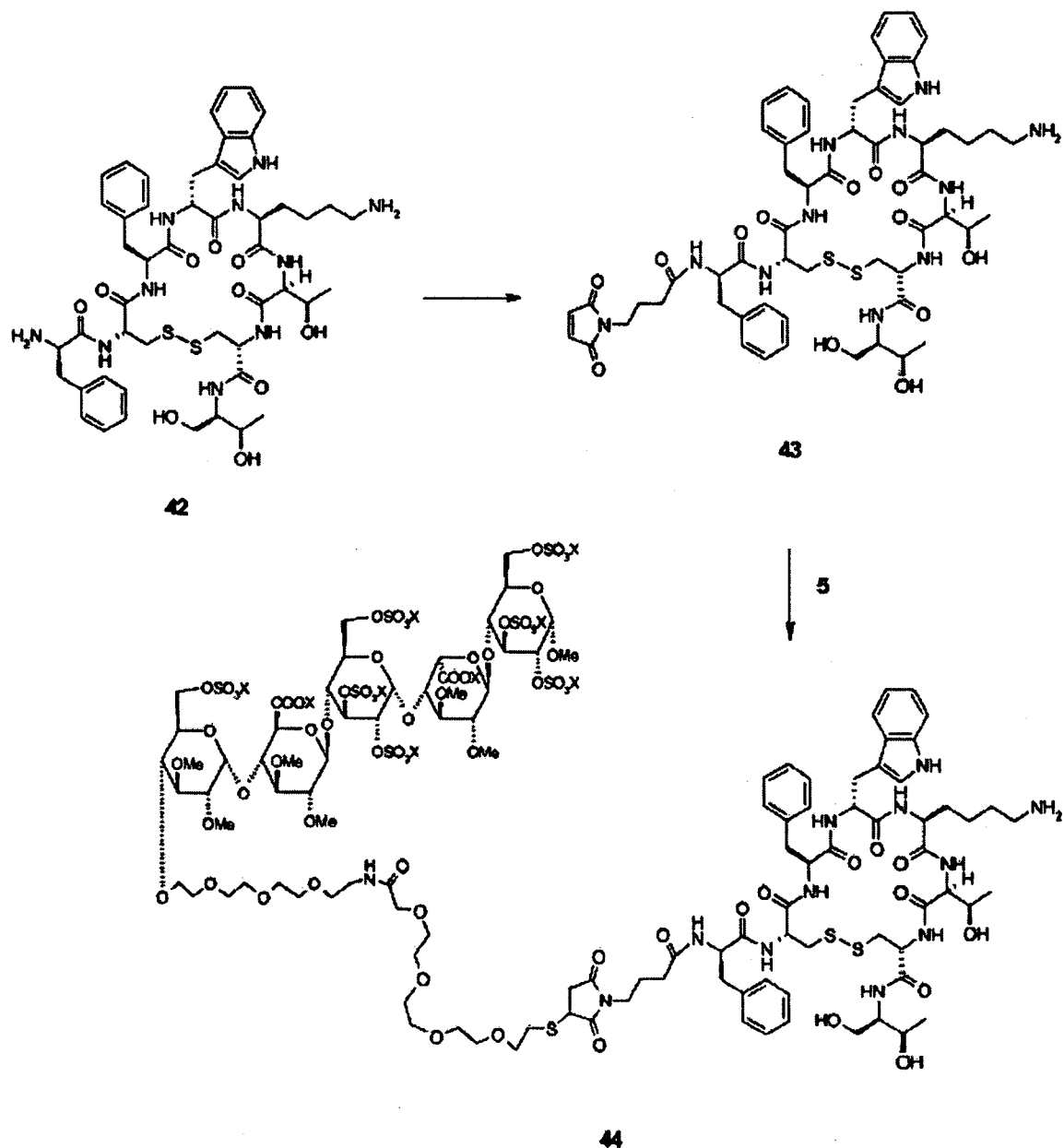
La octreotida (compuesto 42, 50 mg, 0.04 mmol), que se puede obtener de
proveedores comerciales tales como Bachem (Weil am Rhein, Alemania), se
disuelve en DMSO (5 mL). Se agrega AcOH (7 µL) para generar una solución
15 ligeramente ácida. Posteriormente se agrega GMBS (11.2 mg, 0.04 mmol, 1.0

125

equiv.) y la solución resultante se agita bajo nitrógeno durante 1 h. El análisis LC-MS muestra una conversión cuasi completa a ocreotida GMB **43** en la que la porción GMB se introduce al residuo Phe del terminal N de una forma altamente regioselectiva. La reacción se enfría a $\sim 5^{\circ}\text{C}$ después que se agrega una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (20 mL, pH 7.0). Después de 10 min. la mezcla se le permite alcanzar TA y N_2 se carga a través de la solución durante 10 min.. Luego se agrega pentasacárido **5** (21.8 mg, 0.01 mmol, 0.25 equiv.) como un sólido bajo una atmósfera de nitrógeno, seguido por una solución acuosa de NH_2OH (0.11 mL, 50% en peso) y la mezcla de reacción se agita durante 16 h. El producto se purifica por cromatografía de intercambio de ión como se describió anteriormente, para proporcionar el compuesto **44** (6.3 mg, 19%). Masa calculada para $\text{C}_{112}\text{H}_{170}\text{N}_{12}\text{O}_{70}\text{S}_{10} = 3122.7$; encontrado en ESI-Q-TOF = 1562.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1041.9 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$. RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, HH-COSY): δ 7.52-7.29 (m, 10H), 7.26-7.14 (m, 4H), 7.03 (s, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 5.12-4.89 (m, 2H), 4.77-4.60 (m, 3H), 4.45-3.97 (m, 18H), 3.95-3.76 (m, 13H) 3.75-3.35 (m, 57H), 3.33-2.59 (m, 18H), 2.22-1.16 (m, 2H), 1.85- 1.76 (m, 3H), 1.71-1.38 (m, 3H), 1.32-1.15 (m, 7H), 0.81-0.61 (M, 2H).

20

25

Esquema 8. Síntesis de compuesto 44

- 5 **Conclusión:** El potencial de unión competitivo de ATIII del conjugado 44 se conserva cuando se compara con el compuesto residuo espaciador pentasacárido pariente 9 (ver Figura 11). Estos datos son indicativos para una extensión significativa de vida media *in vivo* del péptido mediante conjugación a un pentasacárido portador de unión ATIII.

EJEMPLO 27

Compuesto 46

El pentasacárido **9** (100 mg) y GMBS (22 mg, 1.5 equiv.) se disuelven en DMF (10 mL). Se agrega DiPEA (18 μ L, 2 equiv.) y la mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evapora en vacío y el residuo se purifica en una columna G25 preparativa. Las fracciones combinadas se liofilizan para dar **46** (50 mg, 46%) como un polvo blanco. ESI-MS calculado para $C_{53}H_{77}N_2O_{55}S_7Na_9 = 2052$; encontrado en ESI-Q-TOF = 1027 M^{2+} .

10

EJEMPLO 28

Compuesto 47

El derivado de maleimida pentasacárido **46** se conjuga con el Cys¹²⁵ libre de rech-IL2 nativa (R&D systems, 202-IL/CF). Antes de conjugación se analiza rech-IL-2 por HPSEC, SDS- PAGE y MALDI-TOF MS que indica una composición monomérica predominante. El Rech-IL2 (1 mg, 800 μ L, 1.26 mg/mL en PBS que contiene 0.5% de SDS) se trata durante la noche a TA en un banco de cilindro con un exceso de compuesto **46** (59 μ L de una solución ac. 10 mg/mL, 5 equiv.) hasta alcanzar conversión completa del material de partida. Luego, maleimida no reactiva **46** se bloquea con unas 5 veces de exceso molar de cisteamina (16 μ L, 10 mg/mL) durante 3 h. La mezcla de reacción se dializa (corte 6-8 kDa) contra 0.5% de SDS en PBS para remover el exceso de cisteamina y **46** y la cantidad final del producto como se determina por A_{280} es de 0.69 mg.

25

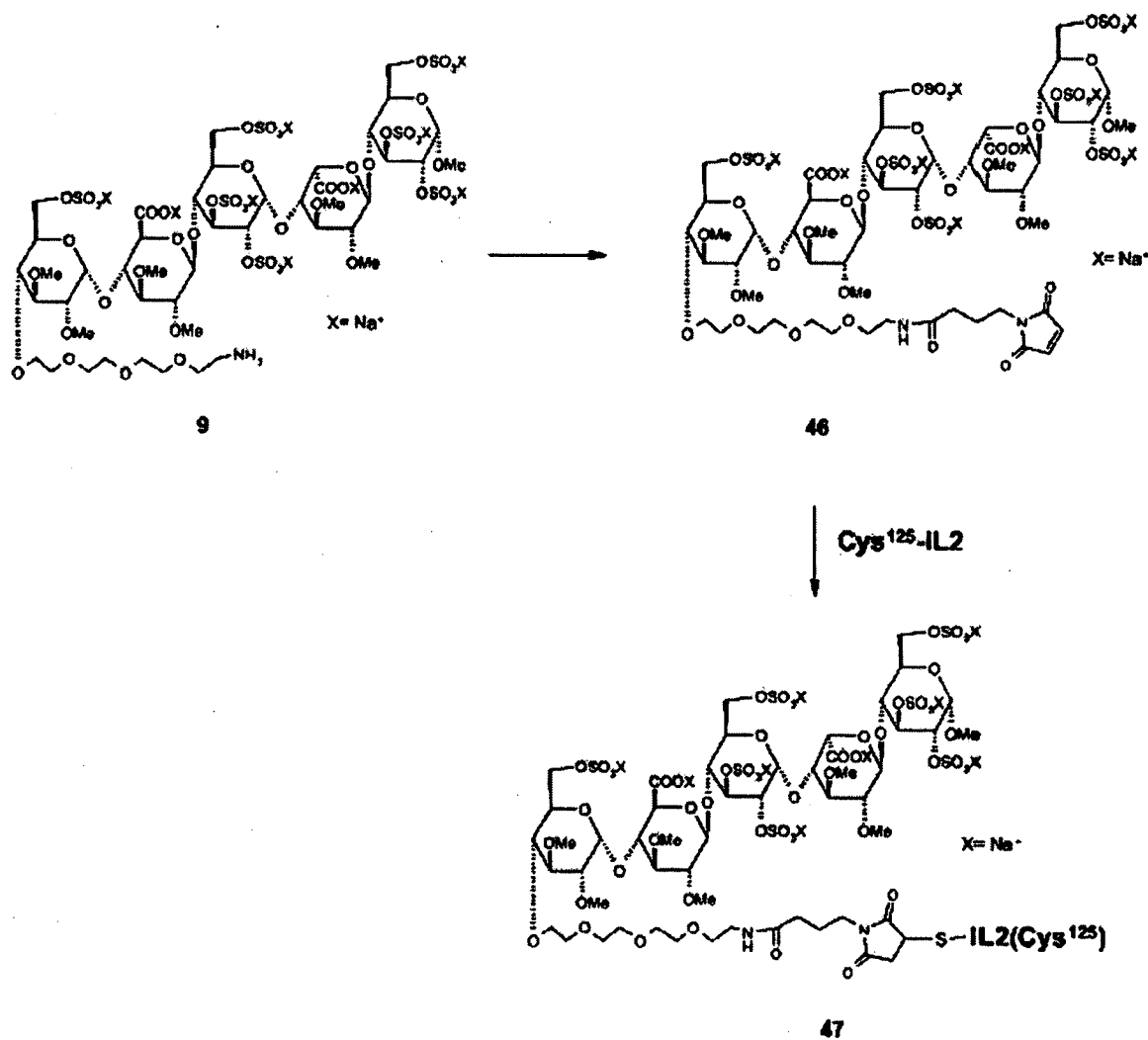
El conjugado final **47** se caracteriza por SDS-PAGE (4-12%) y Western blot (ver Figura 12). De las rutas 3 y 4 se concluye que el compuesto **47** tiene un Mw

relativo alto para rech-IL2 (que corresponde a la presencia de una porción pentasacárido). El análisis Western blot con incubaciones posteriores de a) 10 µg/mL de hATIII (HAT 950A2L - Kordia); b) a-hATIII (MoAb HATIII 200- Kordia); c) GAM-HRP (W402B 20373201 - Promega) y detección final con reactivo DAB

5 claramente revela la unión ATIII específica a IL2 que contienen pentasacárido (ruta 7 vs 8).

Esquema 9. Síntesis de conjugado 47

10



Farmacología

Determinación de farmacocinéticos de (poli) péptidos conjugados

- 5 Las propiedades farmacocinéticas de los ejemplos representativos de los compuestos de la invención se determinan como se describe en los siguientes párrafos.

ELISA Insulina Humana para determinación de Insulina en plasma de rata

10

La Prueba de Inmunoabsorbencia Ligada a Enzima humana (ELISA) se ha desarrollado para medir la insulina humana en plasma humano y de rata o sistema amortiguador. De esta forma el ELISA podría ser utilizado para determinar la concentración de insulina en muestras de plasma derivadas de experimentos

15 farmacocinéticos.

El ensayo se basa en el principio "sandwich" inmunoquímico utilizando dos anticuerpos monoclonales, es decir un enlace de fase sólida, anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección que se etiqueta con peroxidasa de rábano

20 (HRP).

Para la determinación de las propiedades farmacocinéticas del conjugado de insulina-pentasacárido 6 e insulina humana recombinante (la insulina rech, tanda SIHRO17, de Diosynth, Países Bajos), se incuban muestras de plasma de rata

25 durante 1 h a temperatura ambiente, mientras se agita a 10 Hz. Durante esta incubación, el conjugado de insulina-pentasacárido 6 o la insulina rech se une al anticuerpo de anti-insulina inmovilizado. Después de un segundo procedimiento de

lavado, el anticuerpo de detección de anti-insulina conjugado con HRP se agrega a la unión del complejo de insulina inmovilizada. Se lava la placa para remover el anticuerpo etiquetado con enzima no unido y posteriormente se agrega la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina/H₂O₂. La reacción se detiene con 0.5 M de ácido sulfúrico y la placa de microtítulo se lee espectrofotométricamente a 450 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de insulina. Luego se determina para cada muestra de plasma la concentración media (mol/L) de insulina.

10 *Determinación de las propiedades farmacocinéticas del compuesto 6*

El comportamiento farmacocinético del conjugado de insulina 6 y la insulina rech se estudian en ratas macho Wistar 300 - 400 gr. Las ratas se anestesian por inhalación de una mezcla de O₂/N₂O/isoflurano, después se canula la vena yugular derecha. Al día siguiente las ratas se tratan i.v. con dosis de 3.5 nmol/kg del compuesto 6 o la insulina rech, después de lo cual la sangre se prueba en varios intervalos de tiempo. La sangre se centrifuga después de que el plasma se desvía y almacena a -20°C hasta su uso. La concentración de los compuestos ensayados en las muestras de plasma se determinan utilizando el ELISA humano contra una curva de calibración que se elabora de la solución madre del compuesto ensayado en si mismo. La concentración en las muestras se expresa en nmol/L y se calculan los parámetros cinéticos con el modelo de no compartimiento de WinNonlin.

25 *Conclusión:* Como se puede ver en la Figura 13 y Tabla 3 las propiedades farmacocinéticas del conjugado de insulina-pentasacárido 6 se mejoran fuertemente comparados con aquellos de la insulina rech pariente.

131

Tabla 3. *Parámetros farmacocinéticos después de administración i.v. del compuesto 6 o la insulina rech (3.5 nmol/kg) en rata. Se desarrolla experimento en n= 3 /tratamiento.*

5

	Conjugado de insulina-pentasacárido 6	Insulina rech
	Media ± e.e.m.	Media ± e.e.m.
T1/2 eli (h)	2.8 ± 0.1	0.033 ± 0.001
AUCinf (h.nmol/L)	72.5 ± 6.4	4.6 ± 0.8
Vss (L/kg)	0.11 ± 0.01	0.012 ± 0.002
Cl (L/h/kg)	0.049 ± 0.004	0.80 ± 0.12
MRT (h)	2.1 ± 0.1	0.014 ± 0.1

Determinación de farmacocinéticos después de etiquetado con ¹²⁵I

Conjugados de pentasacárido **24, 28, 29, 31, 32, 39 y 41** se etiquetan con ¹²⁵I utilizando el método lactoperoxidasa, de acuerdo con Machalonis et al. (*Biochem J.* 1969, 113: 299-305). Después de etiquetado, el conjugado se purifica por filtración de gel en Sephadex G25 e intercambio de anión HiTrap QIO. Los experimentos cinéticos se repiten como se describe para el compuesto **6** pero utilizando en cambio conjugados etiquetados ¹²⁵I. Con el fin de prevenir acumulación de ¹²⁵I⁻ en la tiroides, las ratas se tratan oralmente con 10 mg/kg de yoduro de potasio antes de la administración del compuesto.

La determinación correcta del destino de los conjugados etiquetados ¹²⁵I⁻ puede ser afectada adversamente por deshalogenación endógena intracelular metabólica

para dar ¹²⁵I libre en circulación. Ya que el ¹²⁵I libre en si mismo muestra una eliminación de vida media de 3.2 h en ratas (control, datos no mostrados), la medida general de vida media de los compuestos etiquetados ¹²⁵I con una vida media relativamente corta que podría ser prolongada y la vida media determinada experimentalmente de los compuestos con una vida media relativamente alta se puede acortar. Verdaderamente, la eliminación observada de la vida media de los conjugados **31**, **32** y **39** demuestran de una forma cualitativa la conjugación de os péptidos a un pentasacárido portador que se carga para prologar el tiempo de residencia.

10

La adaptación del método descrito anteriormente al medir la radioactividad en la píldora (0.1 mL) después de precipitación con unas 40 veces de volumen de TCA más alto (10% de concentración final) proporciona los parámetros farmacocinéticos de los compuestos **24**, **28**, **29** y **41** que se corrigen para deshalogenación ¹²⁵I competente.

15

*Farmacocinéticos de conjugados de insulina-pentasacárido **24**, **28** y **29** se comparan con insulina rech.*

20 ***Tabla 4.** Parámetros farmacocinéticos después de administración i.v. de conjugados de insulina **24**, **28** y **29**. Se desarrolla experimento en n=3/tratamiento. Para la comparación de insulina rech se ensayan en n=1 (se normalizan dosis expresadas en cpm).*

	Compuesto 24	Compuesto 28	Compuesto 29	Insulina rech
	Media ± e.e.m.	Media ± e.e.m.	Media ± e.e.m.	valor(n=1)
Correlación	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00

133

T1/2 eli	3.0 ± 0.2	3.9 ± 0.1	5.5 ± 0.3	0.74
AUCinf (h.cpm/0.1mL)	30447 ± 4034	13756 ± 590	14397 ± 517	481
Vss (Lkg)	0.192 ± 0.022	0.428 ± 0.028	0.570 ± 0.018	2.225
Cl (L/h/kg)	0.068 ± 0.009	0.146 ± 0.007	0.139 ± 0.05	4.16
MRT (h)	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	4.1 ± 0.2	0.5

Conclusión: Las propiedades farmacocinéticas del conjugado de insulina-pentasacárido **24** como se determina por el método etiquetado ¹²⁵I (Figura 14, 5 Tabla 4) están de acuerdo con aquellas obtenidas con un conjugado de insulina-pentasacárido similar (compuesto **6**) que se determina por el método ELISA (Figura 13, Tabla 3). Las diferencias en los parámetros cinéticos para la insulina rech como se determina por dos métodos analíticos se pueden explicar por las 10 diferencias en la curva de extrapolación (para calcular Vss y Cl) debido a la desaparición rápida de la etiqueta de la circulación durante los primeros 15 min.

Adicionalmente, las diferencias observadas en AUC, Cl y Vss de los conjugados de insulina pentasacárido **24**, **28**, **29** (Figura 14, Tabla 4) claramente demuestran que las propiedades farmacocinéticas de los conjugados se pueden ajustar al 15 utilizar pentasacáridos portadores alternativos con diferente afinidad de unión para ATIII (las cuales están de acuerdo con los resultados del estudio BIA, ver Figura 6 y Tabla 2).

*Farmacocinéticos de conjugados de pentasacárido **31** y **32***

134

Tabla 5. *Parámetros farmacocinéticos después de administración i.v. de los dos conjugados 31 y 32. Se desarrolla experimento en n= 3/tratamiento. (Datos no corregidos para deshalogenación).*

	Compuesto 31	Compuesto 32
	Media ± e.e.m.	Media ± e.e.m.
Correlación	-1.00	-1.00
T1/2 eli (h)	7.1 ± 0.3	9.4 ± 0.6
Vss (ml/rata)	66.7 ± 2.3	52.5 ± 2.6
Cl (ml/h/rata)	7.9 ± 0.1	4.2 ± 0.3
MRT (h)	8.4 ± 0.2	12.6 ± 0.7

5

Conclusión: La vida media de ganirelix libre (T1/2 1.4 h en rata, i.v., Chan *et al. Drug. Metab. Dispos* 1991, 19, 858) se extiende significativamente cuando se conjuga a un pentasacárido portador (Figura 15, Tabla 5). La comparación de los farmacocinéticos del compuesto 31 a aquel del 32 muestran que una mejora en eliminación Vss, Cl y T1/2 se obtiene al utilizar un pentasacárido con una afinidad alta para ATIII. Estos datos en combinación con los resultados del estudio BIA (ver Figura 8) indican que las propiedades farmacocinéticas de los conjugados se pueden ajustar al utilizar pentasacáridos portadores alternativos con diferente afinidad de unión para ATIII.

10

15

Farmacocinéticos de conjugado de pentasacárido 39 y ADM(27-52)

Tabla 6. *Parámetros farmacocinéticos después de administración i.v. de ADM(27-52) y compuesto 39. Se desarrolla experimento en n= 3/tratamiento, (datos no corregidos para deshalogenación).*

20

135

	ADM(27-52)	Compuesto 39
	Media ± e.e.m.	Media ± e.e.m.
Correlación	-1.00	-1.00
T1/2 eli (h)	4.9 ± 0.1	11.1 ± 0.2
Vss (mL/rata)	556 ± 48	80 ± 3.3
Cl (ml/h/)	112 ± 9	5.0 ± 0.1
MRT (h)	5.0 ± 0.1	14.5 ± 0.3

Conclusión: Las propiedades farmacocinéticas de ADM (27-52) se mejoran mediante conjugación a un pentasacárido portador de unión ATIII (compuesto 39, Figura 16, Tabla 6). El T1/2 de ADM(27-52) *per se* puede haber sido sobreestimado debido a los datos no han sido corregidos para deshalogenación. Más aún, la vida media de adrenomedulina libre es solo 22 min en humano (Meeran *et al. J. Clin. Endocrin. Met.* 1997, 82, 95-100). Estas y las anteriores observaciones en el estudio BIA (Figura 9) soportan la conclusión de una mejora de las propiedades farmacocinéticas de un (poli)péptido se pueden alcanzar por la conversión en un conjugado (portador) con afinidad de unión específica de circulación ATIII.

Farmacocinéticos de conjugado de pentasacárido 41 comparados con [D-Ala⁸ J-GLP- 1(7 -36)

Tabla 7. *Parámetros farmacocinéticos después de administración i.v. de GLP-1 y compuesto 41 Se desarrolla experimento en n=3/tratamiento (se normalizan los datos expresados en cpm)*

136

	[D-Ala ⁸]-GLP-1(7-36)	Compuesto 41
	Media ± e.e.m.	Media ± e.e.m.
Correlación	-0.98	-0.99
T1/2 eli (h)	2.0 ± 0.4	9.8 ± 0.4
AUCinf (h.cpm/0.1mL	1154 ± 59	108658 ± 4858
Vss (ml/kg rata)	2696 ± 456	205 ± 13
Cl (ml/h/kg)	1732 ± 86	18 ± 0.8
MRT (h)	1.6 ± 0.1	11.2 ± 0.3

Conclusión: Las propiedades farmacocinéticas de [D-Ala⁸]-GLPI(7-36) se mejoran mediante conjugación de un pentasacárido portador de unión ATIII (compuesto 41, Figura 17, Tabla 7). El Cl del compuesto 41 se disminuye ~100 veces y Vss 13 veces, resultando en un incremento de ~100 doblez en AUC (exposición) comparado con el péptido no conjugado. Estas observaciones combinadas con los datos BIA (Figura 10) soportan la conclusión de una mejora de propiedades farmacocinéticas de un (poli)péptido se pueden alcanzar por la conversión en un conjugado de unión ATIII.

10

Determinación de complejo de (poli)péptido-de pentasacárido ATIII en plasma de rata

Para asegurar que los conjugados de (poli)péptido de pentasacárido se unan a la Antitrombina III *in vivo*, un ELISA tipo sándwich que emplea un Mab anti-insulina como captura y un anticuerpo anti-ATIII HRP conjugado con como detector se lleva a cabo en muestras de plasma del experimento farmacocinético del compuesto 6. Obviamente, solo el complejo de ATIII-insulina-pentasacárido intacto

15

137

se puede detectar en este tipo de ensayo en el cual la insulina rech se utiliza como control negativo).

De la muestra de plasma obtenida 1 min después de administración i.v. de 3.5 nmol/kg del compuesto 6 o la insulina rech en rata, se determina la unión del conjugado de insulina-pentasacárido 6 y la insulina rech a ATIII de rata. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Conclusión: El conjugado de insulina-pentasacárido 6 se une a ATIII, en contraste con insulina rech el cual no puede formar un complejo con ATIII. Aunque el anticuerpo ATIII anti-conejo es menos sensible, ambos anticuerpos ATIII son capaces de detectar el complejo conjugado de insulina-pentasacárido-ATIII 6. Estos resultados demuestran que el compuesto 6 se une a ATIII en circulación y que la vida media prolongada de pentasacáridos de unión ATIII es el resultado de esta complejación. Por lo tanto, se puede concluir que la mejora de las propiedades farmacocinéticas de conjugados de (poli)péptido de pentasacárido (tal como compuesto 6) comparado con el (poli)péptido no conjugado original se puede atribuir a la unión específica del conjugado a ATIII.

20 Ensayo de supresión de glucosa in vivo en ratas

Las actividades biológicas de la insulina y los conjugados de insulina se ensayan en un modelo de rata al medir los niveles de glucosa. Se colocan los animales en ayuno durante la noche (16 horas) antes del experimento. En la mañana se prueba la sangre en todas las ratas al cortar un pequeño pedazo de la cola, después de lo cual la sangre se gotea en una tira de ensayo y se miden los niveles de glucosa con un monitor de glucosa en sangre ACCU-Check Sensor

(Roche Diagnostics). El conjugado de insulina-pentasacárido 6 y la insulina se administran i.v. en la vena de la cola después de pre-calentar las ratas en una caja de calentamiento a 39° C durante 10 min. Las dosis aplicadas son de 7 nmol/kg para el conjugado de insulina-pentasacárido 6 y 3.5 nmol/kg para la insulina rech.

- 5 Se toman muestras de sangre en varios intervalos de tiempo para remover la sangre encostrada, después se determina inmediatamente el contenido de glucosa según se describe.

Farmacodinámicos de conjugado de insulina pentasacárido 6

10

Las propiedades farmacocinéticas mejoradas del conjugado de insulina-pentasacárido 6 comparadas con aquellas de la insulina rech se confirman por los niveles de supresión de glucosa prolongados después de administración i.v. (ver Figura 19).

15

En los experimentos desarrollados con los compuestos 24, 25, 26, 27 e insulina detemir (control), se dejan morir de hambre las ratas junto antes de la administración del compuesto (para asegurar los niveles de glucosa consistente en el grupo de control).

20

La comparación del conjugado de insulina-B29 24 con conjugado de insulina-B29 26 (Figura 20), y conjugado de insulina-B1 25 con conjugado de insulina-B1 27 (Figura 21), revela que las actividades de supresión de glucosa prolongadas se obtienen de longitud espaciadora.

25

Sorprendentemente, se ha encontrado que el comienzo de la acción de todos los conjugados de insulina ensayados es más lento que aquellos de la insulina rech o

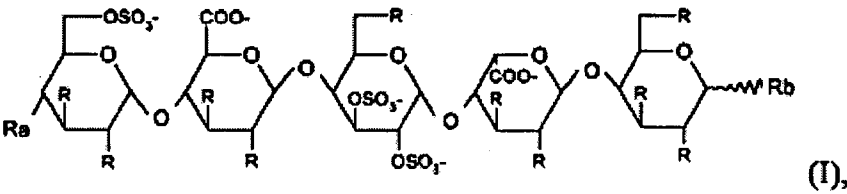
insulina detemir (administración i.v.) y que la exposición se logra por la larga duración de la acción.

La comparación directa de los conjugados de insulina B29 **24**, **28** y **29** dentro de un experimento en la dosis de 24 nmol/kg justifica la duración de la acción de sus actividades de baja glucosa en la sangre (ver Figura 22). Así, la supresión de los niveles de glucosa con el compuesto **24** dura más allá de 7h, mientras que los conjugados **28** y **29** no fueron más activos de 5.5h después de administración i.v. Las diferencias farmacocinéticas correspondientes con las diferencias farmacocinéticas mencionadas anteriormente en el volumen de distribución y espacio libre del compuesto **24** comparado con el compuesto **28** y **29**, respectivamente. Finalmente, la insulina detemir se ensayan como un ejemplo comparativo que muestra actividad prolongada y pronunciada menor en dosis de 24 y 48 nmol/kg (Figura 21, 22).

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de un polipéptido y un oligosacárido, en donde el polipéptido se conjuga con al menos un residuo espaciador-oligosacárido, el oligosacárido es un oligosacárido sulfatado sintético que comprende de 4-18 unidades de monosacárido y tiene afinidad *per se* con antitrombina III y el espaciador es un enlace o un residuo ligado flexible inactivo farmacológicamente esencial, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el oligosacárido consiste de 4-6 unidades de monosacárido.
3. El conjugado de la reivindicación 1 o 2, en donde el oligosacárido es un pentasacárido.
4. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene un nivel de plasma circulante de < 50 nM.
5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el oligosacárido *per se* tiene una actividad anticoagulante que es de nivel subterapéutico cuando se compara con la actividad farmacológica del polipéptido *per se*.
6. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el residuo espaciador-oligosacárido tiene la estructura (I)

141

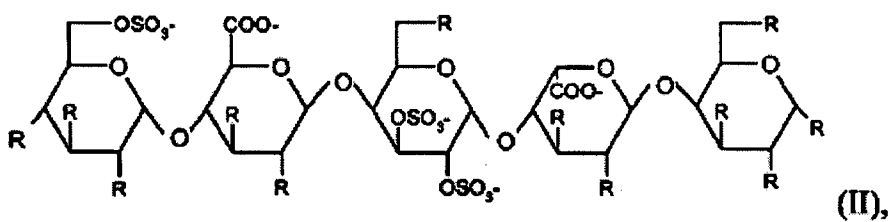


en donde un residuo ligado flexible inactivo esencial farmacológicamente
está presente y en donde R es independientemente OSO_3^- , alcoxi (1-8C)
o un residuo ligado flexible inactivo farmacológicamente esencial, y

Ra es independientemente OSO_3^- , alcoxi (1-8C), un residuo ligado flexible
inactivo farmacológicamente esencial o un residuo de oligosacárido, que
comprende de 1 - 13 unidades de monosacárido, y

Rb es independientemente alcoxi (1-8C), un residuo ligado flexible inactivo
farmacológicamente esencial o un residuo de oligosacárido, que
comprende de 1 - 13 unidades de monosacárido, se compensa la carga
mediante contraiones cargados positivamente.

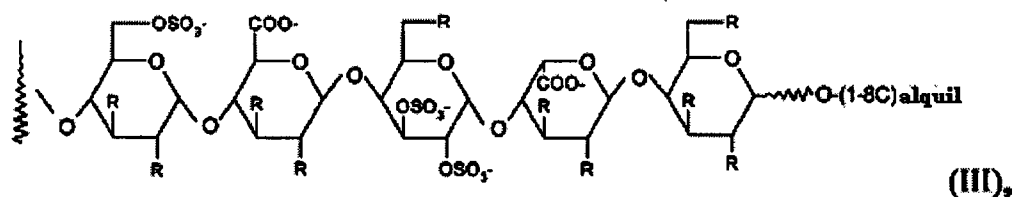
7. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde
el residuo espaciador-oligosacárido es un residuo espaciador
pentasacárido que tiene la estructura (II)



en donde un residuo ligado flexible inactivo farmacológicamente esencial
está presente y en donde R es independientemente OSO_3^- o alcoxi (1-

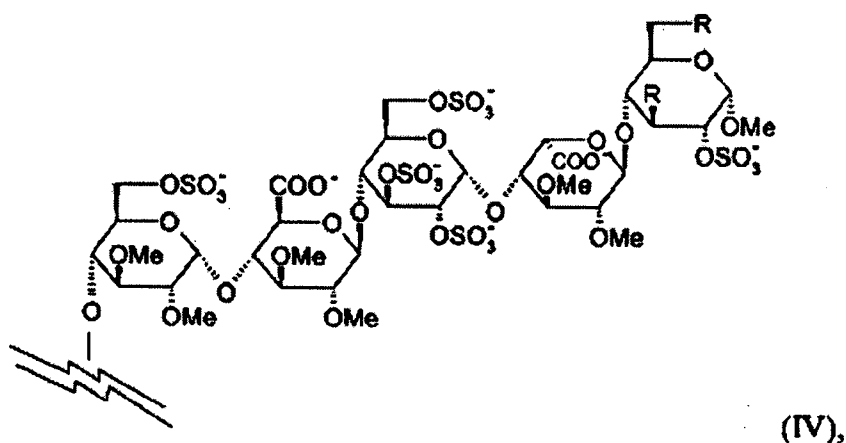
8C), o un residuo ligado flexible inactivo farmacológicamente esencial, se compensa la carga mediante contraiones cargados positivamente.

8. El conjugado de la reivindicación 7, en donde el residuo de pentasacárido tiene la estructura (III)



en donde R es independientemente OSO_3^- o alcoxi (1-8C), se compensa la carga mediante contraiones cargados positivamente.

9. El conjugado de la reivindicación 8, en donde el residuo de pentasacárido tiene la estructura (IV)



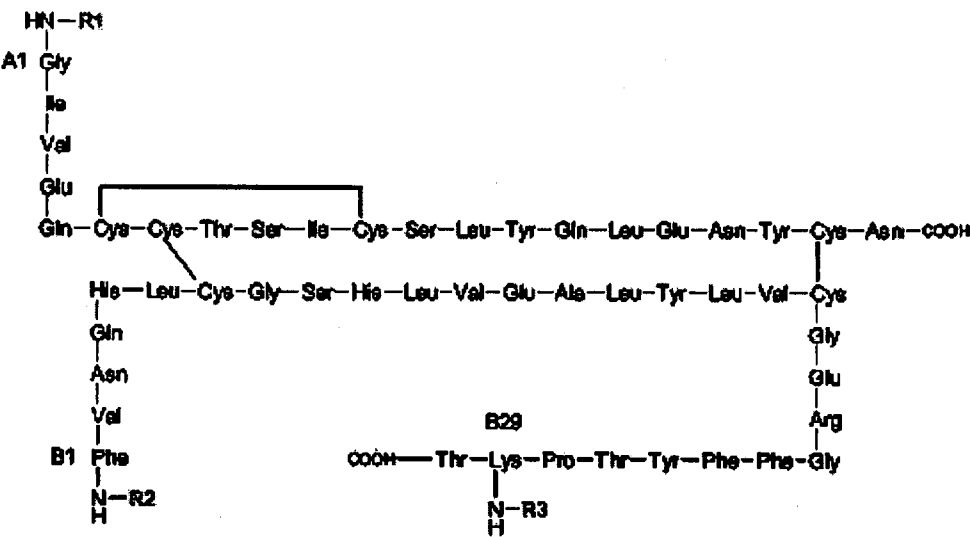
en donde R es independientemente OCH_3 o OSO_3^- .

10. El conjugado de la reivindicación 9, en donde ambos grupos R en (IV) son OSO_3^-

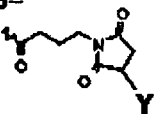
11. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el polipéptido tiene un peso molecular de ~ 0.3 - 50 kDa.
- 5 12. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el polipéptido tiene un peso molecular de ~0.3 - 20 kDa
13. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el polipéptido tiene un peso molecular de ~0.3 - 7.5 kDa
- 10 14. El conjugado de la reivindicación 11, en donde el polipéptido se selecciona de insulina, calcitonina, ganirelix, GLP-1, [D-Ala⁸]-GLP-1(7-36), adrenomedulina, ADM(27-52), kisspeptina-10, octreotida o interleucina-2.
- 15 15. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el polipéptido se selecciona de insulina, ADM(27-52), y [D-Ala⁸]-GLP-1(7-36).
- 20 16. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el polipéptido es monosustituido con un residuo espaciador-pentasacárido.
- 25 17. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el espaciador es un residuo ligado flexible inactivo farmacológicamente esencial.

144

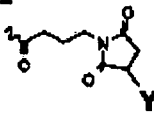
18. El conjugado de la reivindicación 17, en donde el espaciador tiene una longitud de 10-50 átomos.
19. El conjugado de la reivindicación 17 o 18, el espaciador comprende al menos un elemento $-(CH_2CH_2O)-$
20. El conjugado de la reivindicación 1, se selecciona de las estructuras



en donde R1=R2=H, R3=

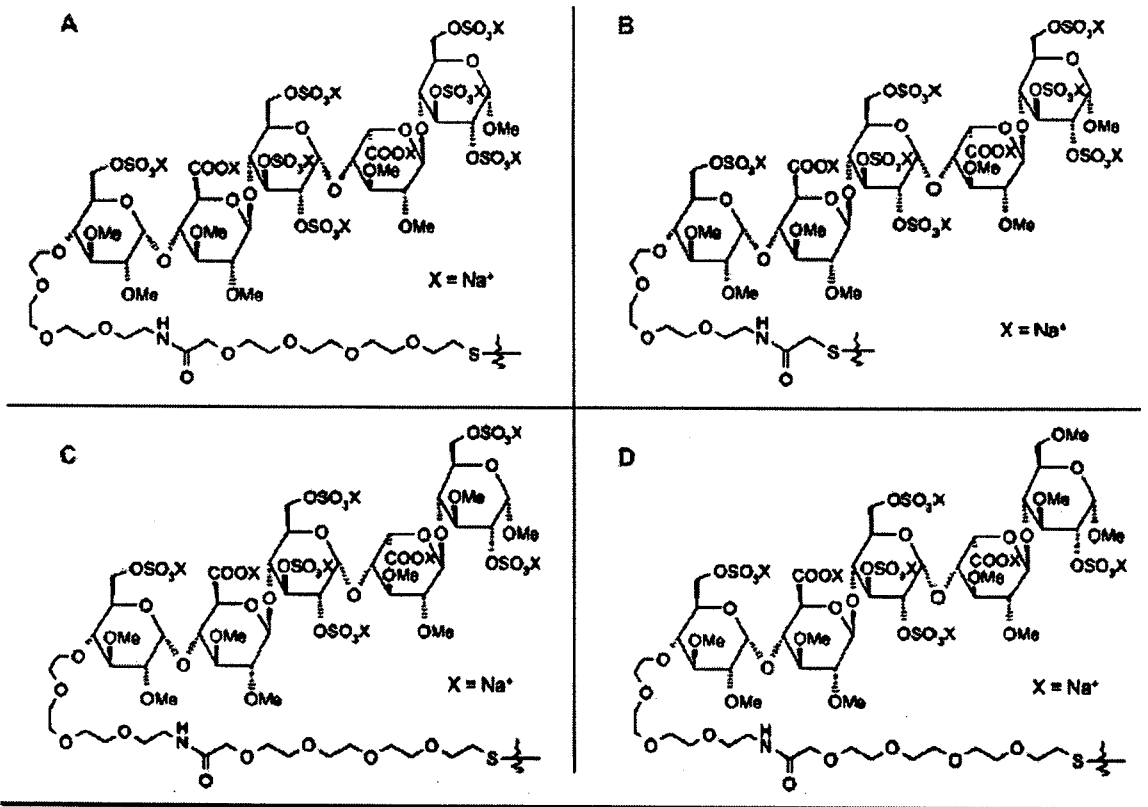


o en donde R1=R3=H, R2=



y en donde Y se selecciona de las estructuras A, B, C y D

145

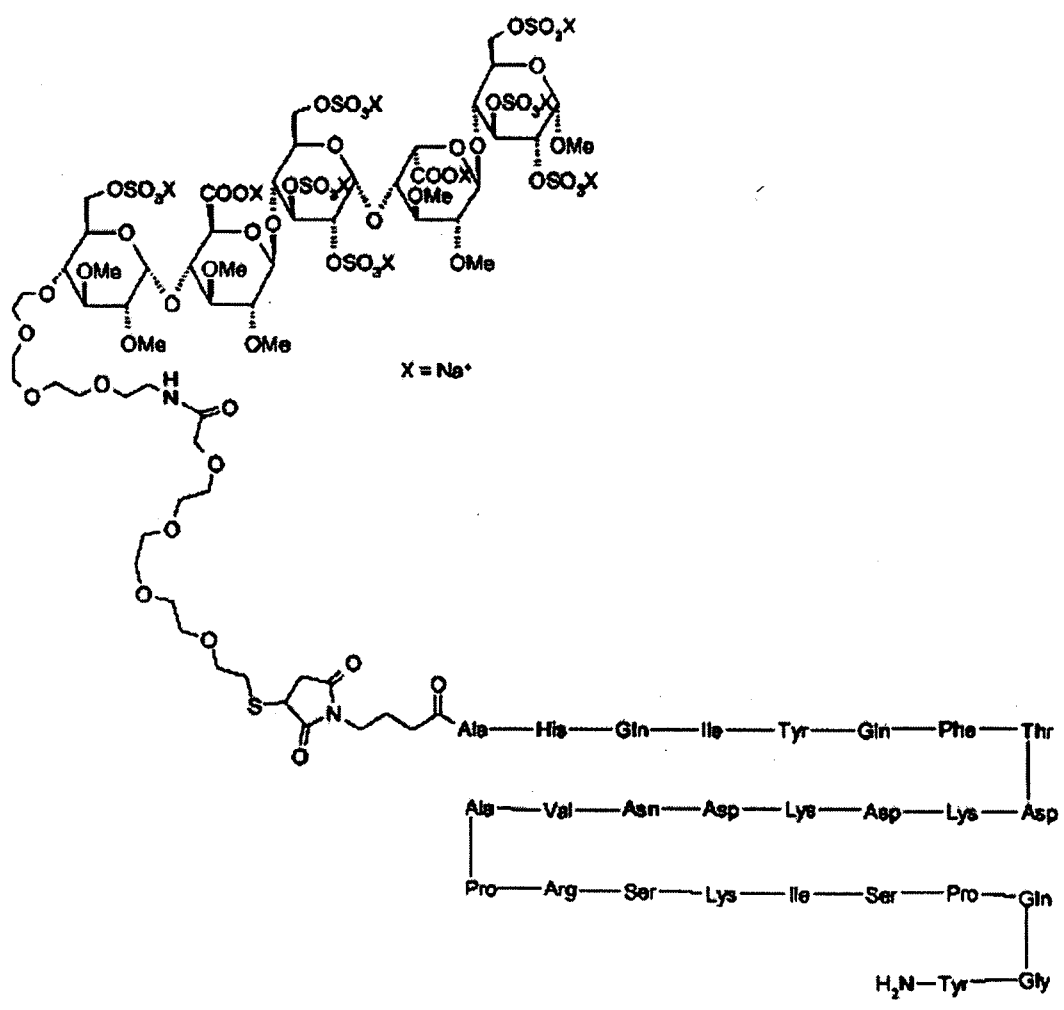


21. El conjugado de la reivindicación 20, en donde Y se selecciona de las estructuras A y B.

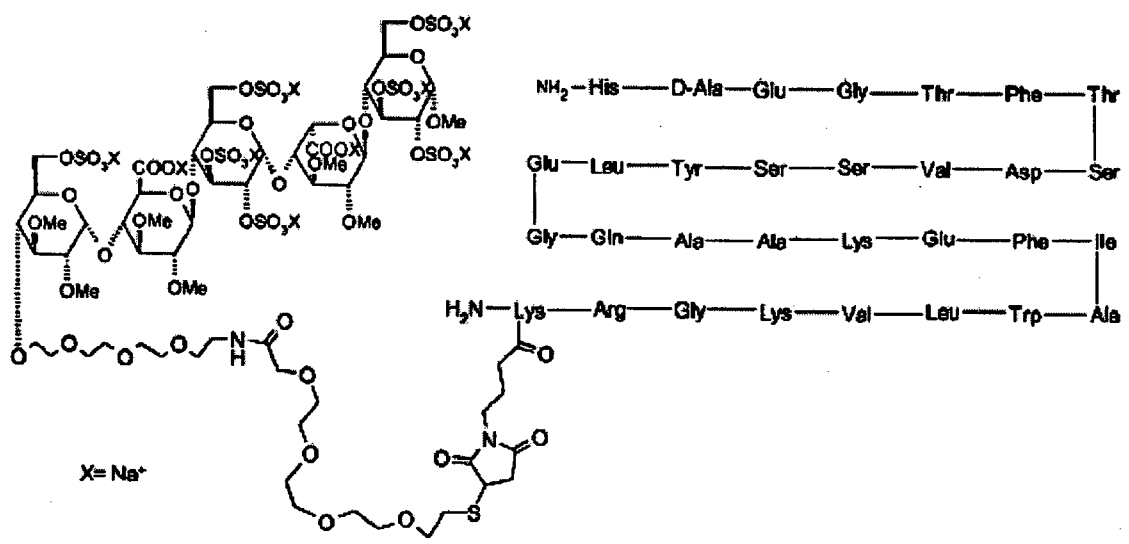
5

22. El conjugado de la reivindicación 1, que tiene la estructura

146



23. El conjugado de la reivindicación 1, que tiene la estructura



1247

24. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y auxiliares farmacéuticamente adecuados.

5 25. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para uso en terapia.

10 26. El uso del conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para la fabricación de un medicamento para tratar un paciente en necesidad del tratamiento con un cierto polipéptido terapéutico, en donde el medicamento comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 que tiene propiedades farmacocinéticas mejoradas sobre dicho polipéptido.

15 27. Un proceso para la preparación de un conjugado de un polipéptido y un oligosacárido, en donde el polipéptido se conjuga con al menos un residuo espaciador-oligosacárido, el oligosacárido es un oligosacárido sulfatado sintético que comprende de 4-18 unidades de monosacárido que tiene afinidad *per se* con antitrombina III y el espaciador es un
20 enlace o un residuo ligado flexible inactivo farmacológicamente esencial, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

que comprende (a) una etapa opcional en donde el polipéptido se adapta para conjugación, y (b) una etapa de acoplamiento en donde el
25 polipéptido adaptado opcionalmente se hace reaccionar con una molécula espaciador-oligosacárido.

28. El proceso de la reivindicación 27, en donde el oligosacárido consiste de 4-6 unidades de monosacárido.

5 29. El proceso de la reivindicación 27 o 28, en donde el oligosacárido es un pentasacárido.

10 30. Un proceso para la preparación de un conjugado activo terapéuticamente que comprende un polipéptido, el conjugado tiene actividad anticoagulante despreciable, en donde el conjugado tiene una vida media de plasma mayor que la del polipéptido original mientras la actividad biológica se retiene esencialmente, que comprende una etapa en donde un oligosacárido es un oligosacárido sulfatado sintético que comprende de 4-18 unidades de monosacárido, el cual tiene afinidad *per se* a antitrombina III (ATIII), está covalentemente ligado a un

15 polipéptido a través de un enlace o un residuo ligado flexible inactivo farmacológicamente esencial.

20 31. El proceso de la reivindicación 30, en donde el oligosacárido consiste de 4-6 unidades de monosacárido.

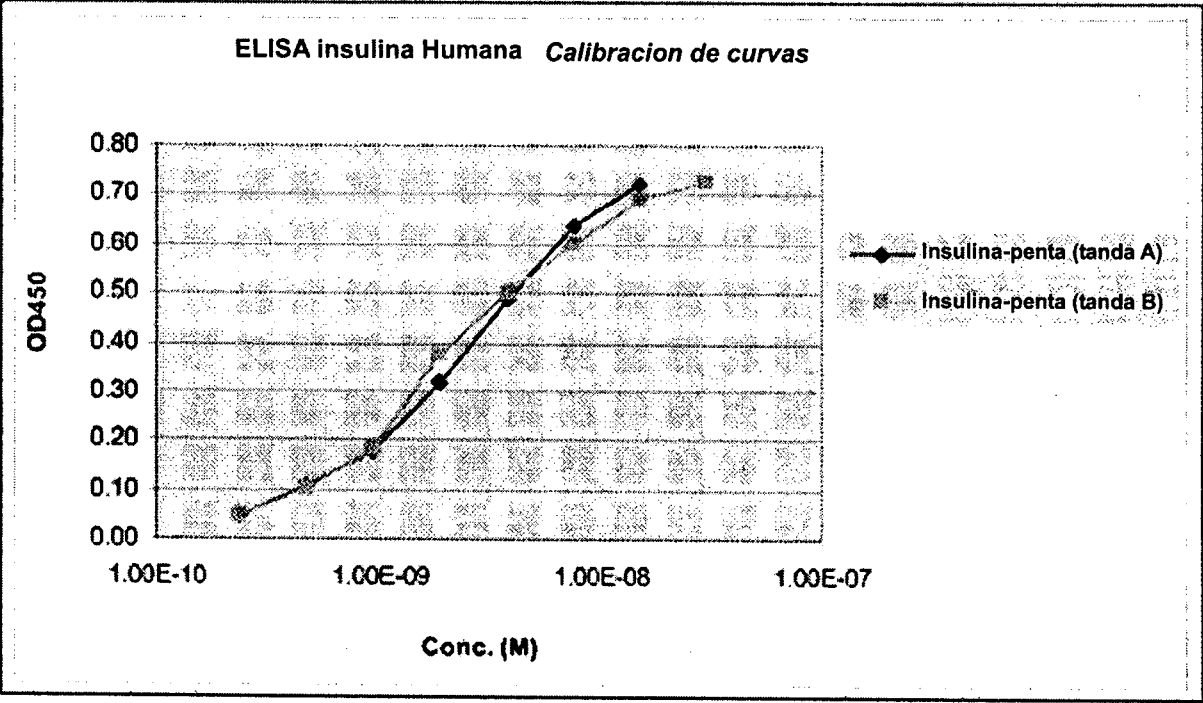
32. El proceso de la reivindicación 30 o 31, en donde el oligosacárido es un pentasacárido.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con conjugados de un polipéptido y un oligosacárido, en donde el polipéptido reconjuga con al menos un residuo
5 espaciador de oligosacárido, el oligosacárido es un oligosacárido sintético sulfatado que comprende 4-18 unidades de monosacárido y *per se* tienen afinidad con la antitrombina III y el espaciador es un enlace o un residuo de unión flexible inactivo farmacológicamente esencial, o una sal farmacéuticamente aceptable de
10 estos. Los conjugados de la invención han mejorado las propiedades farmacocinéticas cuando se comparan con los polipéptidos originales (es decir los polipéptidos no conjugados correspondientes *per se*).

150

FIGURA 1



151

FIGURA 2A

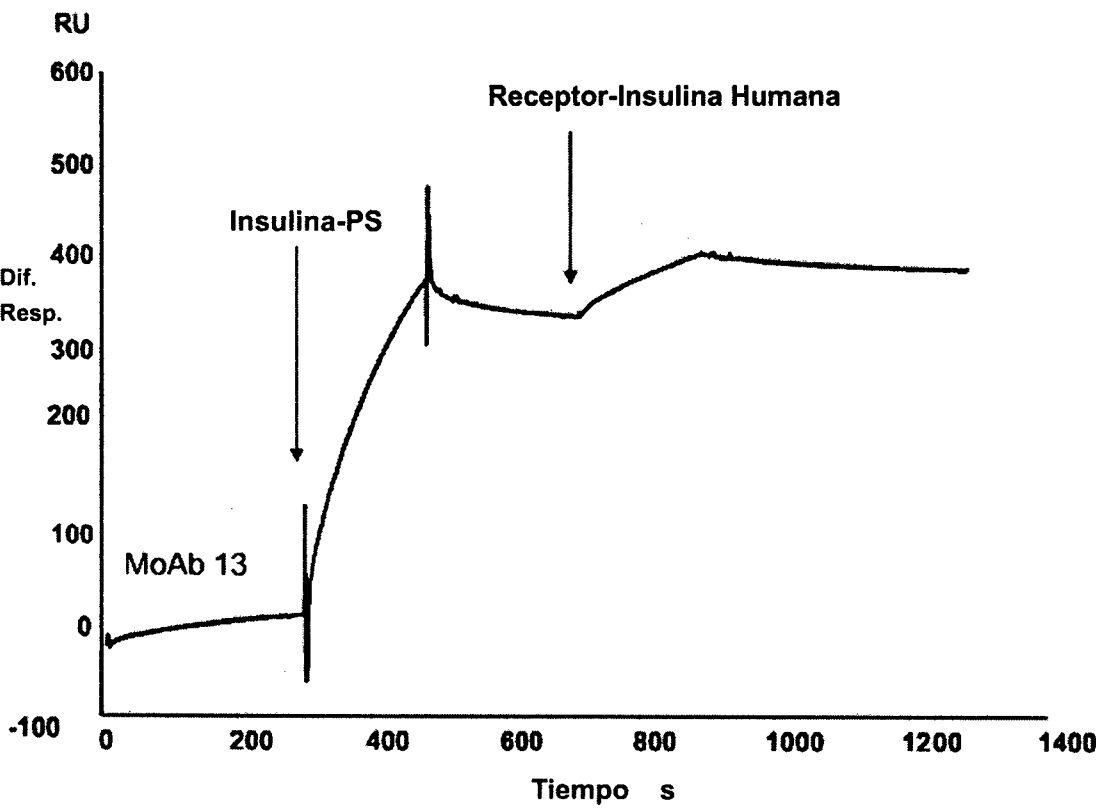


FIGURA 2B

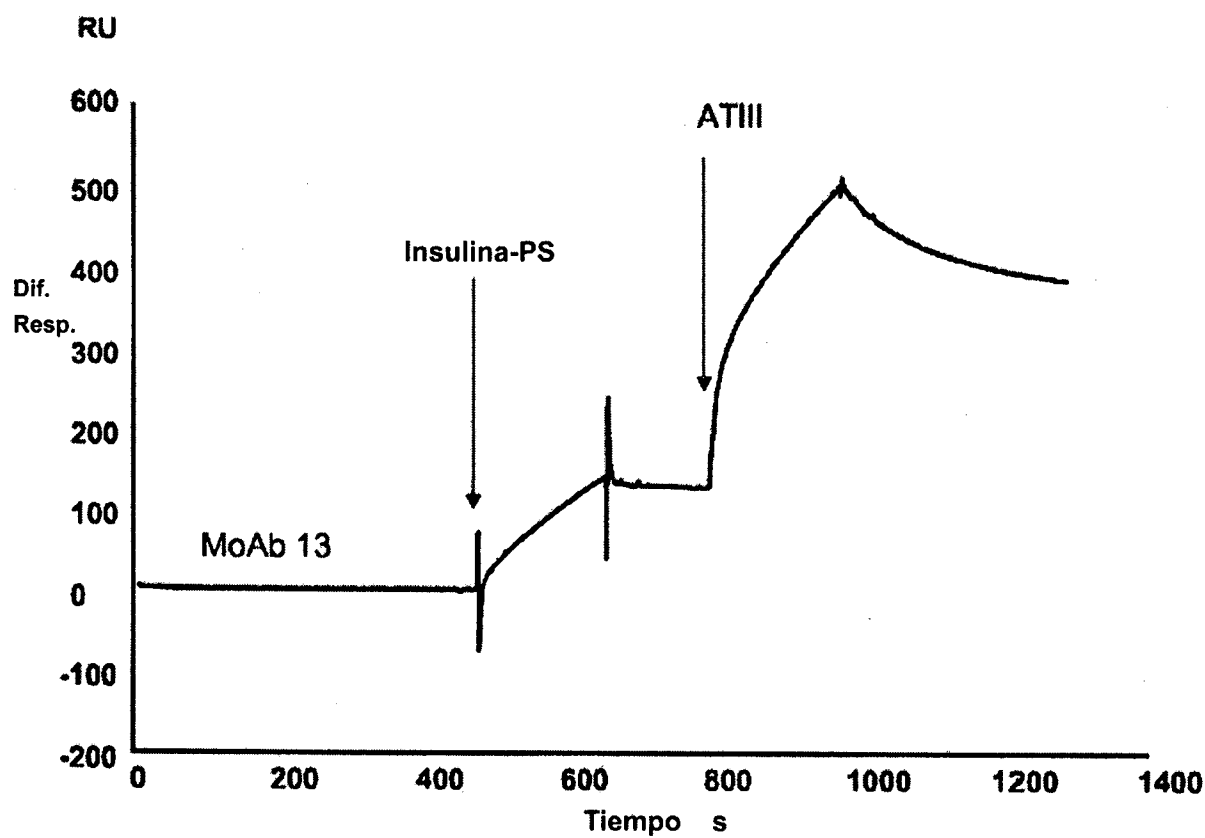
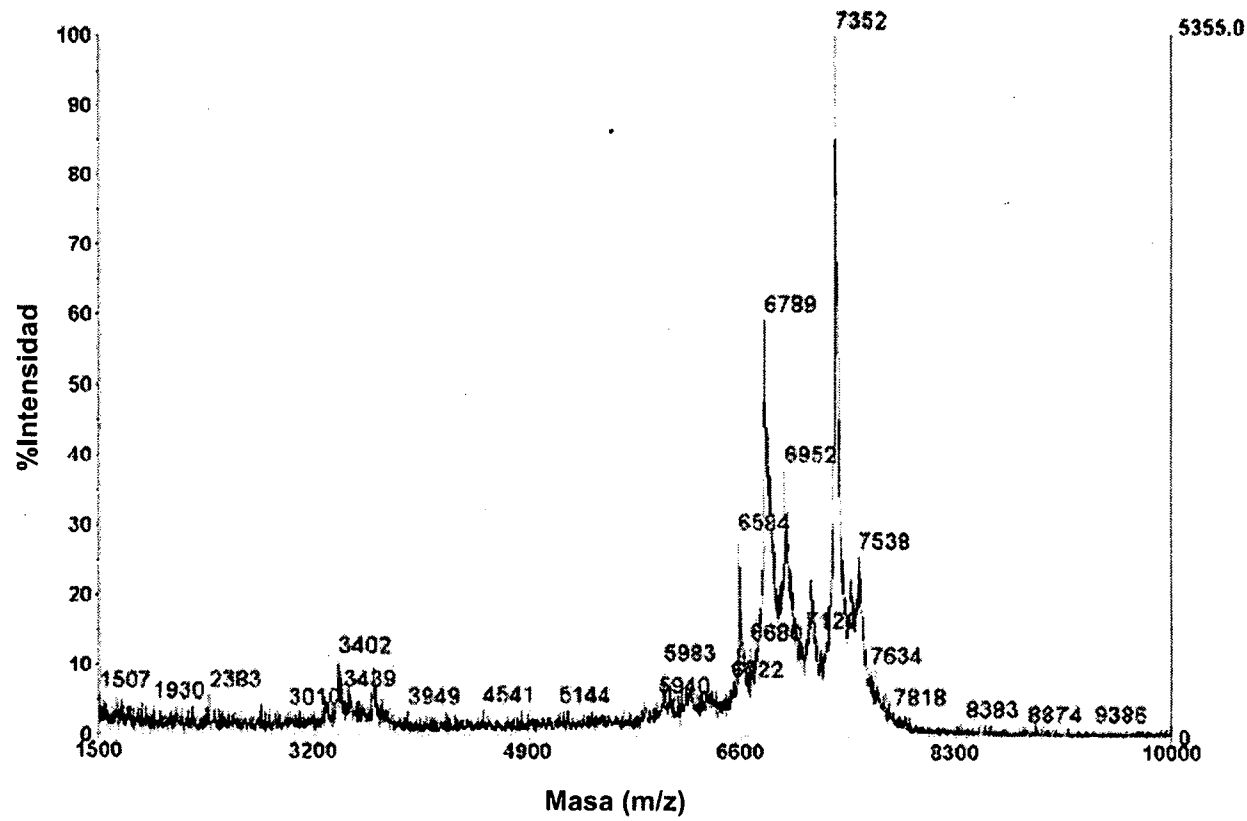
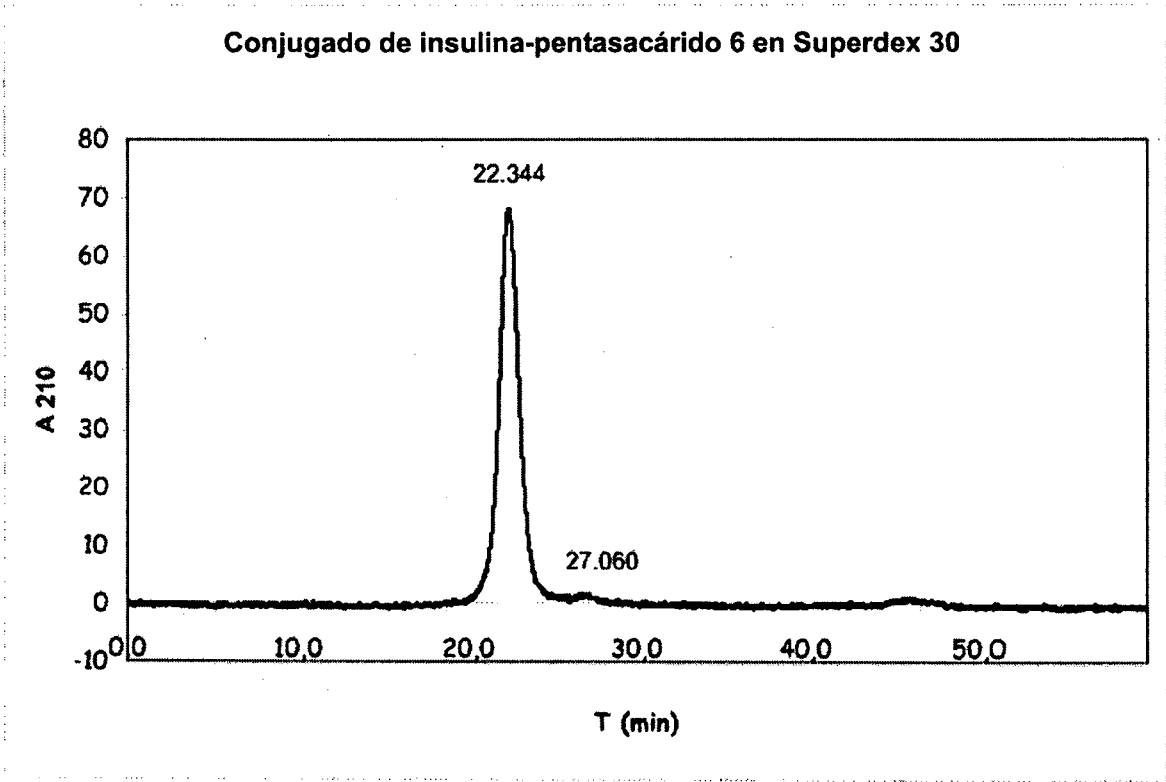


FIGURA 3



154

FIGURA 4



155

FIGURA 5

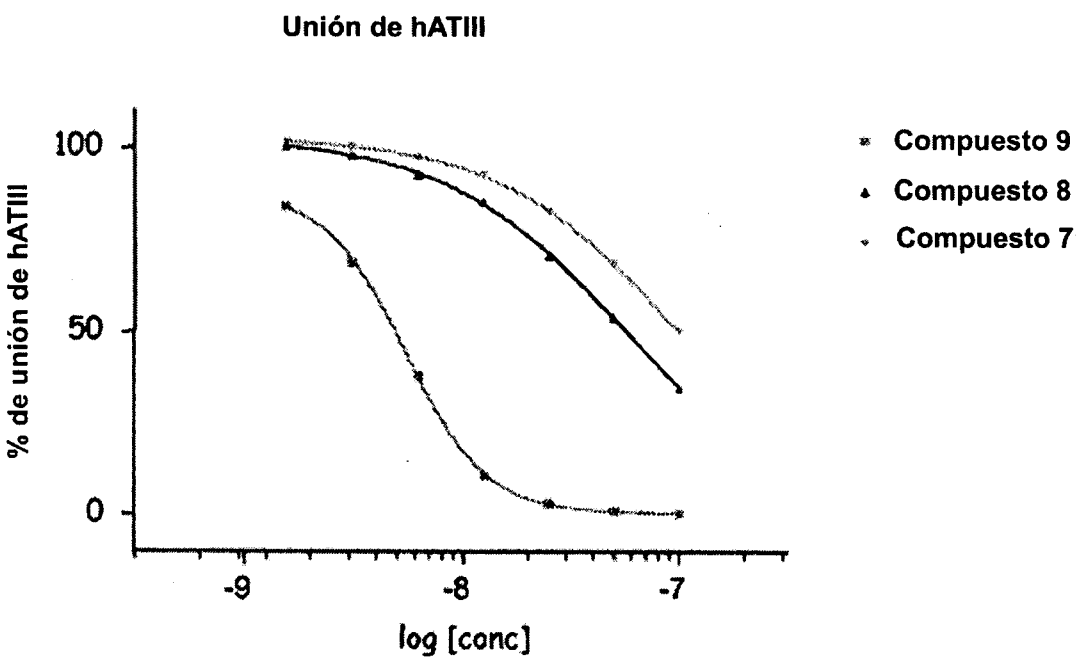


FIGURA 6

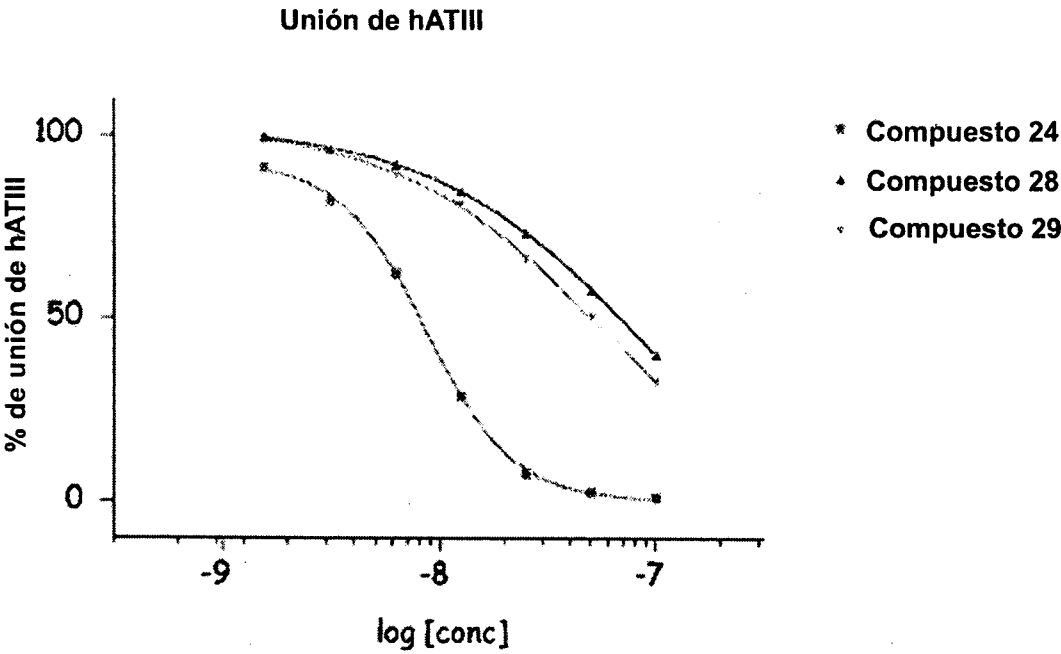


FIGURA 7

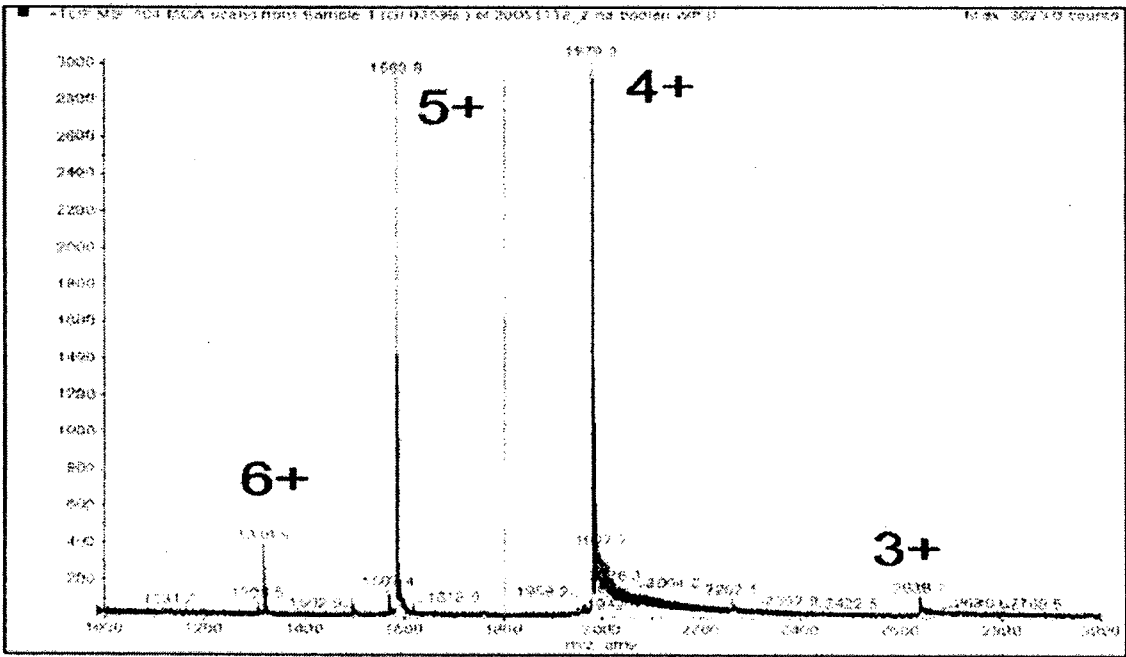


FIGURA 7A

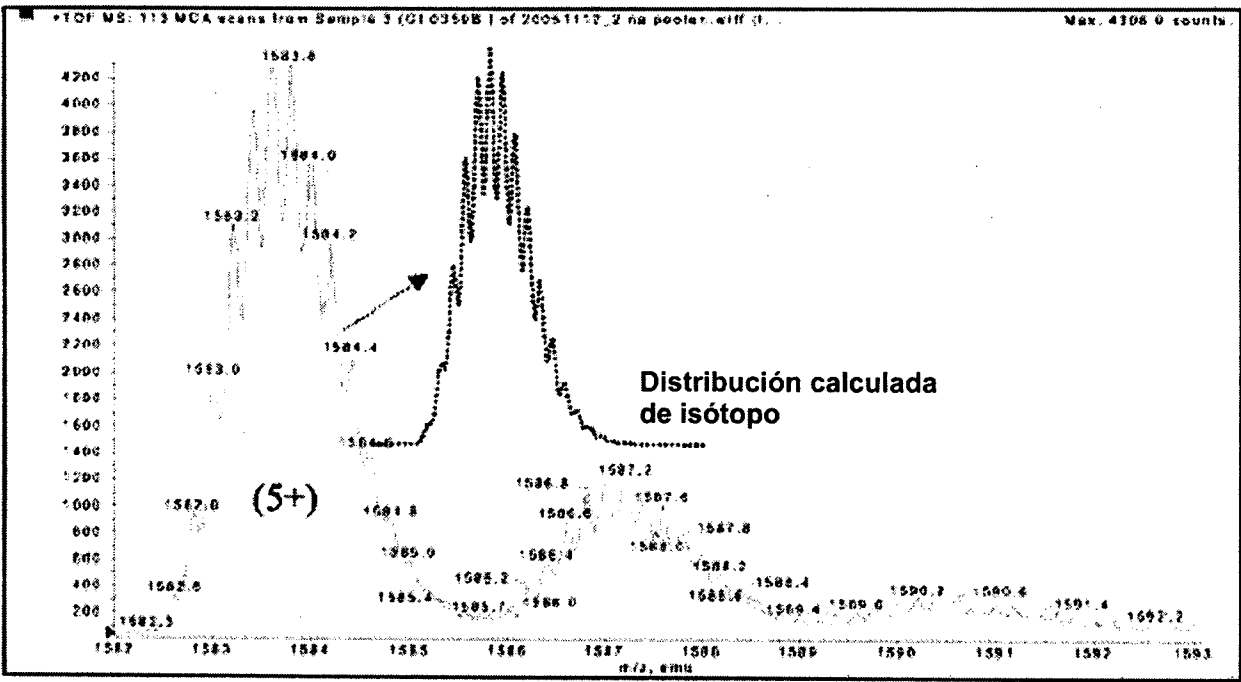


FIGURA 8

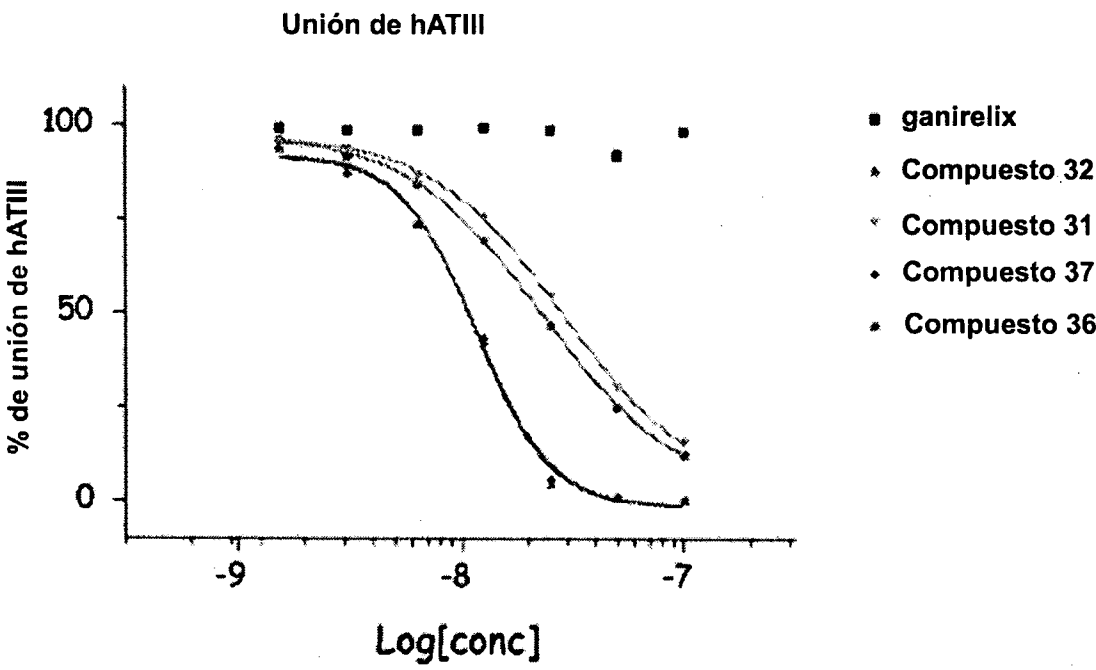


FIGURA 9

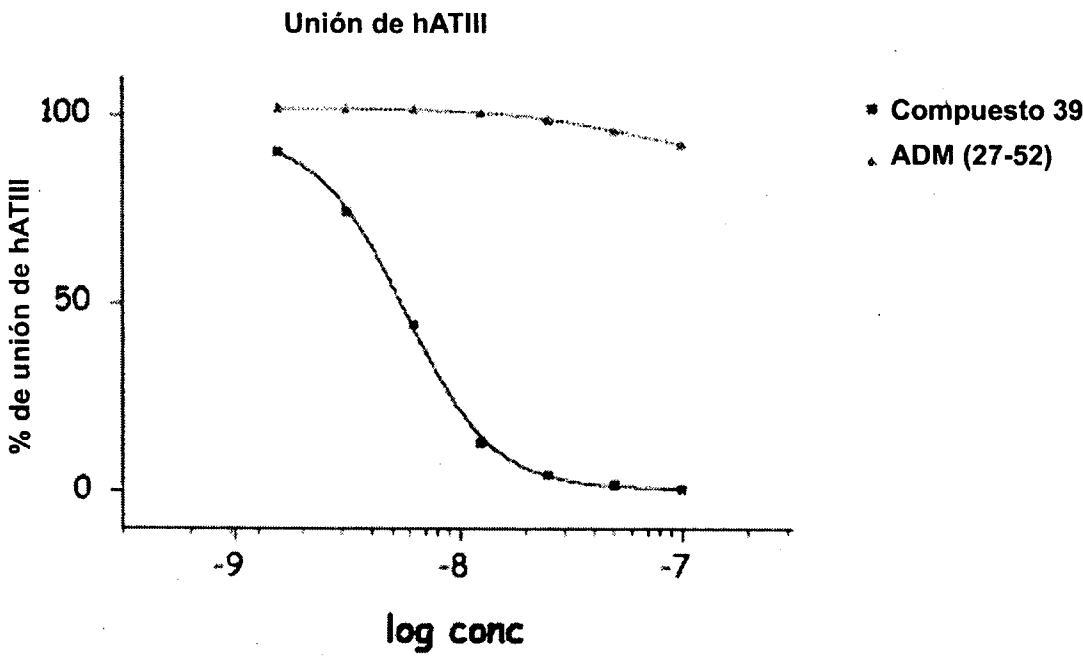


FIGURA 10

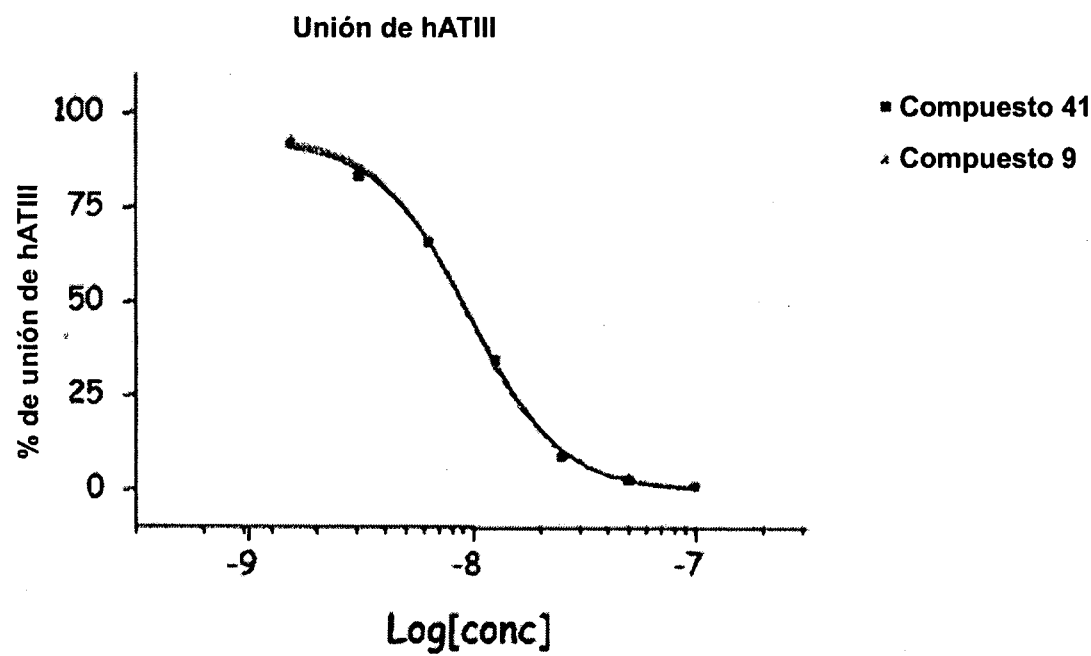


FIGURA 11

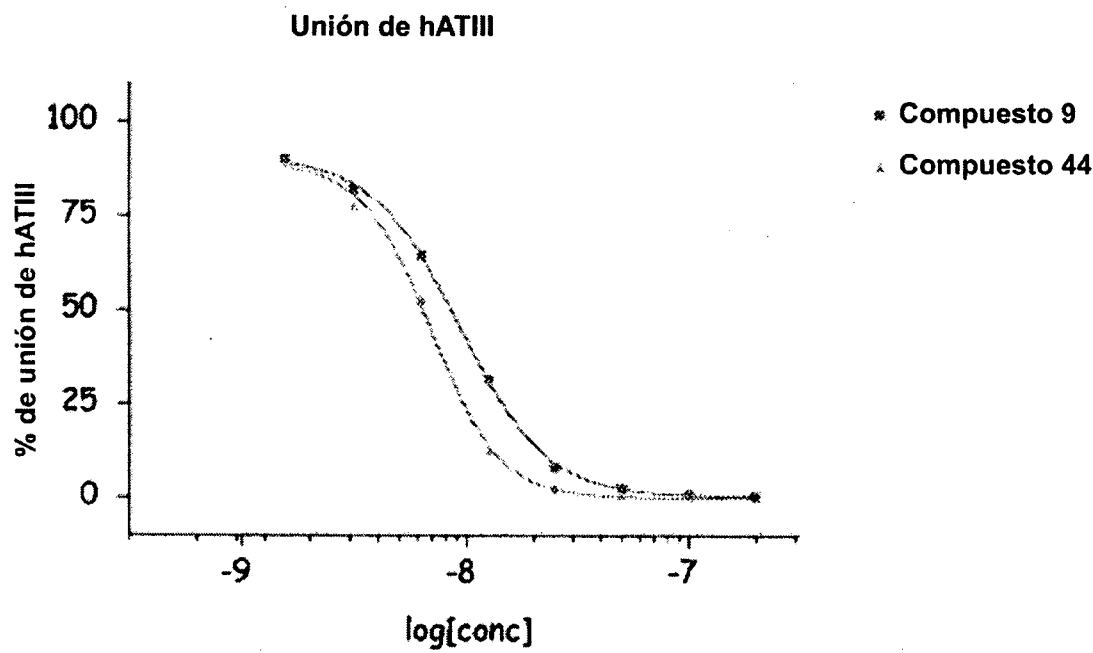


FIGURA 12

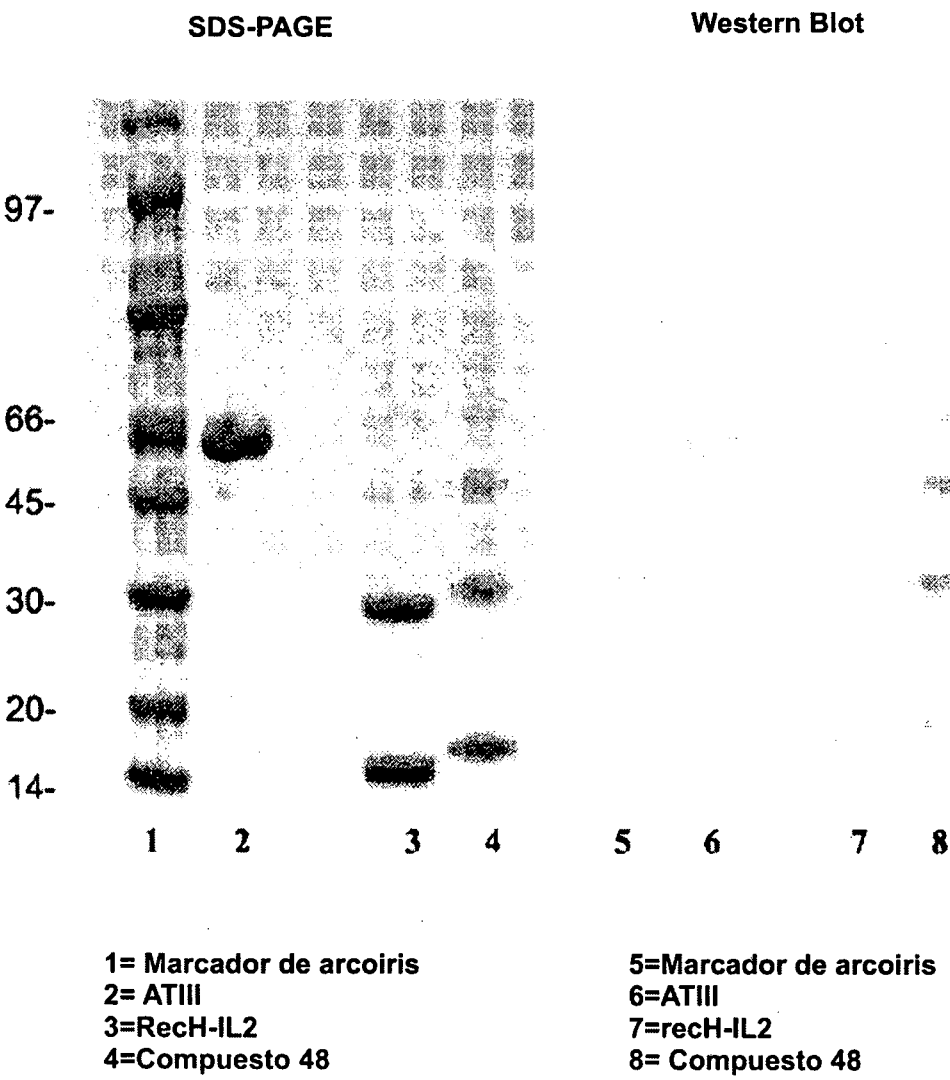
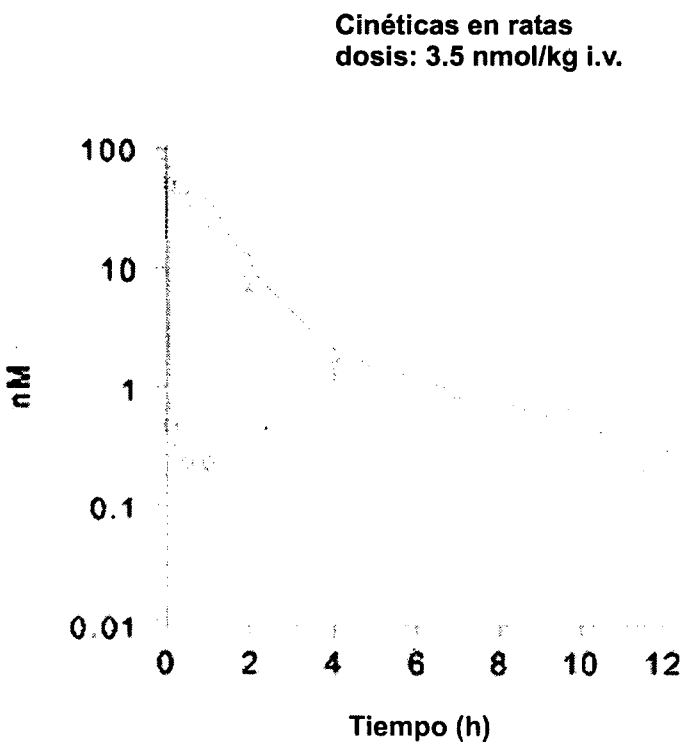


FIGURA 13



165

FIGURA 14

Cinéticas i.v. En rata

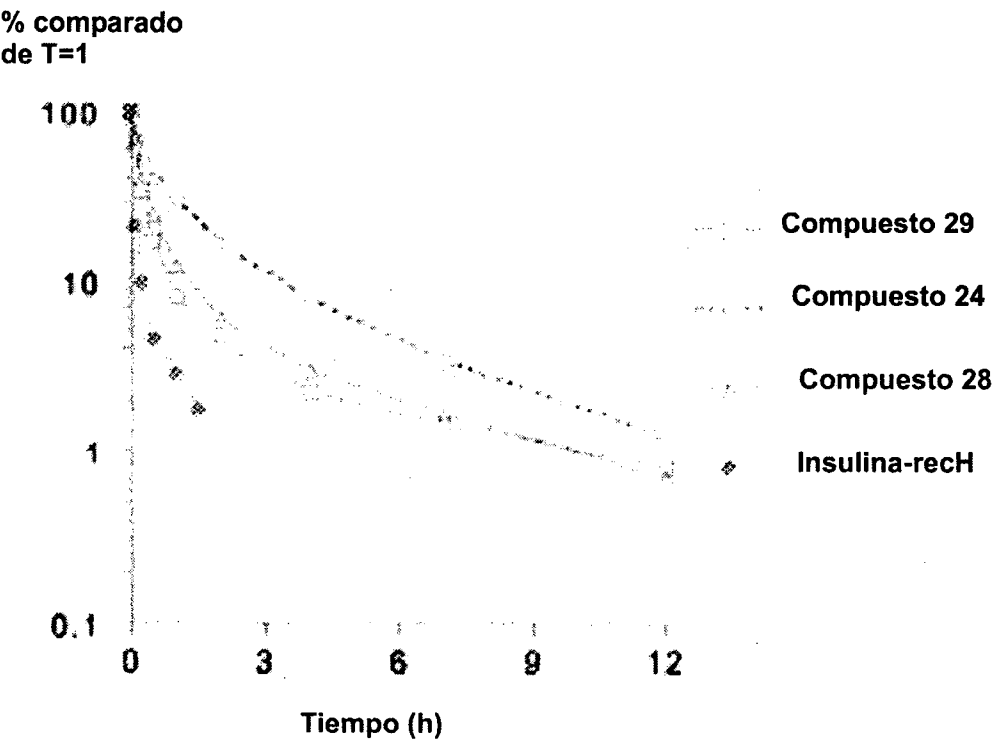
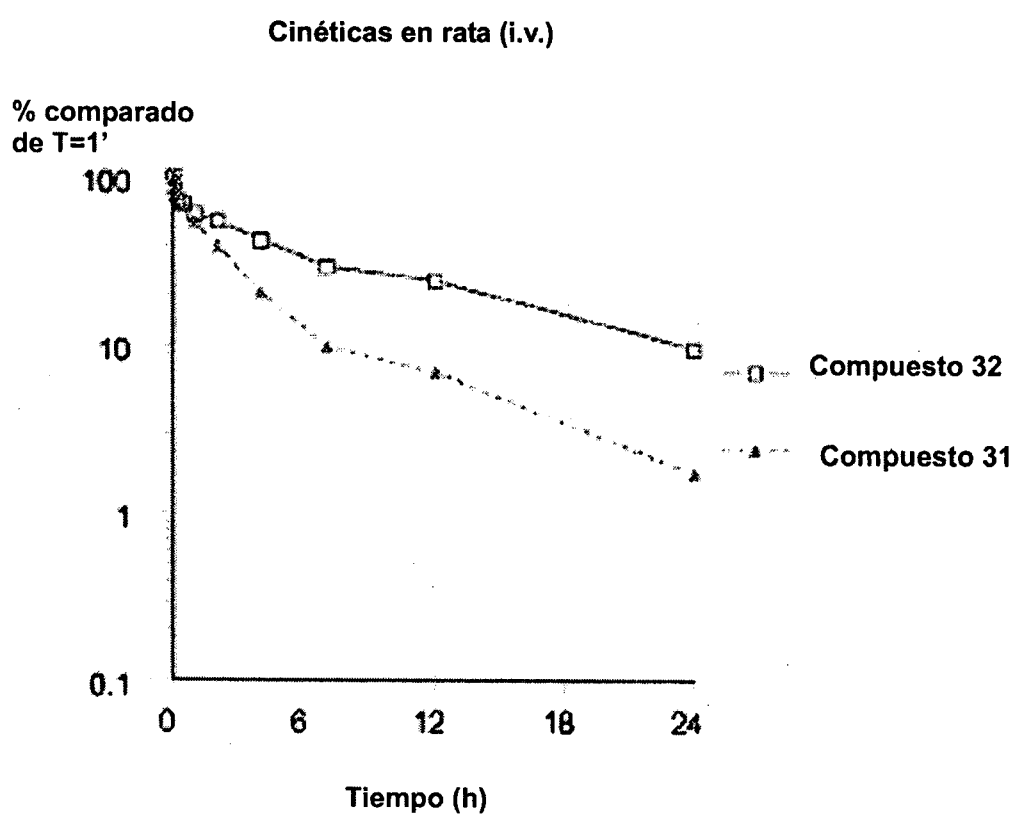
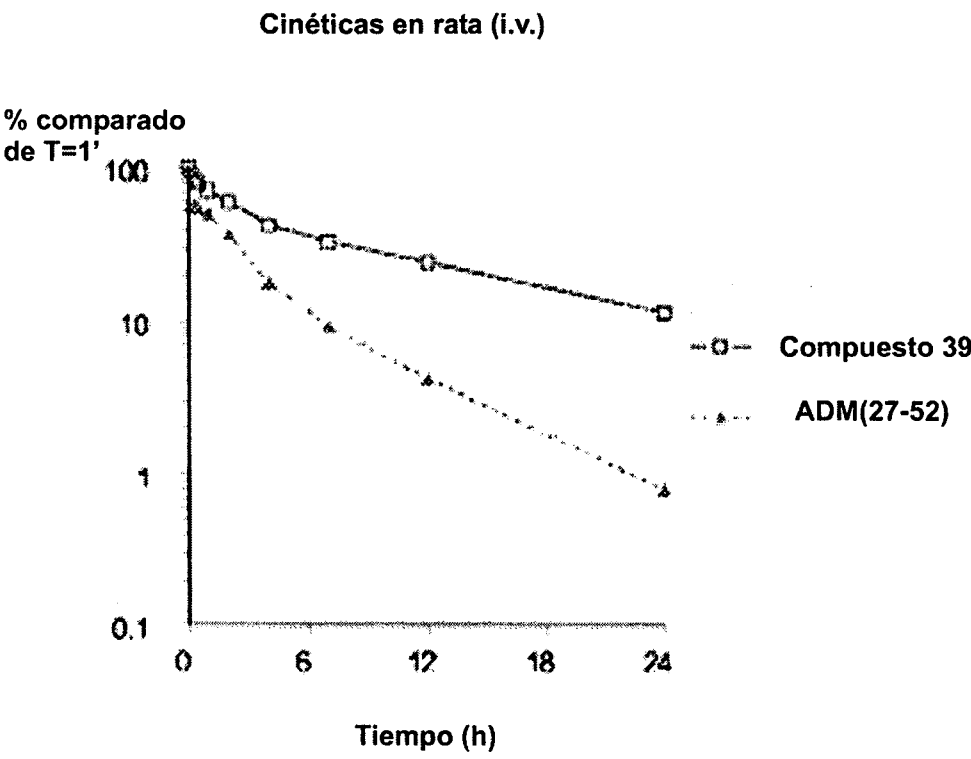


FIGURA 15



167

FIGURA 16



168

FIGURA 17

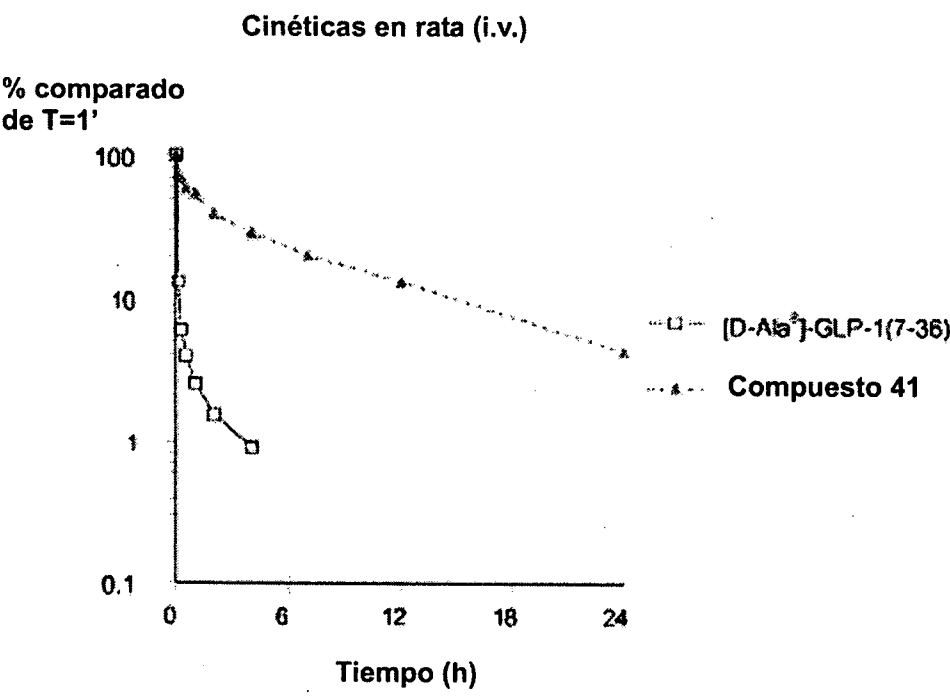


FIGURA 18

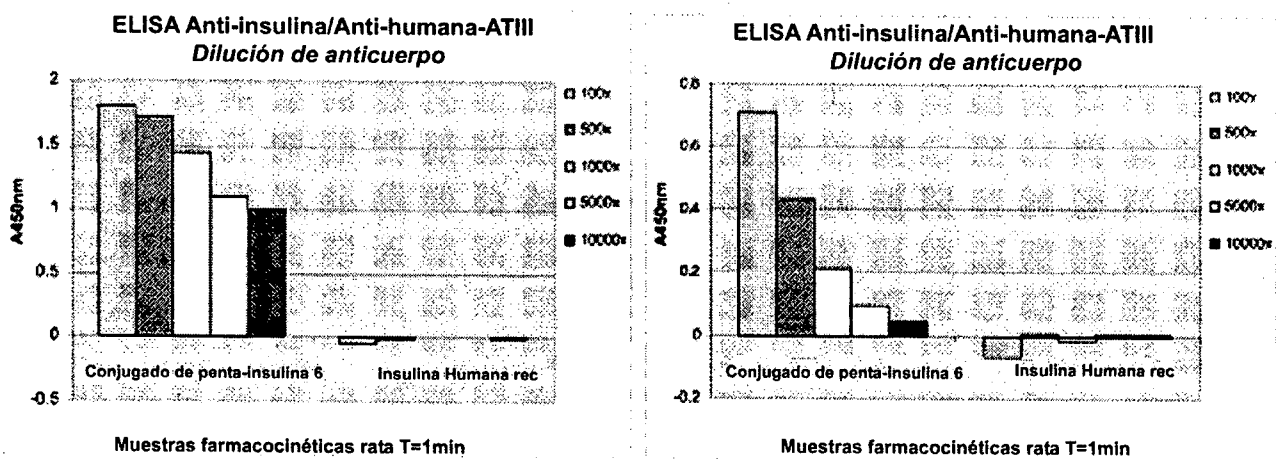
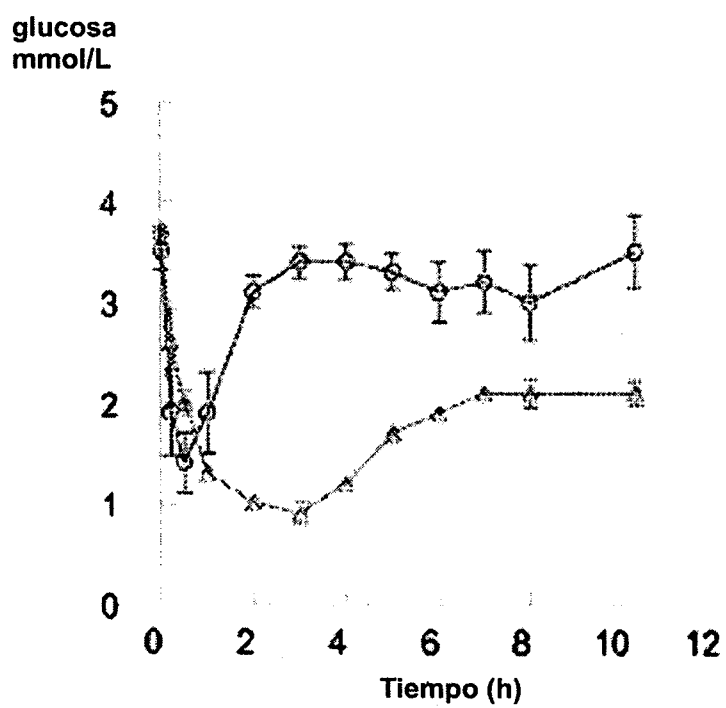


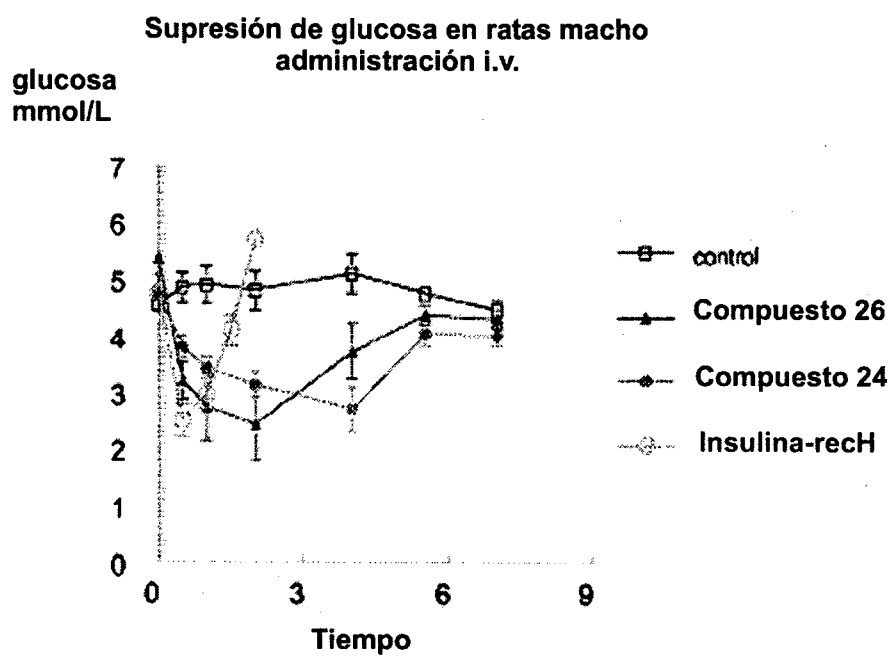
FIGURA 19

Contenido de glucosa en plasma de rata después de administración de i.v.



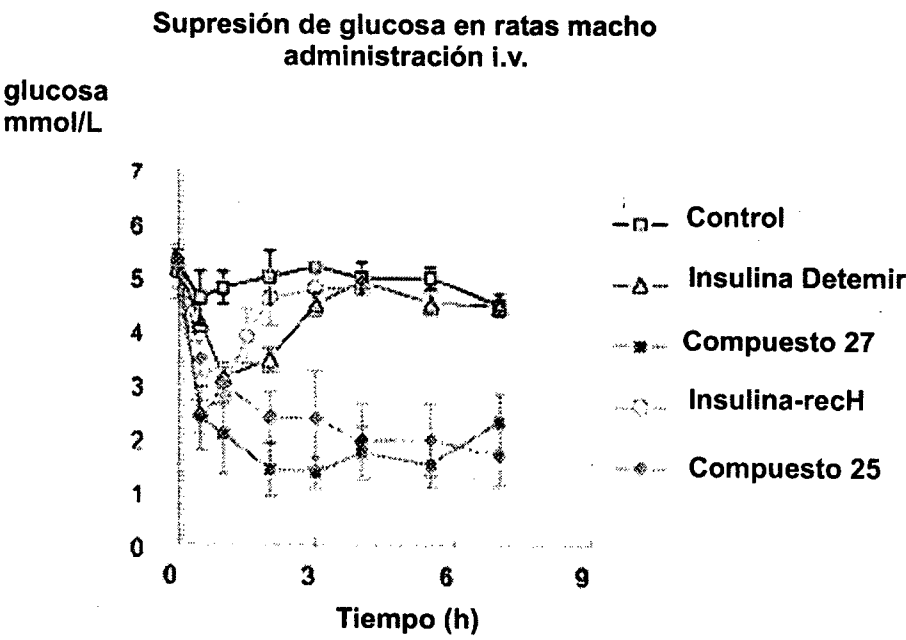
171

FIGURA 20



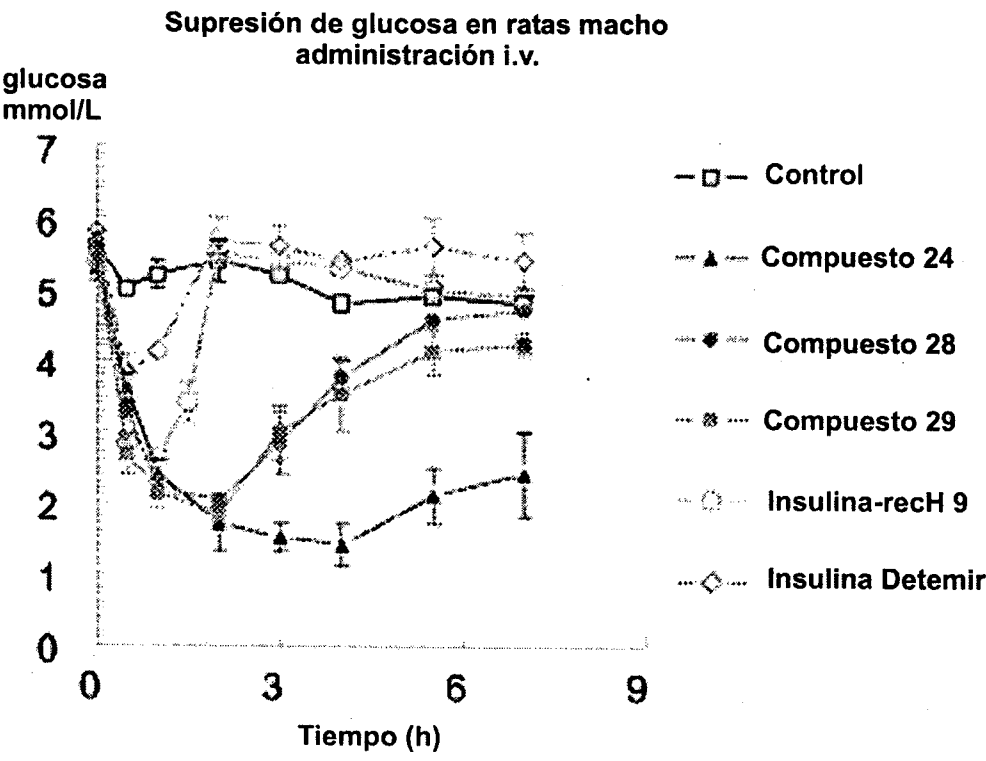
172

FIGURA 21



173

FIGURA 22



PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2005.886 WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2006/050551	International filing date (day/month/year) 31/01/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year)
Applicant N.V. ORGANON		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 11 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

CONJUGATES OF A POLYPEPTIDE AND A PENTASACCHARIDE

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, BEILSTEIN Data, DISSERTATION ABS, CANCERLIT, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUIJSMAN, ROGIER C. ET AL: "Synthesis of a pentasaccharide-oligodeoxyribonucleotide conjugate : a novel antithrombotic agent" CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, vol. 2, no. 12, 1996, pages 1572-1577, XP002363505	27-32
Y	abstract * schemes *figures ----- -/--	1-21, 24-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 2007

Date of mailing of the international search report

11/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dullaart, Anwyn

176

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BAUDYS MIROSLAV ET AL: "Extending insulin action in vivo by conjugation to carboxymethyl dextran" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 9, no. 2, March 1998 (1998-03), pages 176-183, XP002363506 ISSN: 1043-1802 abstract figures 2-6 tables 1,2 page 182, right-hand column, paragraph CONCLUSION - page 183, left-hand column	1-21, 24-32
Y	UCHIO T ET AL: "Site-specific insulin conjugates with enhanced stability and extended action profile" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 1999 NETHERLANDS, vol. 35, no. 2-3, 1999, pages 289-306, XP002363507 ISSN: 0169-409X abstract page 292, paragraph 2.1 - page 293	1-21, 24-32
Y	ARNARP J ET AL: "Synthesis of oligosaccharides that form parts of the complex type of carbohydrate moieties of glycoproteins. Three glycosides prepared for conjugation to proteins." ACTA CHEMICA SCANDINAVICA. SERIES B: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY. 1983, vol. 37, no. 4, 1983, pages 329-334, XP008058548 ISSN: 0302-4369 abstract figures page 329 - page 330	1-21, 24-32
Y	ZOU WEI ET AL: "Synthesis and NMR assignments of galactosylgloboside and its beta-D-GalNAc-(1 fwardw 4)-alpha-D-Gal-linked positional isomer in a conjugatable form" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 315, no. 3-4, 28 February 1999 (1999-02-28), pages 251-261, XP002363508 ISSN: 0008-6215 abstract figures page 252 - page 254, left-hand column, line 6 ----- -/--	1-21, 24-32

177

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARD K ET AL: "O-Mannosylation of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I) produced in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " FEBS LETTERS, vol. 248, no. 1-2, 1989, pages 111-114, XP002363509 ISSN: 0014-5793 abstract	1-21, 24-32
Y	----- WESTERDUIN P ET AL: "Synthesis of tailor-made glycoconjugates showing ATIII-metidated inhibition of blood coagulation factors Xa and Thrombin" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 35, no. 3, 1996, pages 331-333, XP002305713 ISSN: 1433-7851 cited in the application the whole document	1-21, 24-32
Y	----- AMSTERDAM VAN R G M ET AL: "SYNTHETIC ANALOGUES OF THE ANTITRHOBIN III-BINDING PENTASACCHARIDE SEQUENCE OF HEPARIN. PREDICTION OF IN VIVO RESIDENCE TIMES" ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 15, no. 4, 1995, pages 495-503, XP001070292 ISSN: 1079-5642 cited in the application the whole document	1-21, 24-32
Y	----- WALENGA J M ET AL: "ANTITHROMBOTIC ACTIVITY OF A SYNTHETIC HEPARIN PENTASACCHARIDE IN ARABBIT STASIS THROMBOSIS MODEL USING DIFFERENT THROMBOGENIC CHALLENGES" THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, vol. 46, no. 2, 1987, pages 187-198, XP001006018 ISSN: 0049-3848 abstract tables 1,2 ----- -/--	1-21, 24-32

178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BUIJSMAN R C ET AL: "Design and synthesis of a novel synthetic NAPAP-penta-saccharide conjugate displaying a dual antithrombotic action" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 9, no. 14, 19 July 1999 (1999-07-19), pages 2013-2018, XP004171628 ISSN: 0960-894X abstract figures page 2017	1-21, 24-32
Y	VOGEL G M T ET AL: "ANTITHROMBOTIC PROPERTIES OF A DIRECT THROMBIN INHIBITOR WITH A PROLONGED HALF LIFE AND AT-MEDIATED FACTOR XA INHIBITORY ACTIVITY" JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, BLACKWELL PUBLISHING, OXFORD, GB, vol. 1, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 1945-1954, XP008045748 ISSN: 1538-7933 abstract figures 1-3; tables 1-5	1-21, 24-32
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 200454 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A11, AN 2004-561543 XP002363528 -& WO 2004/060404 A (CHUGAI SEIYAKU KK) 22 July 2004 (2004-07-22) abstract	1-21, 24-32
X	LAHMANN M ET AL: "Synthesis of a polyphosphorylated GPI-anchor core structure" CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY 2002 CANADA, vol. 80, no. 8, 2002, pages 1105-1111, XP008058516 ISSN: 0008-4042 abstract	1-5, 11
X	EKWALL E ET AL: "IDENTIFICATION OF SALMONELLAE OF SEROGROUP C-1 BY IMMUNO FLUORESCENCE AND CO AGGLUTINATION WITH ANTI SERUM AGAINST AND OLIGO SACCHARIDE PROTEIN CONJUGATE" JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 15, no. 2, 1982, pages 173-180, XP008058533 ISSN: 0022-2615 abstract page 178, paragraph DISCUSSION - page 179	1-5, 11, 24-32
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/050551

179

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SABBATINI PAUL J ET AL: "Immunization of ovarian cancer patients with a synthetic Lewisy-protein conjugate vaccine: A phase 1 trial" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 87, no. 1, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 79-85, XP002363510 ISSN: 0020-7136 abstract page 84	1-5, 11, 17, 24-32
X	KUDRYASHOV VALERY ET AL: "Immunogenicity of synthetic conjugates of Lewisy oligosaccharide with proteins in mice: Towards the design of anticancer vaccines" CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, vol. 45, no. 6, February 1998 (1998-02), pages 281-286, XP002363511 ISSN: 0340-7004 abstract figures 1A-C; table 1	1-5, 11, 17-19, 24-32
X	NILSSON ULF ET AL: "Synthesis of the saccharide moiety of galactosylgloboside (SSEA-3) and its conjugation to bovine serum albumin and Sepharose" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 272, no. 1, 1995, pages 9-16, XP002363520 ISSN: 0008-6215 abstract page 11; compound 11 page 9, last paragraph - page 10, line 5	1-5, 11, 24-32
Y	PETITOU MAURICE ET AL: "A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug What comes next?" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, vol. 43, no. 24, 14 June 2004 (2004-06-14), pages 3118-3133, XP002425673 ISSN: 0570-0833 page 3121; figure 4 page 3122; figure 6	1-21, 24-32
Y	ALBAN S: "The precautionary principle and its impact on medicine" KRANKENHAUSPHARMAZIE, vol. 24, no. 9, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 367-373, XP008058494 ISSN: 0173-7597 abstract page 372; figure 1	1-21, 24-32
	-/--	

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEURER J A ET AL: "Properties of native and in vitro glycosylated forms of the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin (9-39)" METABOLISM, CLINICAL AND EXPERIMENTAL, vol. 48, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 716-724, XP004538345 ISSN: 0026-0495 page 722, right-hand column	1-19, 24-32
Y	WO 98/08871 A (NOVONORDISK AS [DK]; KNUDSEN LISELOTTE BJERRE [DK]; SOERENSEN PER OLAF) 5 March 1998 (1998-03-05) examples	1-19, 24-32
Y	US 6 514 500 B1 (BRIDON DOMINIQUE P [CA] ET AL) 4 February 2003 (2003-02-04) examples sequence 17	1-19, 24-32
Y	WO 00/69911 A (CONJUCHEM INC [CA]; BRIDON DOMINIQUE P [CA]; ARCHEVEQUE BENOIT L [CA];) 23 November 2000 (2000-11-23) examples	1-19, 24-32
Y	WO 99/46283 A1 (ZEALAND PHARMACEUTICALS A S [DK]; LARSEN BJARNE DUE [DK]) 16 September 1999 (1999-09-16) examples sequence 92	1-19, 24-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/050551

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-14, 16-19 and 24-32 in part, 15, 20 and 21
insofar as relating to inventions 1 and 4.

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-19 and 24-32 in part, 20 and 21

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is insulin.

2. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is calcitonin.

3. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is ganirelix.

4. claims: 1-19 and 24-32 in part

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is selected from the glucagon-like peptides GLP-1 or [D-Ala8]-GLP-1(7-36).

5. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is adrenomedullin or its truncated part ADM(27-52).

6. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is kisspeptin-10.

7. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is octreotide.

8. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is interleukin-2.

9. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part, and 22

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is as defined in claim 22.

10. claims: 1-14, 16-19 and 24-32 in part, and 23

Conjugate of a sulfated oligosaccharide and a polypeptide, pharmaceutical composition containing it, its use (for the preparation of a medicament useful) in therapy, and the process of its preparation, all as defined in these claims, wherein the polypeptide is as defined in claim 23.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/050551

184

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004060404	A	22-07-2004	NONE	
WO 9808871	A	05-03-1998	AU 732957 B2	03-05-2001
			AU 3847897 A	19-03-1998
			BR 9711437 A	18-01-2000
			CA 2264243 A1	05-03-1998
			CN 1232470 A	20-10-1999
			CZ 9900629 A3	14-07-1999
			EP 0944648 A1	29-09-1999
			HU 9903714 A2	28-03-2000
			JP 2000500505 T	18-01-2000
			JP 3149958 B2	26-03-2001
			JP 2001011095 A	16-01-2001
			JP 2006348038 A	28-12-2006
			KR 20000035964 A	26-06-2000
			NO 990950 A	28-04-1999
			PL 331896 A1	16-08-1999
			RU 2214419 C2	20-10-2003
US 6514500	B1	04-02-2003	US 2003108567 A1	12-06-2003
			US 2003108568 A1	12-06-2003
WO 0069911	A	23-11-2000	AT 252601 T	15-11-2003
			AU 754770 B2	21-11-2002
			AU 4855500 A	05-12-2000
			BR 0010750 A	26-02-2002
			CA 2363712 A1	23-11-2000
			CN 1350548 A	22-05-2002
			DE 60006100 D1	27-11-2003
			DE 60006100 T2	01-07-2004
			DK 1180121 T3	01-03-2004
			EA 3922 B1	30-10-2003
			EP 1180121 A1	20-02-2002
			ES 2209885 T3	01-07-2004
			JP 2003527312 T	16-09-2003
			JP 2005255689 A	22-09-2005
			JP 2006151986 A	15-06-2006
			NO 20015584 A	03-01-2002
			PT 1180121 T	31-03-2004
			US 2006135428 A1	22-06-2006
WO 9946283	A1	16-09-1999	AU 757658 B2	27-02-2003
			AU 2713299 A	27-09-1999
			CA 2321026 A1	16-09-1999
			EP 1062229 A1	27-12-2000
			JP 2002509082 T	26-03-2002
			NZ 506839 A	30-05-2003
			US 2006063699 A1	23-03-2006

186

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-078139- -00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:49:14

Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 186

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 57,557
FECHA : JULIO 16 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63769910	16/07/2007	53,700,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Blo 10080480000002
00299-841-013-4



No. 07-078139- -00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:49:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Felton Navarro

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia