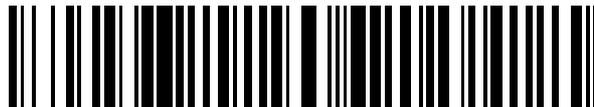


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 622**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 47/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2004 E 04765740 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1682186**

54 Título: **Conjugados de polímeros hiperramificados a través de enlazante escindible no enzimático**

30 Prioridad:

02.10.2003 EP 03022097

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

28.03.2014

73 Titular/es:

**ASCENDIS PHARMA GMBH (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 584
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**VETTER, DIRK;
HERSEL, ULRICH;
RAU, HARALD;
SCHNEPF, ROBERT y
WEGGE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 451 622 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugados de polímeros hiperramificados a través de enlazante escindible no enzimático

5 La presente invención se relaciona con compuestos de inclusión que comprenden una proteína y un compuesto orgánico de encapsulamiento (EOC), el cual también se conoce como proteóforo, en una estequiometría 1:1. En una realización, el EOC es un dendrímero, que resulta en un compuesto de inclusión de proteína dendrímero (DPIC). En una realización adicional, el EOC es una estructura macrocíclica que resulta en un compuesto de inclusión de proteína de macrociclo (MPIC). Los compuestos de encapsulamiento, así como los compuestos de inclusión resultantes, son solubles en agua y se prestan para la liberación controlada de la proteína a un objetivo, preferiblemente en un cuerpo vivo, en particular un mamífero. En particular, los compuestos tienen la estructura descrita en la reivindicación 1.

15 Las proteínas son moléculas grandes e inestables. Se conoce que una gran cantidad de proteínas muestran una importante actividad farmacológica. Ejemplos incluyen la insulina, el interferón, hormonas de crecimiento y factores que forman la sangre. En general, las proteínas se aplican a mamíferos y humanos mediante inyección. Hasta la fecha, no es posible aplicar proteínas farmacológicamente activas por vía oral o por vía transdérmica. Después de la inyección, las proteínas son atacadas fácilmente y, a menudo parcial o totalmente eliminadas por el sistema inmune, por diversas enzimas o por filtración renal. Además, la proteína puede ser tóxica o causar reacciones alérgicas.

20 Con el fin de superar la eliminación in vivo, se desarrollaron varias técnicas con el fin de garantizar una liberación controlada de la proteína respectiva. Ejemplos incluyen la modificación de la secuencia de la proteína, pegilación, proteinilación, de enlace con la albúmina, glicosilación, formulación en hidrogeles o encapsulación por micropartículas, nanopartículas, dendrímeros.

La química supramolecular está dirigida hacia la síntesis y análisis de compuestos de inclusión en el cual dos o más componentes están asociados a través de un encerramiento completo de un conjunto de moléculas en una estructura adecuada formada por otra.

25 En tales sistemas químicos anfitrión-huésped, una entidad molecular es complementaria a una diferente, segunda entidad. La complementariedad puede ocurrir en forma o propiedades fisicoquímicas o en una combinación de ambos. En el caso de la complementariedad de forma, la molécula huésped forma una cavidad de tamaño similar a la molécula huésped. En tales casos bien definidos topológicamente, donde la cavidad es una característica estructural inherente de una molécula individual, el anfitrión se denomina cavitando, y el agregado anfitrión huésped, cavitado. Típicamente, la estequiometría del sistema supramolecular es 1:1. Sin embargo, se conocen varios tipos de estequiometrías complejas. Las moléculas huésped son típicamente más pequeñas en tamaño que el compuesto anfitrión correspondiente.

35 Ejemplos para pequeños sistemas de huésped-huésped son para los complejos de instancia formados entre éteres corona y de sodio o iones de potasio. Ejemplos bien conocidos de moléculas orgánicas host-huésped sintéticas son los complejos de compuestos aromáticos tales como nitrofenol por ciclodextrina carbohidratos. Las ciclodextrinas vienen en varios tamaños de anillos, el más grande de los cuales puede acomodar estructuras bicíclicas tales como naftaleno y sus derivados. Las moléculas de Fullerenos son de forma esférica y acomodan espacio libre de un diámetro de 0.7 nm.

40 Biomacromoléculas tales como el almidón pueden formar complejos de inclusión con huéspedes pequeños tales como yodo llenando un volumen similar a un canal en el interior de una hélice. Se conocen dobles hélices de ADN para dar cabida a los compuestos aromáticos rígidos por medio de la intercalación. La albúmina sérica es un ejemplo bien estudiado de una proteína que se puede cargar con varias moléculas de ácidos grasos.

Comparativamente poca experimentación se ha llevado a cabo para investigar la formación de complejos de biomacromoléculas tales como las proteínas por compuestos anfitriones sintéticos.

45 Un gran número de medicamentos moleculares se basan en proteínas o péptidos grupo del cual la insulina, interferones, o péptidos del que el grupo insulina, interferones, hormonas de crecimiento y factores de la sangre se encuentran entre los agentes terapéuticos más ampliamente utilizados.

50 Se sabe que los agentes terapéuticos proteínicos sufren de diversos inconvenientes. Las proteínas son macromoléculas inestables inherentemente así como su bioactividad depende del posicionamiento tridimensional correcto de su cadena de polipéptido. Factores externos tales como solventes, superficies, agitación, la temperatura o el pH pueden afectar el equilibrio conformacional y resultar en despliegue parcial o total, desnaturalización, aglomeración o precipitación. Proteínas de origen no humano o proteínas que contienen secuencias de aminoácidos no humanos son altamente inmunogénicas. La formación de anticuerpos es aún notable por proteínas humanas tales como la insulina si se administra con frecuencia por inyección. Las biomoléculas pueden ser eliminadas de la circulación demasiado rápidamente o demasiado lentamente para una aplicación terapéutica determinada y pueden exhibir una ventana terapéutica estrecha. Las proteínas pueden ser degradadas por proteasas endógenas. La

mayoría de las biomoléculas terapéuticas necesitan ser administradas por vía parenteral, que impone frecuentemente la necesidad de inyecciones diarias durante toda la vida en el paciente. En este momento no hay formulaciones de proteínas aprobados para la administración oral o pulmonar. Sólo en algunos casos ha sido posible dirigir la proteína terapéutica al tejido o tipo de célula enfermo o para entregar la proteína de manera intracelular.

- 5 Por lo tanto, es altamente deseable desarrollar vehículos de entrega definidos molecularmente para mejorar el beneficio terapéutico de los medicamentos basados en proteínas. Específicamente, las proteínas necesitan ser encapsuladas eficientemente para protección y liberado desde el agente de encapsulamiento por bioactividad.

10 Las proteínas se componen de secuencias de aminoácidos condensados que se pliegan en una disposición tridimensional compacta, a menudo de forma globular. El diámetro de las proteínas globulares oscila típicamente de 1 a 10 nm. Las proteínas pueden formar complejos compuestos de varias subunidades idénticas o diferentes, y pueden asociar varias proteínas para formar complejos aún más grandes. Un agente de encapsulamiento de proteína tiene que proporcionar un volumen interno bien hidratado de un tamaño similar y de forma aproximadamente esférica o elipsoidal o como de canal. El contenido de agua es una importante propiedad molecular, puesto que la mayoría de las biomoléculas dependen de una capa de hidratación para la bioactividad.

15 Los polímeros han comprobado ser muy útiles en el suministro de material biológico molecular terapéutico a los humanos. Los polímeros solubles en agua lineales o ramificados pueden ocupar un volumen de tamaño similar o mayor que una molécula de proteína.

20 El polietilén glicol (PEG) es un polímero de baja toxicidad e inmunogenicidad. Varias proteínas terapéuticas se han conjugado covalentemente al PEG por un proceso llamado PEGilación y aplicado con éxito en terapia molecular (Harris JM, Chess RB, Nature (2003) 214-21).

25 Una ventaja de la PEGilación de proteínas es la mejora de las propiedades farmacocinéticas del conjugado en circulación. Proteínas no conjugadas tales como el interferón alfa-2a son eliminadas rápidamente dentro de 2.5 horas en ratas, los correspondientes interferones pegilados circulan con una vida media de $t_{1/2} = 3.4$ h (monoconjugado PEG de 5 kDa lineal) hasta 23 h (dipegilado con 2 x PEG de 20 kDa). Este efecto se atribuye a la filtración renal reducida. La filtración del riñón es parcialmente un proceso de exclusión por tamaño, y la potenciación del radio hidrodinámico de una proteína por PEGilación puede reducir significativamente su tasa de aclaramiento. El PEG se hidrata fuertemente (2-3 moléculas de agua por unidad de óxido de etileno) y por lo tanto muestra un alto peso molecular aparente en los estudios de cromatografía de exclusión por tamaño. Debido a su alta flexibilidad conformacional y la hidratación, las moléculas de PEG aparecen 5-10 veces tan grandes como proteínas de masa molecular similar.

30 El PEG se utiliza ampliamente para hacer superficies resistentes a la adsorción de proteínas y para precipitar las proteínas de la solución acuosa, lo que corrobora la noción de que el PEG no se enlaza fisicoquímicamente a la proteína.

35 La propiedad del PEG para plegarse aleatoriamente y ocupar un volumen molecular grande explica igualmente el segundo beneficio terapéutico de la PEGilación, es decir la reducción de la inmunogenicidad de las proteínas. Este efecto es más pronunciado para proteínas de origen no humano y es probable que se logre mediante la imposición de un escudo estérico en la proximidad del epítipo inmunogénico y por lo tanto prevenir el reconocimiento por el sistema inmune.

40 El efecto de protección se puede reforzar mediante el empleo de PEG ramificado. El polietilén glicol con un bajo grado de ramificación se conoce de la US 5,643,575 y del catálogo de Nektar Therapeutics 2003. La WO 01/21197 menciona conjugados de insulina-PEG monosustituidos ramificados.

45 El mecanismo de protección estérica explica por la reducción observada de la bioactividad de las proteínas PEGiladas. La conjugación covalente de cadenas laterales de proteína cerca de un epítipo generalmente puede afectar la capacidad de la proteína para enlazarse a su receptor. Debe tenerse cuidado para identificar una cadena lateral de proteína reactiva que está en una posición distal a la región de la superficie de la proteína que está mediando el enlazamiento del receptor o la actividad enzimática. Por esta razón, se prefiere la monoconjugación de PEG sobre conjugaciones múltiples. Sin embargo incluso para monoconjugados, varios regioisómeros son obtenidos en diferentes relaciones.

50 La protección estérica también se puede reforzar mediante la conjugación de la proteína con más de una molécula de PEG. La PEGilación múltiple conduce a un aparente aumento en volumen hidrodinámico y sirve para proteger mejor a la proteína de reconocimiento de anticuerpos o un ataque de la proteasa. La metodología se ve comprometida por la pérdida de bioactividad, la pérdida de actividad terapéutica por gramo de material y por incremento del riesgo de inactivación de proteínas por la desestabilización conformacional.

- Es un reto para obtener un producto homogéneo de la reacción de proteína con reactivo de PEG. Si un reactivo PEG se hace reaccionar con una determinada proteína bajo condiciones equimoleculares o se agrega en ligero exceso, se obtienen conjugaciones mono-, bis-, tris- y oligo. La razón es que las superficies de proteínas muestran diversos grupos funcionales de reactividades similares. Las dificultades en el análisis de tales mezclas se ven agravadas por el hecho de que el PEG en sí mismo es una molécula polidispersa. La polidispersidad se refiere al hecho de que el PEG no se puede obtener como una molécula de longitud de cadena precisa más allá de un grado de polimerización (dp) de 12 unidades de etilenglicol. Los PEG típicos de 5 kDa o 20 kDa de masa molecular exhiben polidispersidades de 1.01 hasta 1.20, respectivamente.
- Si se precipitan de la solución acuosa bajo ciertas condiciones, polímeros no solubles en agua tales como poli(lactida-co-glicólido, PLG) pueden formar nano- o micropartículas. Las partículas formadas no son solubles en agua pero se suspenden en solución acuosa. Las proteínas presentes en la fase acuosa pueden ser atrapadas dentro de estos ensamblajes no covalentes. Las proteínas se liberan cuando las partículas se degradan. Tales hidrogeles se utilizan con éxito en formulaciones de liberación lenta de proteínas terapéuticas tales como la hormona del crecimiento (Tracy MA, Biotechnol Prod 14 (1998) 108-15).
- Las proteínas o polipéptidos se pueden incorporar en el material polimérico mediante la realización de la etapa de polimerización en presencia de la biomolécula. De esta manera la insulina se ha cargado a las nanopartículas N-butilcianoacrilato (WO 96/31231). Monómeros de polimerización son especies moleculares altamente reactivas y el proceso generalmente requiere solventes orgánicos. Las biomacromoléculas pueden sufrir modificación o degradación estructural bajo tales condiciones.
- Métodos de encapsulación típica que implica entidades prepolimerizadas son agua-en-aceite-en-agua (w/o/w) de doble evaporación emulsión/solvente o la técnica de sólido-en-aceite-en-agua (s/o/w). El proceso de encapsulación implica solventes orgánicos tales como cloruro de metileno, el calor y la sonicación u homogenización y por lo tanto puede conducir a la inactivación del material encapsulado.
- Un método alternativo se basa en el entrecruzamiento del polímero. Las proteínas pueden ser atrapadas permanentemente en polímeros si la etapa de entrecruzamiento se lleva a cabo en presencia de la proteína. Proteínas, monómeros y agente de entrecruzamiento se mezclan y se polimerizan. Tales polímeros no son solubles per se. Polímeros entrecruzados están constituidos por una red de cadenas de polímero. Dentro de esta red existen varios poros y cavidades y canales de una manera aleatoria, algunos de los cuales pueden ser suficientemente grandes para permitir la difusión de la proteína en, a través o fuera del polímero. El grado de entrecruzamiento tiene un fuerte efecto sobre la difusión en y efusión a partir del polímero. Los productos de tal entrecruzamiento se denominan hidrogeles, ya que pueden producirse a partir de componentes solubles en agua, componentes bien hidratados, y que exhiben un comportamiento de hinchamiento considerable.
- Todos estos métodos de preparación pueden tener efectos severamente perjudiciales sobre la integridad y la bioactividad de la proteína. Como se inactiva una porción del material de proteína durante el proceso de preparación de partículas, y es difícil de cuantificar la bioactividad restante de la muestra de proteína atrapada.
- Incluso después de la encapsulación, la proteína se pone bajo estrés cuando la proteína se ve obligada a hacer contacto estrecho con las moléculas de polímero más hidrófobas. De nuevo esto puede causar la desnaturalización adicional y pérdida de actividad. Adicionalmente, la arquitectura molecular de la red de polímero impone estrés mecánico y físico-químico sobre la proteína. La proteína puede ser deshidratada o desnaturalizada por agregación o contacto con las superficies internas, y es difícil de analizar la bioactividad de la proteína después de la encapsulación.
- La liberación de proteínas a partir del atrapamiento se puede lograr por difusión, una reacción química o enzimática que conduce a la degradación del polímero o la activación del solvente (a través de ósmosis o hinchamiento) o una combinación de mecanismos. Para aplicaciones terapéuticas, la efusión, el hinchamiento o mecanismos de biodegradación tienen lugar in vivo y son difíciles de controlar.
- Los liposomas pueden formar pequeñas vesículas unilamelares o grandes ensamblajes multilamelares. La encapsulación de fármacos en liposomas ha sido ampliamente estudiada y se aplica en terapia molecular. La WO 03/030829 describe formulaciones de insulina encapsulados en liposomas. Las técnicas típicas tales como mezclando el fármaco con el lípido en un solvente orgánico, adición de un medio acuoso y subsecuente eliminación del solvente orgánico o la diálisis de las micelas de lípido-detergente mezclado no se aplican fácilmente a la encapsulación de proteínas debido a la desnaturalización de la proteína por el solvente o detergente. Una metodología más adecuada es la hidratación de la película de lípidos. Los liposomas se forman mediante la hidratación y dispensación de una película previamente secada de lípidos. Los liposomas no son per se solubles en agua pero pueden ser distribuidos homogéneamente en agua por medio de dispersión. Si la proteína está presente en la solución de hidratación se vuelve a la vez asociado en la superficie y atrapado en el interior de los liposomas. El proceso reduce la exposición de la proteína a condiciones de desnaturalización, pero es de poca eficiencia de encapsulación.

Los dendrímeros son estructuras poliméricas bien definidas. Los dendrímeros se basan en la repetición de estructuras hiperramificadas que emanan de un núcleo central (US 4,507,466). Dendrímeros típicos se basan en poliamidoamina (PAMAM), polietilén imina (PEI), polipropilén imina o polilisina. Estas macromoléculas sintéticas se ensamblan de forma gradual, con cada ciclo de reacción agregando otra capa de ramificaciones (llamado "generación"). Se tiene acceso a los dendrímeros sintéticamente de forma gradual, síntesis divergente "de abajo arriba" o convergente "de arriba abajo". El componente estructural central es la unidad del núcleo de la que los dendrímeros hiperramificados se extienden de manera radialmente simétrica. El núcleo puede proporcionar por lo menos dos grupos reactivos para la conjugación dendrímica, también pueden ser de naturaleza heterofuncional y pueden ser utilizados grupos protectores. En este último caso, el dendrímero puede ensamblarse, y un compuesto huésped puede ser subsecuentemente conjugado con un núcleo de anilina por medio de químicas ortogonales (WO 88/01180). El núcleo y los dendrímeros forman el interior o la estructura de un dendrímero. Como consecuencia de la simetría esférica apoyada por el hacinamiento estérico, los grupos terminales de los hiperramificados están definiendo el exterior. En dendrímeros de alta generación, las ramificaciones terminales forman de preferencia capas densas y se han descubierto vacíos internos flexibles. Se entiende, que para un dendrímero determinado estas cavidades se llenan por grupos terminales replegados y moléculas de solventes coordinadas fuertemente. Los dendrímeros están relacionados con micelas, igualmente bien adecuadas para los compuestos hidrófobos complejos. Pero en contraste exhiben orden estructural superior debido a su naturaleza monomolecular y la ausencia de un equilibrio dinámico de diversas especies. Los compuestos sintéticos sólo pueden difundirse en dendrímeros si se cumplen ciertos requerimientos estructurales tales como la rigidez conformacional y la planitud así como la distribución de carga, tales como la afinidad a las aminas terciarias. Varios compuestos apolares tales como pireno o naftaleno han sido encapsulados en dendrímeros, pero el número de huéspedes atrapados, así como su interacción molecular con el interior del dendrímero son estimados indefinidos frecuentemente subestequiométricos.

En la US 5,714,166 y la WO 95/24221, se revelan conjugados de proteína de dendrímero. Los dendrímeros PAMAM de G4 están acoplados covalentemente a través de sus grupos funcionales terminales con la insulina, la insulina marcada con fluorescencia, la avidina, los anticuerpos monoclonales y la bradiquinina. Los grupos reactivos utilizados para la conjugación sólo están presentes en la superficie de los dendrímeros, y por lo tanto cualquier aducto covalente generado por el método enseñado se asociará con el exterior del dendrímero. La "congestión" estérica de los grupos terminales dendrímicos es un prerrequisito para la formación del espacio vacío interno. En un estudio de micrografía de electrones de transmisión de barrido, se observó que los dendrímeros PAMAM se someten a un cambio morfológico en la etapa G9. La congestión de la superficie creó un interior hueco rodeado por un borde denso. Los dendrímeros G4 utilizados para la conjugación de proteínas no contienen dichos vacíos. Además, es aparente a partir de la comparación de tamaño molecular, que una insulina de tamaño de 3 nm no se puede encapsular en una densa, dendrímero PAMAM de generación 4 de tamaño 4 nm. La hemoglobina tiene un diámetro de 5.5 nm, y los dendrímeros PAMAM de G5, G6 y G7 exhiben diámetros de 5.3 nm, 6.7 y 8.0 nm, respectivamente. Las macromoléculas tales como péptidos y proteínas son excluidas por ser de la difusión a través del empaquetamiento molecular denso y que entran al interior de dichos dendrímeros. Como la superficie del dendrímero es más bien densamente agrupada, los tamaños de los poros son demasiado pequeños para permitir una entrada de una proteína en el interior del dendrímero. Por estas razones, la proteína macromolecular o los huéspedes polipéptidos no han sido encapsulados en dendrímeros, ni ha sido demostrada la encapsulación no covalente de proteínas.

Dendrímeros PAMAM contienen grupos amina libres en sus superficies y fácilmente se asocian con el ADN a través de interacciones electrostáticas.

La WO 01/07469 detalla dendrímeros de polipéptidos solubles en agua constituidos por aminoácidos omitina y glicina. La solicitud de patente también enseña la encapsulación no covalente de un oligosacárido, heparina, por dendrimerización del núcleo del dendrímero en presencia de heparina bajo condiciones moderadas. El oligosacárido se libera del dendrímero mediante escisión inducida por la luz de los enlaces lábiles a UV dentro de la estructura dendrítica. La estructura del núcleo utilizada aquí fue tris (2-maleimidoetil)amina. Los dendrímeros polipéptidos presintetizados, que contienen un grupo tiol libre se incubaron en DMF en la presencia de heparina. Es improbable que esta metodología sea aplicable a las proteínas pues ocurren reacciones secundarias sustanciales entre el núcleo maleimido y la proteína, además la competición estérica evitará una encapsulación eficiente bien sea que se evite la formación completa de la estructura tri-dendrítica o que la proteína no será atrapada. El ejemplo no enseña cómo generar un complejo de estequiometría bien definida.

Hay una necesidad continua por técnicas y dispositivos los cuales permitan una encapsulación efectiva de proteínas con el fin de asegurar una entrega controlada y, si es apropiado, la liberación de proteínas farmacológicamente activas. La encapsulación no debe alterar la estructura y las propiedades de las proteínas y debe proteger de manera eficiente la proteína de los ataques por el sistema inmune y las enzimas del individuo al cual se administra la proteína. Además, en caso de que esto se desee, la proteína debe permitir una liberación eficaz de la proteína encapsulada.

Este objetivo se consigue por una proteína encapsulada covalentemente o no covalentemente por un compuesto orgánico encapsulante (EOC) en donde la proteína y el compuesto orgánico encapsulante están presentes en estequiometría 1:1.

Los EOC apropiados son solubles en agua, y se describen en las reivindicaciones.

5 Los EOC contienen varios, es decir, al menos 2, cadenas de moléculas de una longitud apropiada que las cadenas pueden organizar de tal manera que se forma una cavidad que puede acoger la proteína y protegerla de la acción de enzimas, anticuerpos y similares. En lo sucesivo las cadenas de la molécula serán denominadas como "cadenas moleculares encapsulantes" EMC. Las EMC se pueden conectar directamente entre sí, o a través de una unidad química, una o más de las llamadas frecuentemente unidades de ramificación (véase más abajo).

10 En lo que sigue, se definirán las EMC de acuerdo con la presente invención. Esta definición se aplica cada vez que EMC será mencionada en la presente solicitud de una forma general, bien sea en conexión con una fórmula general o en cualquier otro contexto.

Las EMC contienen grupos hidrófilos, en una proporción y cantidad apropiada con respecto a los grupos hidrófobos que pueden estar presentes en el EOC, para hacer el último soluble en agua.

15 Las EMC se construyen a partir de cadenas de alquilo lineales, ramificadas o cíclicas. Para hacer las cadenas alquilo hidrófobas más hidrófilas, heteroátomos tales como, pero no limitados a S, N, O pueden estar presentes dentro de la cadena. Otros grupos apropiados que pueden estar presentes en las EMC incluyen (-S-S)-, amida -C(O)NH- o C(O)NR-, -S-succinimido, amino (-NR-), éster carboxílico (-C(O)O-), sulfonamida (-S(O)₂-NR-), carbamato (-O-C(O)-NR-), carbonato (-O-C(O)-O-), sulfona (-S(O)₂-), éter(-O-), oxima (-CR=N-O-), hidrazona (-CR=N-NR-), urea (-NR-C(O)-NR-), tiourea (-NR-C(S)-NR-), carbohidrato, glicerilo, fosfato (-O-P(O)(OR)O-), fosfonato (-P(O)(OR)O-), compuestos (hetero)cíclicos saturados y no saturados. Ejemplos no limitantes de R incluyen H, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos los cuales pueden contener además grupos funcionales o heteroátomos. Además de los grupos antes mencionados, otros grupos conocidos para la persona experimentada en la técnica pueden estar presentes en las EMC.

25 Las EMC de la invención comprenden grupos oxietileno (-OCH₂CH₂)-.

En una realización de la presente invención, las EMC comprenden al menos una unidad aminoácido en su cadena. En el contexto de la presente invención, "unidad de aminoácido" significa un aminoácido, preferiblemente un aminoácido de origen natural como la lisina, el cual está conectado a al menos un asociado de unión adicional, por ejemplo un aminoácido adicional, por su amino y/o su función carboxi. El aminoácido puede ser modificado, por ejemplo, llevar uno o más sustituyentes.

Las EMC llevan uno o más sustituyentes (grupos de cubrimiento o modificadores de C) en su estructura. Los grupos de cubrimiento apropiados son grupos exigentes estéricamente. Los grupos de cubrimiento, en particular estarán presentes si las EMC requieren grupos exigentes estéricamente forzándolos en una cierta conformación necesaria para la creación de la cavidad que encierra la proteína. En muchos casos, las EMC de acuerdo con la presente invención no son rígidas, y las subunidades de las EMC pueden girar alrededor de los lazos de la cadena y ocupar una posición espacial de acuerdo con los requerimientos estéricos (la cual, en general, será la posición con la energía más baja). Los grupos de cubrimiento pueden evitar una aproximación demasiado cerca de las EMC y una abertura de la cavidad, la cual puede resultar en una encapsulación insuficiente de la proteína y una protección insuficiente contra el ataque de las enzimas, anticuerpos o similares. Además, la proteína puede dejar totalmente la cavidad a través de la brecha resultante del movimiento de las EMC.

Los grupos de tapado C se construyen a partir de cadenas de alquilo lineales, ramificadas o cíclicas. Para hacer las cadenas alquilo hidrófobas más hidrófilas, hetero átomos tales como, pero no limitados a S, N, O pueden estar presentes dentro de la cadena. Otros grupos adecuados que pueden estar presentes en los grupos de cubrimiento incluyen (-S-S)-, amida -C(O)NH- o C(O)NR-, -S-succinimido, amino (-NR-), éster carboxílico (-C(O)O-), sulfonamida (-S(O)₂-NR-), carbamato (-O-C(O)-NR-), carbonata (-O-C(O)-O-), sulfona (-S(O)₂-), éter (-O-), oxima (-CR=N-O-), hidrazona (-CR=N-NR-), urea (-NR-C(O)-NR-), tiourea(-NR-C(S)-NR-), carbohidrato, glicerilo, fosfato (-OP(O)(OR)O-), fosfonato (-P(O)(OR)O-), compuestos (hetero)cíclicos saturados y no saturados. Ejemplos no limitantes de R incluyen H, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos los cuales pueden contener además grupos funcionales o heteroátomos. Además de los grupos antes mencionados, otros grupos conocidos para la persona experimentada en la técnica pueden estar presentes en las EMC.

En una realización de la presente invención, las unidades de tapado comprenden al menos una unidad de aminoácidos en su cadena. En el contexto de la presente invención, "unidad de aminoácido" significa un aminoácido, preferiblemente un aminoácido de origen natural como la lisina, la cual está conectada a al menos un asociado de unión adicional, por ejemplo un aminoácido adicional, por su amino y/o su función carboxi. El aminoácido puede ser modificado, por ejemplo, llevar uno o más sustituyentes.

Los grupos de cubrimiento de la invención comprenden grupos oxietileno (-OCH₂CH₂)- en una relación y cantidad apropiada, con el fin de obtener grupos de cubrimiento con la hidrofiliidad deseada la cual puede ser mayor o menor que la hidrofiliidad de las EMC.

- 5 Los grupos de cubrimiento en la EMC pueden contener uno o más grupos funcionales de los anteriormente citados. Los grupos funcionales presentes en un grupo de cubrimiento dado pueden ser idénticos o diferentes. Cada uno de los grupos citados puede estar presente sólo una vez o varias veces. Los grupos de cubrimiento presentes en una EMC dada pueden ser idénticos o diferentes.

En una realización de la presente invención, los grupos de cubrimiento no tienen un alto grado de ramificación. Esto será el caso, en particular, si los EOC de acuerdo con la presente invención tienen un alto número de las EMC.

- 10 En una realización adicional de la presente invención, los grupos de cubrimiento son moléculas muy ramificadas moléculas que tienen preferiblemente un grado de ramificación de 2, 3, 4, 5 o 6. Un grado de ramificación de 2 significa que la cadena principal conectada a la unidad encapsulante se divide en 2 subcadenas, mientras que en el caso de un grado de ramificación de 3, la cadena principal se divide en 3 subcadenas, etc.

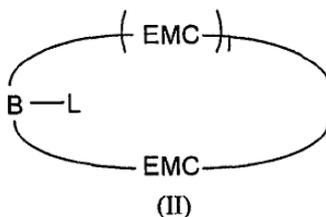
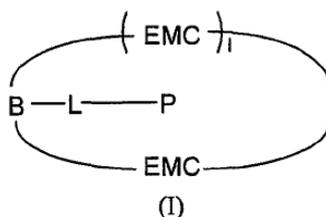
- 15 Las subcadenas pueden ser también ramificadas. En el contexto de la presente invención, este caso será referido como "subramificado" (Los modificadores son subramificados, es decir, su cadena principal contiene subcadenas que de por sí son ramificadas). Por ejemplo, en el caso de un grado de ramificación de 2, cada una de las 2 subcadenas puede ser subramificada a un grado de subramificación de 2, lo que significa que también cada una de las 2 subcadenas en las que la cadena principal (cadena principal) se divide a sí misma, se divide en 2 subcadenas. En tal caso, el grado de ramificación se designará como 2(2).

- 20 Cuando un EOC de acuerdo con la presente invención es sustituido por grupos de cubrimiento los cuales están altamente ramificados, dará como resultado una estructura dendrítica.

El término polímero hiperramificado utilizado en esta descripción está previsto para incluir una combinación de una EMC con grupos de cubrimiento, así como los EOC.

Los compuestos de la invención se describen en las reivindicaciones.

- 25 También se describe un compuesto EPIC de inclusión de proteína EOC de acuerdo con la fórmula (I) en la cual las EMC están conectadas entre sí por una ramificación de la unidad B, que resulta en un EOC de la estructura de acuerdo con la fórmula (II) en la cual se forma una cavidad.



En las formulas (I) y (II), los símbolos tienen los siguientes significados:

- 30 B: unidad de ramificación (unidad básica, núcleo) que contiene al menos un centro de ramificación Bc y al menos dos grupos funcionales de ramificación Bfg conectados a o capaces de reaccionar con una unidad encapsulante EMC;

EMC: cadena molecular encapsulante;

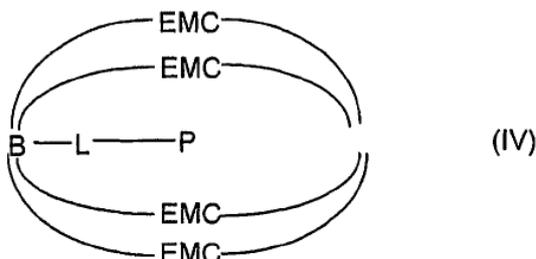
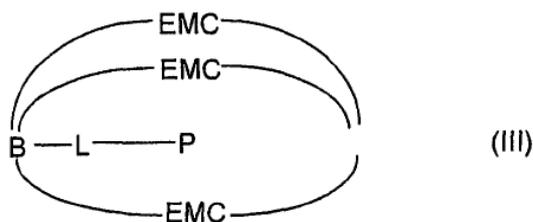
- 35 L: enlazante que contiene al menos un grupo funcional Lfg el cual está conectado a la proteína P o capaz de conectarse con los grupos funcionales presentes en la proteína P bajo la formación de un enlace químico;

I: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en particular 2,3,4,5 o 6;

P: proteína farmacológicamente activa.

5 Las EMC han sido definidos de antemano. En lo que sigue, se definen los grupos B, L y P de acuerdo con las fórmulas (I) y (II). Esta definición se aplica cada vez que B, L y P serán mencionadas en la presente solicitud en una forma general, ya sea en relación con una fórmula general o en cualquier otro contexto.

También se divulgan los EOC que comprenden más de 2 EMC, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13. Se muestran algunos ejemplos preferidos, en las fórmulas a continuación.



10 Las unidades de ramificación B puede ser consideradas como la unidad básica o el núcleo de las EMC de acuerdo con la presente invención.

15 Las EMC están enlazadas por un grupo funcional EMC con al menos una unidad de ramificación B. La unidad B contiene al menos un centro de ramificación Bc. Ejemplos de Bc incluyen unidades como >CH- o >C< y los análogos respectivos en donde H es sustituido con un grupo orgánico; >N-; >P-. Los centros Bc pueden directamente ser enlazados con los grupos funcionales de ramificación (véase abajo), o pueden ser enlazado con al menos una cadena orgánica.

20 Ejemplos de cadenas orgánicas adecuadas incluyen cadenas de alquilo lineales, ramificadas o cíclicas. Heteroátomos como, pero no limitados a S, N, O pueden estar presentes dentro de la cadena. Otros grupos adecuados que pueden estar presentes en B incluyen (-S-S)-, amida -C(O)NH- o C(O)NR-, -S-succinimido, amino (-NR-), éster carboxílico (-C(O)O-), sulfonamida (-S(O)2-NR-, carbamato (-O-C(O)-NR-), carbonato (-O-C(O)-O-), sulfona (-S(O)2-), éter (-O-), oxima (-CR=N-O-), hidrazona (-CR=NNR-), urea (-NR-C(O)-NR-), tiourea (-NR-C(S)-NR-), carbohidrato, glicerilo, fosfato (-O-P(O)(OR)O-), fosfonato (-P(O)(OR)O-), compuestos hetero(cíclicos) saturados y no saturados. Los ejemplos no limitantes de R incluyen H, grupos alquilo lineal, ramificado o cíclicos que pueden contener otros grupos funcionales o heteroátomos. Además de los grupos antes mencionados, otros grupos conocidos para la persona experta en la técnica pueden estar presentes en B.

25 B puede contener uno o más grupos elegidos entre los citados anteriormente. Los grupos pueden ser idénticos o diferentes. Cada uno de los grupos citados puede estar presente sólo una vez o varias veces. En una realización preferida de la presente invención, B comprende al menos una unidad de aminoácidos, preferiblemente de un aminoácido de origen natural como la lisina. Es incluso más preferido si B contiene una unidad compuesta de varias unidades de aminoácidos.

30 En general, B será una estructura ramificada que contiene uno o más de los grupos mencionados anteriormente y que tiene una cierta longitud, de conformidad con los requerimientos estéricos de la proteína a ser encapsulada. B comprenderá uno o más centro de ramificación. Además, B contendrá al menos dos grupos funcionales de ramificación Bfg lo que permite la fijación de las EMC.

35 Ejemplos de especies de enlaces adecuados formados entre B y la EMC incluyen los siguientes: (-S-S)-, S-succinimido, amida -C(O)NH- o C(O)NR-, -S-succinimido, amino (-NR-), éster carboxílico (-C(O)O-), sulfonamida (-S(O)2-NR-), carbamato (-O-C(O)-NR-), carbonato (-O-C(O)-O-), éter (-O-), oxima (-CR=N-O-), hidrazona (-CR=N-

NR-), urea (-NR-C(O)-NR-), tiourea (-NR-C(S)-NR-), fosfato (-O-P(O)(OR)O-), fosfonato (-P(O)(OR)O-). Los ejemplos no limitantes de R incluyen H, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que pueden contener otros grupos funcionales o heteroátomos o grupos arilo.

5 Como será evidente para la persona experta en la técnica a partir de lo anterior, los grupos funcionales presentes en la EMC y B (Bfg) de la EOC serán transformados (y cambiados) en una especie de enlace. Cuando, en el contexto de la presente invención, se hace referencia al presente "grupo funcional" en la B y la EMC, esto se refiere a los grupos funcionales, como tal, así como a las especies de enlace formados por la reacción entre los grupos.

10 En el contexto de la presente invención, "enlace" o "enlace químico" se refiere a las fuerzas de atracción como tal entre dos o más átomos (por ejemplo, un "enlace covalente"), mientras que la "especies de enlace" denota el enlace químico y los átomos en la vecindad la cual está implicada en el proceso de enlace (por ejemplo, -S-S-).

Como las especies de enlace representados de antemano se forman por la reacción entre los grupos funcionales (grupos funcionales los cuales pueden ser iguales o diferentes), las EMC y B antes de la formación de las especies de enlaces, ambos contienen grupos funcionales que son capaces de reaccionar entre sí bajo la formación de un enlace químico apropiado, preferiblemente uno de los enlaces mencionados de antemano.

15 Ejemplos de grupos funcionales de ramificación apropiados Bfg y grupos funcionales de EMC comprenden amino (-NRH), ácido carboxílico (-C(O)OH) y derivados, ácido sulfónico (-S(O)₂-OH) y derivados, carbonato (-O-C(O)-O-) y derivados, hidroxilo (-OH), aldehído (-CHO), cetona (-CRO), hidrazina (H₂N-NR-), isocianato (-NCO), isotiocianato (-NCS), ácido fosfórico (-O-P(O)(OR)OH) y derivados, ácido fosfónico (-P(O)(OR)OH) y derivados, haloacetilo, haluros de alquilo, maleimida, acrililo, agentes arilantes como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros como disulfuro de piridilo, sulfona de vinilo, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos diazoacetilo, epóxido, oxirano, aziridina. Los ejemplos no limitantes de R incluyen H, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que pueden contener otros grupos funcionales o heteroátomos o grupos arilo.

20

25 En una realización preferida de la presente invención grupos funcionales de ramificación y grupos funcionales de EMC comprenden amino, ácido carboxílico y derivados, hidrazina, hidroxilamina, tiol, aldehído, hidroxilo, carbonato, maleimida o grupos haloacetilo.

Como ya se mencionó, B puede contener dos o más Bfgs. Este es en particular el caso cuando el EOC comprende más de cuatro, por ejemplo 5, 6, 7, 8 o más EMC.

Del mismo modo B puede contener uno o más centros de ramificación Bc.

30 Un constituyente esencial adicional de los EOC de acuerdo con la presente invención es el enlazador L, el cual sirve para establecer un enlace químico entre la proteína P y el EOC, por la reacción entre los grupos funcionales apropiados Lfg sobre el enlazador L y la proteína. El enlace químico puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente, por ejemplo, un enlace coordinativo. Preferiblemente, el EOC tiene con 1 o 2 enlazantes.

Se describen aquí varios tipos de enlazantes:

Enlazante no escindible: un enlazante que no contiene uniones escindibles selectivamente.

35 Enlazante escindible: un enlazante que contiene una unión que se puede escindir selectivamente mediante un reactivo de escisión (TCEP, TFA, DTT, enzima, o un regulador).

Enlazante sin traza: un enlazante que tras la escisión libera la proteína de una manera tal que la proteína no está asociada con un producto de escisión enlazante restante.

40 Enlazante de profármaco: un enlazante escindible que contiene un enlace que se puede escindir selectivamente bajo condiciones in vivo, por ejemplo en la presencia de enzimas endógenas u otros reactivos endógenos, o únicamente en regulador acuoso.

Enlazantes de profármacos sin traza: enlazantes que tienen tanto las características de enlazantes de profármacos y enlazantes sin traza.

45 Los compuestos de la invención contienen sustancialmente enlazantes sin trazas no escindibles enzimáticamente que comprenden un grupo carbamato.

50 Dependiendo de la aplicación terapéutica, la proteína puede necesitar ser encapsulada de forma permanente, y por lo tanto pueden ser empleados enlazantes estables no escindibles. Esto se ejemplifica en la preparación de conjugados de EOC de hemoglobina. La hemoglobina requiere la difusión de oxígeno a través del EOC pero la proteína no necesita ser liberada de su encapsulación para bioactividad. Enlazantes correspondientes son conocidos en la técnica (Hermanson GT, Bioconjugate Techniques, Academic Press San Diego, 1996).

En muchos casos, la liberación de la proteína desde el EOC/EPIC es obligatoria para su bioactividad. Un ejemplo es la insulina que, con el fin de unirse a su receptor, debe difundirse fuera del blindaje del EOC. La liberación de proteínas se puede lograr mediante la escisión de la atadura covalente entre la proteína y el EOC.

Enlazantes escindibles son conocidos en la técnica (véase Hermanson).

- 5 El enlazante L puede reaccionar con cualquier grupo funcional apropiado Pfg presente en la proteína P, preferiblemente con los mencionados a continuación.

10 Ejemplos de especies de enlace adecuados formados entre la proteína P y el enlazante L incluyen los siguientes: (-SS)-, S-succinimido, amida -C(O)NH- o C(O)NR-, -S-succinimido, amino (-NR-), éster carboxílico (-C(O)O-), sulfonamida (-S(O)₂-NR-), carbamato (-O-C(O)-NR-), carbonato (-O-C(O)-O-), éter (-O-), oxima (-CR=N-O-), hidrazona (-CR=NNR-), urea (-NR-C(O)-NR-), tiourea (-NR-C(S)-NR-), fosfato (-O-P(O)(OR)O-), fosfonato (-P(O)(OR)O-). Los ejemplos no limitantes de R incluyen H, Grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que pueden contener otros grupos funcionales o heteroátomos o grupos arilo.

15 En el contexto de la presente invención, "enlace" o "enlace químico" se refiere a las fuerzas de atracción como tal entre dos o más átomos (por ejemplo, un "enlace covalente"), mientras que las "especies de enlace" denota el enlace químico y los átomos en la vecindad la cual está implicada en el proceso de enlace (por ejemplo S-S).

20 Como las especies de enlace representados de antemano se forman por la reacción entre los grupos funcionales (grupos funcionales los cuales pueden ser idénticos o diferentes), el EOC, antes de reaccionar con la proteína, y la proteína, antes de reaccionar con el EOC, ambos contienen grupos funcionales los cuales son capaces de reaccionar entre sí bajo la formación de un enlace químico apropiado, preferiblemente uno de los enlaces mencionados de antemano.

Ejemplos de grupos funcionales de proteína apropiada Pfg los cuales son parte de los aminoácidos que forman la proteína natural (es decir, no modificada) son grupos amino, tiol, hidroxilo, fenol, imidazol, amida, indol, ácido carboxílico y guanidina.

En una realización preferida de la presente invención los Pfgs comprenden grupos amino, imidazol y tiol.

25 Ejemplos de grupos funcionales enlazantes adecuados comprenden amino (-NRH), ácido carboxílico (-C(O)OH) y derivados, ácido sulfónico (-S(O)₂-OH) y derivados, carbonato (-O-C(O)-O-) y derivados, hidroxilo (-OH), aldehído (-CHO), cetona (-CRO), isocianato (-NCO), isotiocianato (-NCS), haloacetilo, haluros de alquilo, maleimida, acrililo, agentes arilantes como fluoruros de arilo, disulfuros como disulfuro de piridilo, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos diazoacetilo, epóxido, oxirano, aziridina. Los ejemplos no limitantes de R incluyen H, lineal, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que pueden contener otros grupos funcionales o heteroátomos o grupos arilo.

30

En una realización preferida de la presente invención los Lfgs comprenden carbamato, carbonato, tiol, tioéter, succinimidilo, amida y disulfuro.

35 Como será evidente para la persona experta en la técnica a partir de lo anterior, los grupos funcionales presentes en la proteína P (Pfg), y el enlazante L (Lfg) del EOC serán transformados (y cambiados) en un enlace químico. Cuando, en el contexto de la presente invención, se hace referencia al presente "grupo funcional" en el enlazante L y la proteína P, esto se refiere a los grupos funcionales como tal, así como a las especies de enlace formados por la reacción entre los grupos.

40 Una parte de la presente invención son estructuras de enlace doble de profármacos sin traza y sus EPIC resultan en un nuevo mecanismo de escisión y la subsecuente liberación de la proteína desde el EOC.

Muchos reactivos enlazantes de proteína aplicados ampliamente y disponibles comercialmente escinden de tal manera, que parte del enlazante permanece conjugado a la proteína. Como tales fragmentos enlazantes son de bajo peso molecular y si el sitio de la conjugación no implica un aminoácido que es esencial para la unión del receptor, la bioactividad de la proteína terapéutica puede ser retenida totalmente o parcialmente.

45 Más ventajosos son los enlazantes sin traza escindibles que liberan la proteína en una forma no modificada bajo condiciones in vivo tales como el pH neutro sin la adición de agentes de escisión químicos o biológicos. Ejemplos son profármacos dobles los cuales se basan en unidades estructurales enlazantes que se escinden en un proceso de dos etapas in vivo. La WO 99/30727A1, la cual es incorporada aquí como referencia, revela conjugados que contienen una unidad estructural de PEG, un enlazante profármaco doble y proteína. La ventaja de tales sistemas es que la proteína es liberada en una forma no modificada. El proceso de escisión enlazante es sin traza, el producto final de proteína de la etapa de escisión no contiene remanentes de la estructura del enlazante. Un enlace es hidrolizado en una etapa primera determinante de la rata. Esto es típicamente un enlace de éster, tal como en un éster de fenol, y la hidrólisis puede ocurrir por ataque enzimático (lipasas) o autohidrólisis o una combinación de

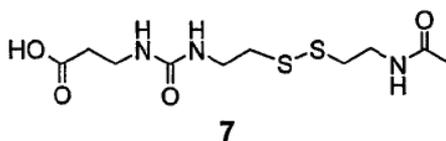
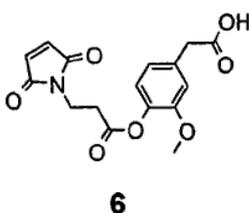
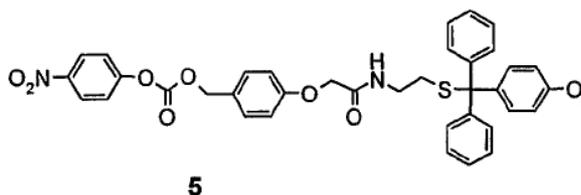
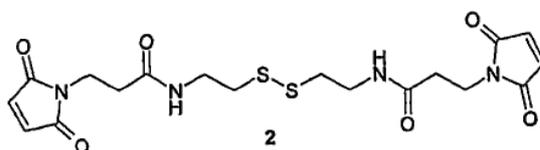
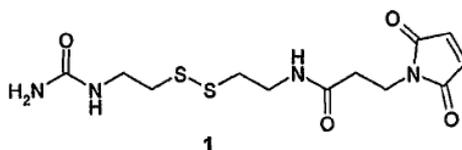
50

ambos. Esto es típicamente un enlace éster, tal como en un éster de fenol, y la hidrólisis puede ocurrir por ataque enzimático (lipasas) o autohidrólisis o una combinación de ambos. El fenol libre resultante es inestable y rápidamente se reorganiza por ejemplo a través de 1,4- o eliminación de arilo 1,6, y la escisión de un carbamato libera la proteína, CO₂ y una unidad estructural aromática inestable.

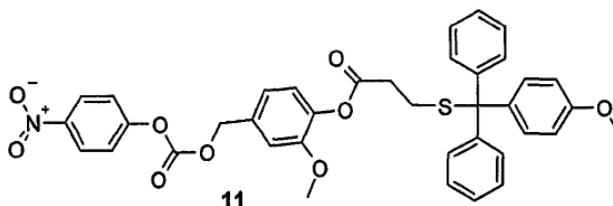
- 5 Además, los enlazantes que son conocidos por la persona experimentada en la técnica pueden ser escindidos de una manera tal que después de la escisión no permanecen partes del enlazante en el EOC.

En la presente invención los enlazantes son enlazantes de profármacos sin traza los cuales contienen una funcionalidad carbamato.

Ejemplos de reactivos enlazantes son aquellos de acuerdo con las fórmulas (1), (2), (5), (6) y(7).



También se describe el reactivo enlazante de acuerdo con la fórmula (11) abajo (enlazante de profármaco sin traza).



- 15 Lee S, Greenwald RB, McGuire J, Yang K, Shi C, Bioconjugate Chem 12 (2001) 163-9, el cual se incorpora aquí como referencia, reseñó enlazantes dobles de profármacos que emplean eliminación de 1,6 para conjugados de

proteína PEG liberables. El uso de tales enlazadores o relacionados para conjugados de EOC-proteína está dentro del alcance de la presente invención.

5 Después de la escisión del enlazante, resulta un EPIC en el cual la proteína no está conectado al EOC a través de un conector (un enlace químico), pero la proteína se mantiene dentro de la cavidad definida por el EOC. Los EPIC resultantes son un objeto de la presente invención. Depende de la cinética de liberación de la proteína si el respectivo EPIC no tiene enlace entre la proteína y el EOC se puede aislar como tal.

En los EPIC de acuerdo con la presente invención, la proteína se puede encapsular total o parcialmente mediante el EOC. Se prefiere para encapsular completamente la proteína, es decir, la cavidad es de un tamaño suficientemente grande como para aceptar la proteína completa en la misma.

10 Los EPIC de acuerdo con la presente invención pueden, en principio, dar cabida a cualquier proteína que tiene una actividad fisiológica o farmacológica. Estos son conocidos por la persona experta en la técnica. Proteínas importantes se pueden encontrar en libros de texto estándar que son conocidas por las personas experimentadas en la técnica.

15 Proteínas terapéuticas relevantes y polipéptidos que pueden ser encapsulados de acuerdo con la presente invención son: ACTH , adenosina desaminasa , agalsidasa , albúmina , alfa -1 antitripsina (AAT), alfa-1 inhibidor de la proteinasa (API), alteplasa , anistreplasa , serina proteasa ancrod, anticuerpos(monoclonales o policlonales, y fragmentos o fusiones), antitrombina III, antitripsinas, aprotinina , asparaginasas, bifalina, proteínas morfogénicas óseas, calcitonina (salmón), colagenasa , DNasa, endorfinas, enfuvirtida, encefalinas, eritropoyetinas, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisisina, proteínas de fusión, hormonas estimulantes de folículo, factor
20 estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), galactosidasa, glucagón, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonia de granulocitos macrófagos (GM-CSF), gonadotropina coriónica (hCG), hemoglobinas, vacunas de hepatitis B, hirudina, hialuronidasas, idumonidasa, inmunoglobulinas, vacunas contra la influenza, interleucinas (1 alfa , 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12), antagonista del receptor de IL- 1 (rhIL-1ra), insulinas, interferones (alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a, gamma 1b), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactasa, leuprolida,
25 levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna de Lyme, péptido natriurético, pancrelipasa, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH), prolactina, proteína C, octreotida, secretina, sermorelina, superóxido dismutasa (SOD), somatropina (hormona del crecimiento), somatostatina, estreptoquinasa, sacarasa, fragmento de la toxina del tétanos, Tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tirotropina, factor de necrosis tumoral (TNF), Fc IgG del receptor de TNF,
30 activador del plasminógeno tisular (tPA) , TSH, urato oxidasa, uroquinasa, vacunas.

Las proteínas preferidas son anticuerpos, la calcitonina, G-CSF, GM-CSF, eritropoyetinas, hemoglobinas, interleucinas, insulinas, interferones, SOD, somatropina, TNF, Fc IgG del receptor de TNF.

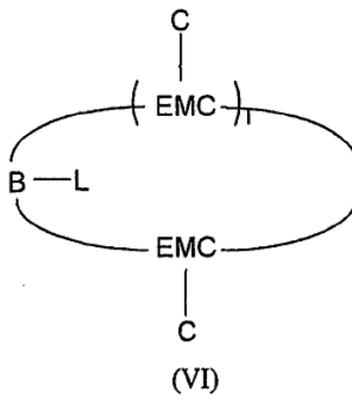
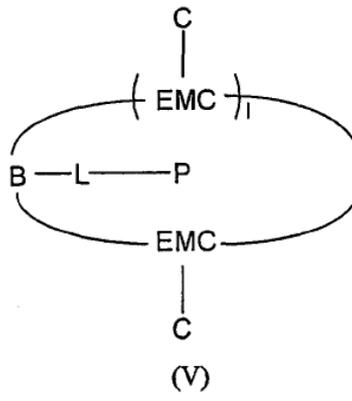
Las proteínas más preferidas son eritropoyetinas, interferones, insulinas, somatropina y hemoglobinas.

35 Se entiende que la invención no está limitada a proteínas terapéuticas. También es deseable la protección de ambientes agresivos para otras proteínas tales como amilasas, proteasas, peptidasas, xilanasas, lipasas, lipoxigenasas, celulasas, pectinasas, fitasas, oxidorreductasas aplicadas en los procesos industriales, tales como aplicaciones de alimentos y alimentación animal, como productos de limpieza en los detergentes de lavandería, detergentes para lavavajillas, en la manufactura de productos químicos como el alcohol, esteroides y antibióticos, aminoácidos, proteínas, triglicéridos, fosfolípidos, y para aplicaciones textiles, de cuero y de piel, especialmente en el preblanqueo de pulpa.
40

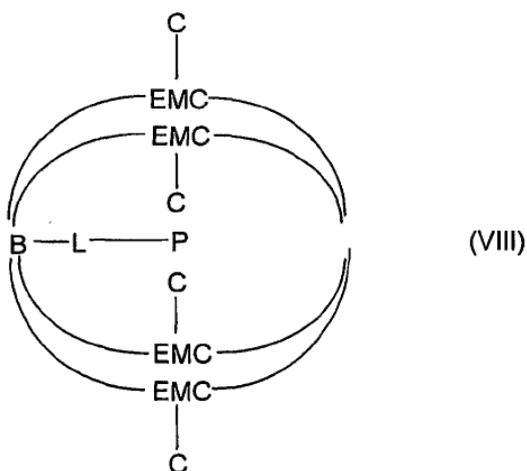
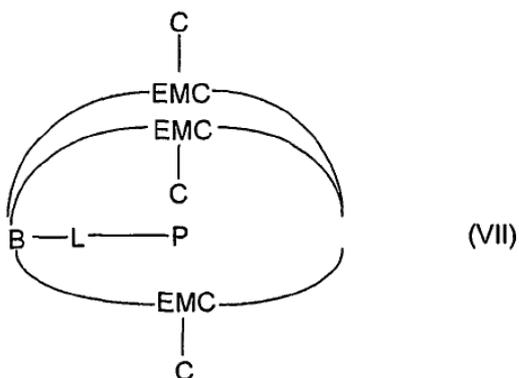
Todas las proteínas, en particular las citadas de antemano, se pueden encapsular en una estructura macrocíclica de acuerdo con la presente invención, para resultar en un MPIC, o en un dendrímero resultante en un DPIC.

45 El tamaño de la cavidad en los EOC (es decir, los proteóforos, estructuras macrocíclicas y dendrímeros) de acuerdo con la presente invención necesita ser adaptado al diámetro de las proteínas. El tamaño debe ser mayor que el diámetro de la esfera más pequeña que se puede extraer alrededor de una proteína plegada correctamente. A partir de esta estimación de diámetro, se puede calcular la longitud de la cadena molecular correspondiente en el huésped de EOC. Con el fin de encapsular la insulina (aproximadamente 3 nm de diámetro), una cadena de al menos 5 nm de longitud que puede plegarse en una conformación de medio cíclico necesita estar presente en el EOC.

50 En la presente invención, las EMC de acuerdo con la fórmula (II) contienen grupos de cubrimiento (C) los cuales están dispuestos de tal forma que dan como resultado una estructura dendrítica del EOC. Cuando tal EMC encierra una proteína, dan como resultado los compuestos de inclusión de la proteína dendrímero DPIC de acuerdo con la fórmula (V) en donde un dendrímero (VI) encapsula la proteína. Tales DPIC forman los compuestos de la presente invención. En las siguientes fórmulas (V) y (VI) C denota un grupo de cubrimiento tal como se definió de antemano y los otros símbolos tienen los significados definidos para la fórmula (I).



Las realizaciones de los EOC de cubrimiento que tienen tres y cuatro EMC se muestran en las fórmulas (VII) y (VIII) a continuación.



Los DPIC de acuerdo con las fórmulas generales (V) a (VIII) muestran una relación de 1:1 proteína/dendrímico. Los DPIC son solubles en agua. En general, la cavidad del dendrímico también comprende agua, además de la proteína.

- 5 Los dendrímeros son conocidos por la persona experimentada en la técnica. Se hace referencia a: Dendrimer II Architecture, Nanostructure and Supramolecular Chemistry, Springer Verlag 2000, F. Vögtle Editor. Los dendrímeros se basan en la repetición de estructuras hiperramificadas que emanan de un núcleo central (US 4,507,466). Estas macromoléculas sintéticas se ensamblan de forma gradual, con cada ciclo de reacción se agrega otra capa de ramas (llamado "generación"). Los dendrímeros son accedidos sintéticamente por etapas, síntesis divergente "de abajo hacia arriba" o convergente "de arriba hacia abajo". El componente estructural central es la unidad básica de la que los dendrímeros hiperramificados se extienden de manera radialmente simétrica.
- 10

Los dendrímeros de acuerdo con la presente invención pueden contener, en los grupos de cubrimiento, centros de ramificación en dos, tres, cuatro, o más direcciones, preferiblemente dos.

- 15 La longitud de las cadenas dendríticas puede ser idénticas o variar entre las cadenas de un dendrímico. Las longitudes de cadena preferidas para dendrímeros individuales son de hasta 5000 enlaces.

Mediante la elección de los grupos de cubrimiento apropiados, es perfectamente posible proteger la proteína encapsulada del ataque de por ejemplo anticuerpos o la eliminación mediante el riñón o el hígado.

Los grupos de tapado C se han definido anteriormente, definición que también se aplica aquí.

- 20 En todas las fórmulas (V) a (VIII) se muestra de antemano, que un EMC puede llevar un grupo de cubrimiento C (como se muestra en las fórmulas) o más de uno, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso más grupos de cubrimiento C

- 25 En una realización preferida de la presente invención, algunos grupos de cubrimiento en dendrímeros de acuerdo con la invención contienen unidades heterofuncionales ramificadas que llevan al menos una unidad estructural tio-succinimido. Los grupos tio-succinimido son el resultado de una reacción entre un maleimido y un grupo tiol y se pueden obtener bajo condiciones moderadas, demostrando su utilidad para la síntesis de estructuras

hiperramificadas o dendríticas. Otras unidades que pueden usarse en la síntesis de los dendrímeros de acuerdo con la presente invención comprenden tris-(2-maleimidoetil)amina y éster de hidroxisuccinimida (EP-A 0 618 192).

5 Lo más útil para el ensamble divergente de hiperramificados o dendrímeros son reactivos heterofuncionales llevando ambos un maleimido, así como un grupo tiol protegido. Tales reactivos se pueden emplear para la síntesis gradual repetida de una manera similar como por ejemplo aminoácidos protegidos o nucleósidos protegidos.

10 Se encontró que los dendrímeros de acuerdo con la presente invención se pueden formar de manera eficiente de compuestos multidentados que contienen sólo un grupo maleimida y un número de tioles protegidos, en una metodología de síntesis divergente. Los compuestos monomaleimido-tetratio-dendrímico de acuerdo con la presente invención son de la fórmula general MA-(S-Pg)_n, con los siguientes significados: M: maleimido, R: espaciador, S: azufre, Pg.: grupo protector tiol, n 2 a 200.

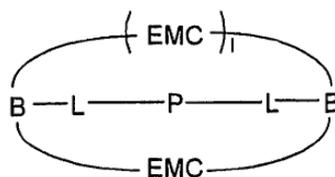
15 grupos protectores tiol adecuados: bencilo, 4-metoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo, 2,4,6-trimetoxibencilo-(Tmob), 4,4'-dimetoxifenilmetil-(diMpm), tritil-, 4-metoxitritil-(Mmt), 4,4'-dimetoxitritil- (DMTr), 4,4',4''-trimetoxitritil- (TMTr), tert-butil-MeCONHCH2- (Acm), PhCH2CONHCH2- (PhAcm), MeOCOS- (Scm), BzLOCOS-(SZ) PhN(Me)COS- (Snm), TrtS-, 2-piridinsulfenil-, 2-(3-nitropiridinsulfenilo), 4,5,6-trimetoxi-2,3-dihidro-7-benzofuranilmetil-(Tmbf), 2-(2,4-dinitrofenilo)etil- (Dnpe), 9H-xanten-9-il-(Xan), 2-metoxi-9H-xanten-9-il- (Moxan), Fmoc-S-sulfonato.

Compuestos multidentados son solubles en agua y las reacciones de conjugación no comprometen la integridad o la bioactividad estructural de la biomolécula.

20 De acuerdo con la presente invención, el núcleo del DPIC está formada por la proteína a ser encapsulada la cual está conectada (conjugada) a la estructura del polímero por un enlazador adecuado, en general, uno de los enlazadores listados más arriba.

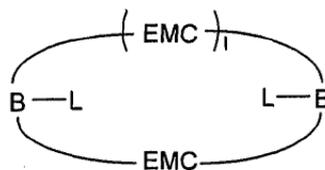
Después de la escisión del enlazador, un DPIC resulta en la proteína la cual no está conectada al dendrímero a través de un enlazador (un enlace químico), pero la proteína se mantiene dentro de la cavidad definida por el dendrímero. Los DPIC resultantes son un objeto de la presente invención. Depende de la cinética de liberación de la proteína si el DPIC no tiene enlace entre la proteína y el dendrímero puede ser aislado como tal.

25 También se describen los EOC que comprenden un segundo grupo de ramificación B idéntico o diferente del primer grupo de ramificación B a la que las EMC están conectadas, lo que resulta en una cavidad la cual está cerrada horizontalmente y abierta verticalmente. Por lo tanto, la encapsulación se realiza por un MPIC compuesto de inclusión de proteína macrociclo de acuerdo con la fórmula (IX)



(IX)

30 que contiene una proteína P y una estructura macrocíclica encapsulando la proteína total o parcialmente de acuerdo con la fórmula general (X)



(X)

en donde los símbolos en las fórmulas (IX) y (X) tienen los siguientes significados:

35 B: unidad de ramificación (unidad básica, núcleo) que contiene al menos un centro de ramificación Bc y al menos dos grupos funcionales de ramificación Bfg conectados a o capaces de reaccionar con una unidad encapsulante de EMC;

EMC: cadena molecular encapsulante;

L: enlazador que contiene al menos un grupo funcional Lfg el cual está conectado a la proteína P o capaz de conectarse con los grupos funcionales presentes en la proteína P, bajo la formación de un enlace químico;

I: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5, en particular 1, 2 o 3;

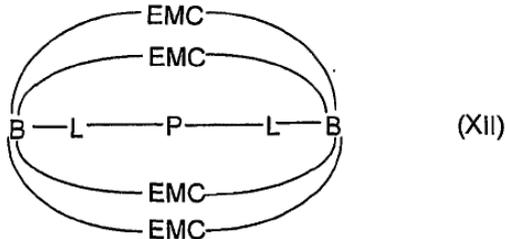
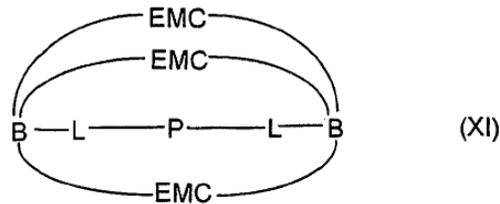
5 P: proteína farmacológicamente activa.

Los MPIC de acuerdo con la fórmula general (IX) muestra una relación 1:1 proteína/ estructura macrocíclica. Los MPIC son solubles en agua. En general, la cavidad de la estructura macrocíclica además de la proteína, también comprende agua.

10 Las EMC contienen grupos hidrófilos, en una relación y cantidad apropiada con respecto a los grupos hidrófobos los cuales pueden estar presentes en la estructura macrocíclica, para hacer el último soluble en agua.

B, EMC, L y P son de acuerdo con las definiciones dadas anteriormente.

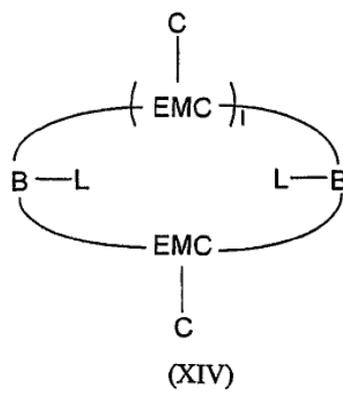
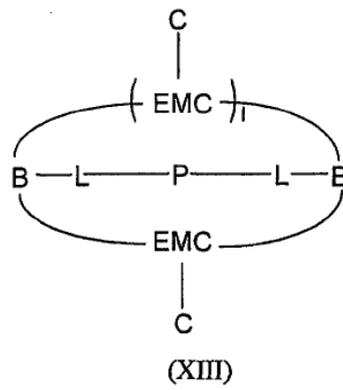
La estructura macrocíclica y el MPIC de acuerdo con la presente invención comprenden al menos dos EMC (1=1). Sin embargo, la estructura macrocíclica puede comprender 3 (1=2), 4 (1=3), 5 (1=4), 6 (1= 5) o incluso hasta 10 EMC. Algunas realizaciones se representan en las fórmulas (XI) y (XII) a continuación.



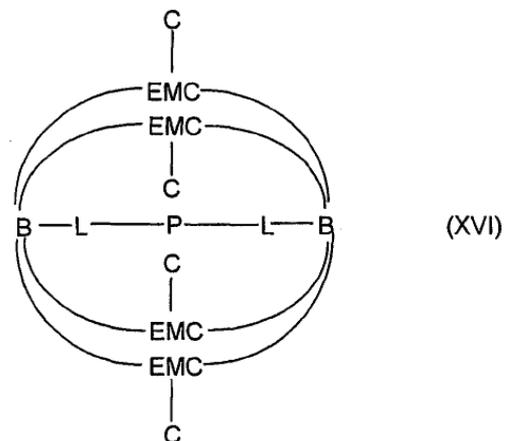
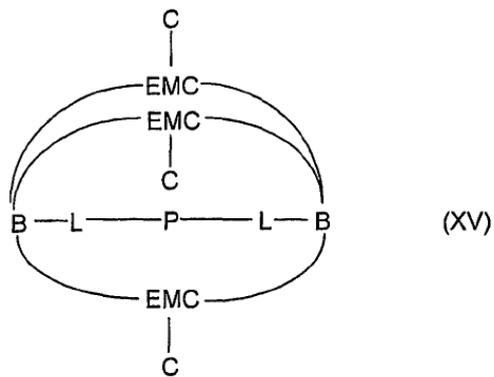
15 Todas las EMC pueden ser idénticas, idénticas parcialmente (diferentes parcialmente) o diferentes totalmente uno de otro.

20 Como se definió anteriormente, las EMC pueden llevar grupos de cubrimiento C en su estructura. Grupos de cubrimiento apropiados son grupos estéricamente exigentes. Las estructuras macrocíclicas de la presente invención no son rígidas, y las EMC, debido a la rotación alrededor de los enlaces que las conectan a las unidades de ramificación B, pueden oscilar hacia un lado, lo que resulta en que se tambalean y se aglomeran en un lado de la estructura macrocíclica, y la apertura de uno o más lados de la cavidad. Los grupos de cubrimiento previenen la proximidad estérica de las EMC. Si las EMC llegan demasiado cerca una de la otra, puede dar lugar a una protección insuficiente de la proteína encapsulada del ataque de enzimas, anticuerpos o similares. Además, la proteína puede dejar la cavidad (si el enlazante se rompe) a través de la brecha, dando como resultado una cinética de liberación no deseada de la proteína. En el caso de que estén presentes grupos de cubrimiento, resultan las siguientes estructuras (XIII) y (XIV).

25

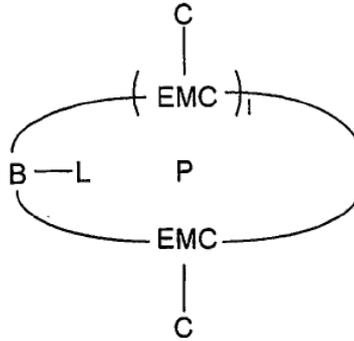


Las figuras (XV) y (XVI) a continuación muestran estructuras macrocíclicas que tienen grupos de cubrimiento en los tres y cuatro EMC de la respectiva estructura macrocíclica.

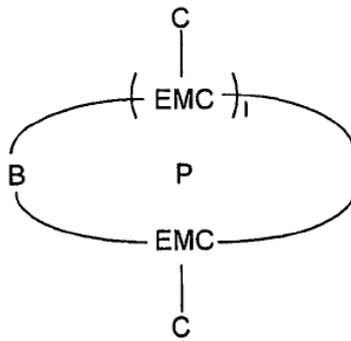


En todas las fórmulas (XI) a (XVI) mostradas de antemano, un EMC puede llevar a un grupo de cubrimiento C (como se muestra en las fórmulas) o más de uno, es decir, 2, 3, 4, 5 o incluso más grupos de cubrimiento C

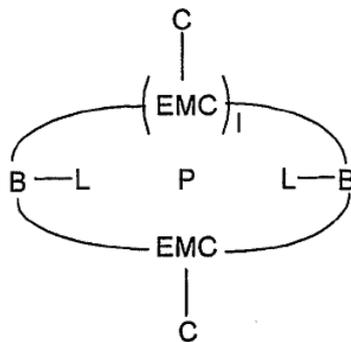
- 5 Ejemplos de EPIC, DPIC y MPIC en donde el enlazador se ha escindido y la proteína no se mantiene dentro de la cavidad mediante enlaces covalentes se representan en las fórmulas (XVII) a (XX) a continuación, que incluyen ejemplos en los cuales los rastros del enlazador permanecen en el EOC, el dendrímico o la estructura macrocíclica, y ejemplos en donde el enlazador ha sido totalmente eliminado.



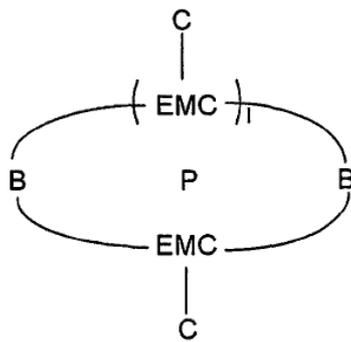
(XVII)



(XVIII)



(XIX)



(XX)

Las proteínas modificadas que contienen un enlazador son una parte de la presente invención. Dentro de esta realización, el enlazador es un enlazador sin traza, más preferiblemente enlazador profármaco sin traza.

- 5 Después de la escisión del enlazador, un MPIC da como resultado que la proteína no está conectada a la estructura macrocíclica a través de un enlazador (un enlace químico), pero la proteína se mantiene dentro de la cavidad definida por la estructura macrocíclica. Los MPIC resultantes se describen en aquí. Depende de la cinética de liberación de la proteína si el MPIC que no tiene enlace entre la proteína y la estructura macrocíclica se puede aislar como tal.

Los EPIC, MPIC y los DPIC de la presente invención se sintetizan a partir de la proteína y el EOC, la estructura macrocíclica y el dendrímero, respectivamente, mediante una combinación de métodos de síntesis de fase sólida y solución conocidos para la persona experta en la técnica.

5 La molécula huésped puede estar equipada con la unidad estructural enlazante y estar unida a la proteína en una etapa de reacción individual (síntesis convergente). Alternativamente, el conjugado de proteína enlazante se puede hacer reaccionar con la unidad B de ramificación contenida en el EOC, estructura de soporte dendrímero o macrocíclica. En otra manifestación divergente del proceso, el conjugado de la unidad de ramificación enlazante de proteína se hace reaccionar con los EOC presintetizados, estructuras macrocíclicas o dendrímeros. En una metodología aún más divergentes, los dendrímeros, las estructuras macrocíclicas o los EOC se ensamblan de forma gradual en una extensión de la estructura de la unidad de ramificación enlazante de proteína central.

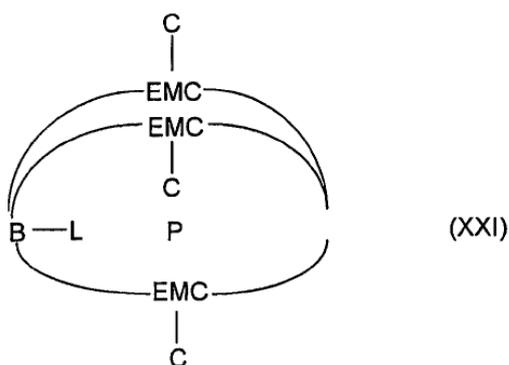
10 La encapsulación eficiente se demuestra por estudios de unión de anticuerpos. Los anticuerpos contra las proteínas terapéuticas son de alta afinidad, sondas de alta selectividad. El blindaje estérico de la proteína previene el acceso de los anticuerpos a los epítopos para el reconocimiento molecular. La unión del anticuerpo se puede medir convenientemente y con seguridad por métodos conocidos para la persona experimentada en la técnica, preferiblemente la inmunoprecipitación o, como se ejemplifica aquí, el barrido de resonancia de plasmón de superficie libre de marca. En un estudio que involucra diversos derivados de insulina que incluyen conjugados de insulina con diferentes reactivos de PEG, y tres anti-insulinas monoclonales, la prevención completa de reconocimiento de anticuerpos se logró sólo si la insulina se compleja con una estructura macrocíclica de acuerdo con la presente invención. Con el fin de eliminar cualquier propensión por la liberación de insulina, se emplearon respectivamente covalentes no escindibles de PEG o conjugados de EOC.

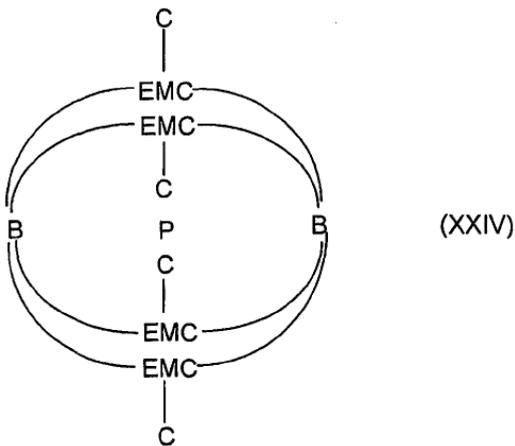
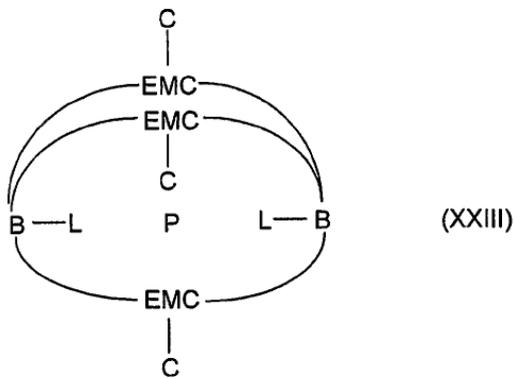
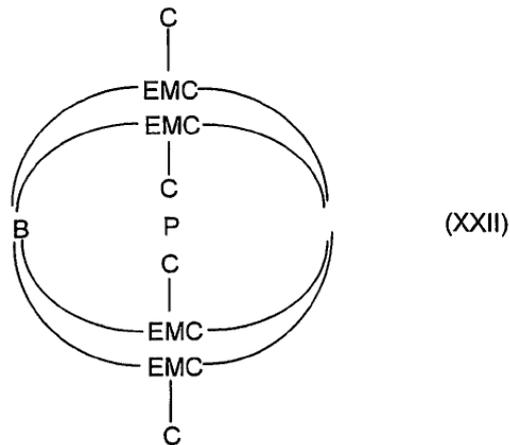
15 El EOC resultante se auto-organiza en un vacío que contiene biomolécula mediante plegamiento conformacional alrededor de la proteína. Esta disposición puede ser impulsada por restricciones estéricas o por reacciones químicas o de ambas.

25 Eventualmente, el enlazante se escinde, y se obtiene un complejo anfitrión-huésped. La escisión del enlazante puede realizarse in vitro para generar un complejo no covalente. Alternativamente, la escisión del enlazante puede ocurrir en un método de profármaco in vivo después de la administración. La cinética de disociación del complejo puede ser gobernada por hidrólisis enlazante o efusión de proteína a través de la matriz molecular del EOC, el dendrímero, o la estructura macrocíclica, o una combinación de ambos.

30 En la presencia de la proteína, el complejo se caracteriza por una estructura química de formación de cavidad bien definida y estequiometría precisa. Después de la liberación de proteínas, la molécula anfitriona puede adoptar diferentes conformaciones debido a su flexibilidad estructural, motivo por el cual la liberación de proteínas es esencialmente irreversible.

35 Las fórmulas (XXI) a (XXIV) de abajo muestran DPICs y MPICs en donde la unión entre el enlazante y la proteína se ha escindido, en dos casos, las huellas del enlazante se mantienen en el EOC, el dendrímero o la estructura macrocíclica, y en dos casos el enlazante ha sido totalmente eliminado.





Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles en un método para suministrar selectivamente una proteína a un objetivo, método que comprende

- proporcionar una proteína encapsulada;

5 - trayendo la proteína encapsulada en contacto con un líquido corporal que contiene el objetivo.

La proteína encapsulada puede ser formulado en un fármaco, opcionalmente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. El fármaco puede contener uno o más tipos de proteínas encapsuladas.

También se describen los fármacos que contiene al menos una proteína encapsulada de acuerdo con la presente invención y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 La presente invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos.

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Cromatogramas de exclusión por tamaño de: a) Hb nativa, b) compuesto **39**, c) compuesto **40** de mezcla de reacción, y d) MPIC 40 de Hemoglobina covalente purificada **40**. Las señales de UV se registraron a 280 nm.

5 Figura 2: Cromatogramas de exclusión por tamaño de a) compuesto **41**, b) compuesto **42** y c) Hb liberado a partir del compuesto **42**. Las señales de UV se registraron a 280 nm.

Figura 3: Cromatogramas de exclusión por tamaño de a) mezcla de reacción resultante de procedimiento de escisión enlazante realizado al compuesto **50a** b) MPIC **50a** de Insulina. Las señales de UV se registraron a 280 nm.

Figura 4: Liberación in vitro de insulina desde el MPIC **64** o **65** de insulina, respectivamente. Las cinéticas se determinaron por HPLC usando detección UV a 215 nm.

10 Figura 5: Liberación de insulina a partir de profármacos dendrímeros **90** (arriba) y **91** (abajo). La Insulina libre se cuantificó por HPLC usando detección UV a 215 nm.

Figura 6: Enlazamiento de insulina o conjugados de insulina para inmovilizar anticuerpos anti-insulina de murinos (clones 8E2, C7C9 y 7F8).

Ejemplos

15 Materiales y métodos

Materiales

Aminoácidos Fmoc, resina y TBTU fueron adquiridos de Novabiochem y son nombrados de acuerdo con el catálogo. Fmoc-Ado-OH fue adquirido de Neosystem (Francia) y Fmoc-PP-OH de Polypure (Noruega). Todos los productos químicos adicionales fueron adquiridos de Sigma Aldrich. La insulina humana fue adquirida de ICN Biomedicals (USA). Maleimida-PEG5k, Maleimida-PEG20k y Maleimida-PEG2x20k fueron obtenidos de Nektar.

20

Medio de reacción

La síntesis en fase sólida se realizó en resina de amida TentaGel TGR o Sieber con una carga de 0.2 mmol/g o 0.5 mmol/g, respectivamente. Las jeringas de polipropileno equipadas con fritas fueron utilizadas como recipientes de reacción.

25 Ciclo de acoplamiento estándar para aminoácidos protegidos por Fmoc

Para la eliminación del grupo protector Fmoc, la resina se agitó repetidamente (tres veces, 4 minutos cada uno) con piperidina/DBU/DMF 2/2/96 (v/v/v) y se lavó repetidamente (seis veces) con DMF. El acoplamiento de aminoácidos protegidos con Fmoc a la resina se realizó agitando la resina con 3 equivalentes (eq) de aminoácido Fmoc, 3 equivalentes de TBTU y 6 equivalentes de DIEA en DMF durante 60 minutos. Finalmente, la resina fue lavada repetidamente (cinco veces), con DMF.

30

Protocolo de escisión estándar para la resina TentaGel TGR

Al completarse la síntesis, la resina se lavó con DCM, se secó in vacuo y se trató con TFA/TES 95/5 (v/v). Después de la evaporación, los compuestos se purificaron mediante RP-HPLC preparativa (Waters 600).

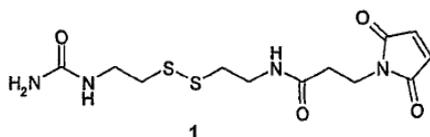
Análisis

35 La espectrometría de masas (MS) se realizó en un instrumento Waters ZQ 4000 ESI y los espectros fueron interpretados, si es necesario, mediante el software waters MaxEnt.

Las cromatografías de exclusión por tamaños se realizaron utilizando un sistema Waters 600 equipada con una columna Superdex 75 o Superdex 200 (Pharmacia) o manualmente utilizando una columna PD10 (Pharmacia)

I- Síntesis de enlazantes bifuncionales

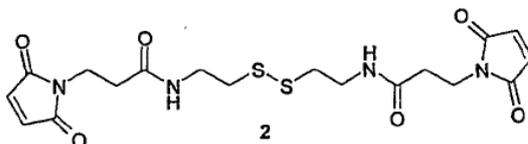
40 I-1) Síntesis del enlazante **1**



5 0.7 g de resina TentaGel TGR se empapó en THF y se incubaron durante 60 minutos con una solución de 4 ml de 4-nitrofenil éster del ácido clorofórmico 0.5 M y DIEA 0.5 M en THF, se lavó con THF y se secó. 4 ml de una suspensión de dihidrocloruro de cistamina 0.3 M y DIEA 0.7 M en DMSO se agregaron a la resina y se agitaron durante 90 minutos. Resina se lavó con DMSO y DMF, y se agregaron y se agitaron durante 60 minutos 3 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 3 equivalentes de DIC en DMF. Después de lavar la resina con DMF y DCM, el compuesto **1** se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **1**: 346 g/mol (346.4 g/mol)

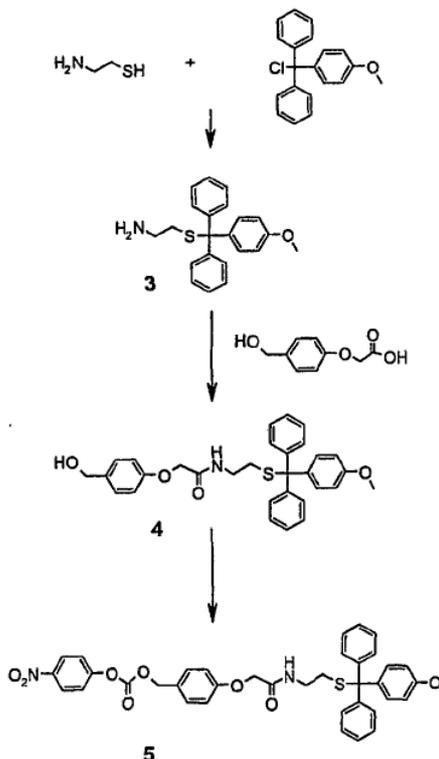
1-2) Síntesis del enlazante **2**



10 Se suspendió cistamina-dihidrocloruro en DMSO/DMF 1/1 (v/v) y se mezcló con 2 equivalentes de ácido maleimidopropiónico 2 equivalentes de DIC y 2 equivalentes de DIEA. La suspensión se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) y después de la acidificación con ácido fórmico, el compuesto **2** se purificó por RP-HPLC.

15 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **2**: 454 g/mol (454.5 g/mol)

I-3) Síntesis del enlazante **5**



Se disolvió clorhidrato de cisteamina en TFA y se agregaron 0.5 equivalentes de cloruro de Mmt. Después de 30 minutos, el TFA se eliminó bajo flujo de nitrógeno y el residuo se recogió en piridina. Después de agregar una solución de 0.2 M de Na₂CO₃, el producto se extrajo con éter y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la filtración, los solventes se eliminaron utilizando un evaporador rotatorio y el compuesto **3** se obtuvo como un aceite altamente viscoso.

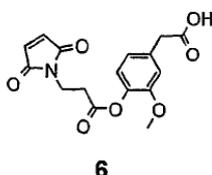
5

El compuesto **3** se hizo reaccionar con ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético (HMPA) y 1 equivalente de HOBT/DIC durante 30 minutos. Después de la purificación por RP-HPLC, el compuesto **4** se neutralizó por DIEA y se liofilizó.

El compuesto **4** se hizo reaccionar con 5 equivalentes de 4-nitrofenil éster del ácido clorofórmico y 10 equivalentes de DIEA en dioxano durante 2 horas. La purificación subsecuente por RP-HPLC dio el producto **5**.

10 MS [MNa]⁺ (MW+Na calculado) **5**: 700 g/mol (701 g/mol)

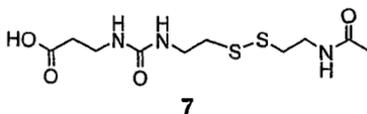
I-4) Síntesis del enlazante **6**



15 300 mg de ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético y 570 µl de DIEA se disolvieron en 5 ml de DCM y se agregaron a 0.5 g de resina de 2-clorotritil-cloruro (1.5 mmol/g). La suspensión se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y la resina se lavó con DCM. La resina se resuspendió en una solución de 190 mg de ácido 3-maleimidopropiónico, 333 mg de MSNT y 73 ml de N-metil imidazol en 3 µl de DCM y se agitó durante 1 hora. Después del lavado de la resina con DCM, la escisión se llevó a cabo por agitación de la resina durante 30 minutos en 10 ml de DCM/TFA 4/1 (v/v). El solvente se eliminó bajo flujo de nitrógeno y el compuesto **6** se purificó por RP-HPLC.

MS [MNa]⁺ (MW+Na calculado): 356 g/mol (356 g/mol)

20 I-5) Síntesis del enlazante **7**

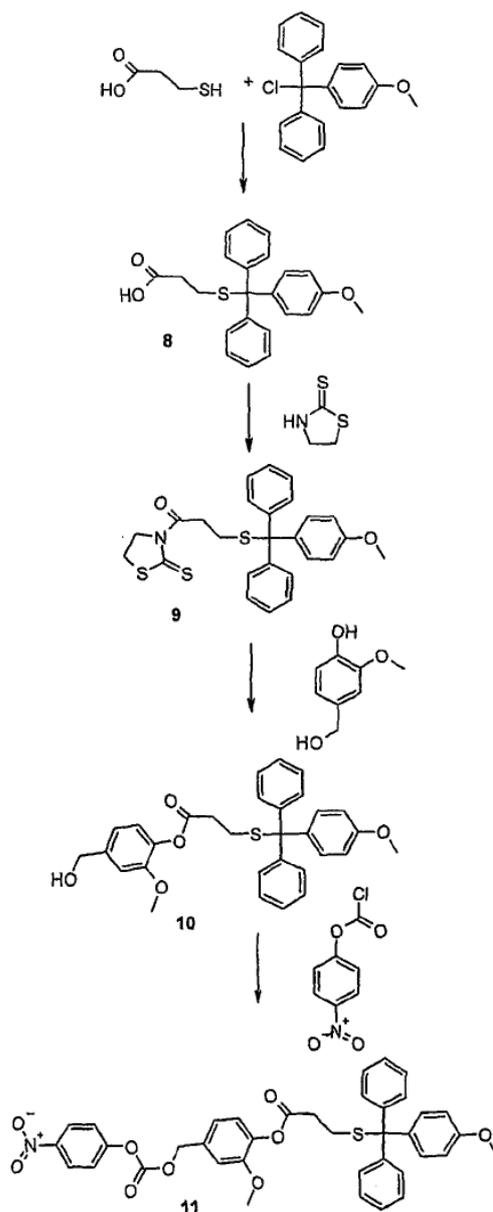


25 512 mg de ácido Fmoc-3-aminopropiónico y 570 µl DIEA se disolvieron en 5 ml de DCM y se agregaron a 0.5 g de resina de 2- clorotritil-cloruro (1.5 mmol/g). La suspensión se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y la resina se lavó con DCM. Después de la eliminación de Fmoc con DMF/DBU/piperidina 96/2/2 (v/v/v) y lavado de la resina con THF, se incubaron 4 ml de una solución de 4-nitrofenil éster del ácido clorofórmico 0.5 M y DIEA 0.5 M en THF con la resina durante 30 minutos. La resina se lavó con THF y DMF y se agitó durante 30 minutos con una solución de cistamina DMF 1 M y se lavó con DMF. Posteriormente, la resina se agitó durante 15 minutos en una solución de DMF/anhídrido acético/piridina 2/1/1 (v/v/v). Después de lavar la resina con DMF y DCM, el compuesto **7** se escindió por agitación durante 30 minutos en 10 ml de DCM/TFA 4/1 (v/v). Después de la evaporación del solvente bajo flujo de nitrógeno, el producto **7** se purificó por RP-HPLC.

30

MS (Peso Molecular calculado): 309 g/mol (309 g/mol)

I-6) Síntesis del enlazante **11**



5 Cloruro de Mmt (1 eq) y ácido mercaptopropiónico (1.1 eq) se recogieron en TFA y se incubaron durante 30 minutos. El TFA se eliminó bajo flujo de nitrógeno. El producto se disolvió en piridina, se diluyó en agua, se acidificó con ácido acético y se extrajo en éter. La fase de éter se separó y se secó sobre Na₂SO₄. El solvente se eliminó y el producto **8** se purificó por RP-HPLC.

El compuesto **8** y DMAP (2.5 eq) se disolvieron en DCM seco y 2 eq de EDC HCl se agregaron a 0°C. La solución se agitó durante 14 horas a temperatura ambiente y se lavó con regulador de acetato de sodio (0.25 M, pH 4.5). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se concentró y el compuesto **9** se purificó por cromatografía de columna de sílica gel utilizando éster de ácido heptano/acético (1/1) como fase móvil.

10 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **9**: 479 g/mol (479.7 g/mol)

El compuesto **9**, 4-hidroxi-3-metoxi bencilalcohol (7 equivalentes) y DMAP (7 equivalentes) se sometieron a reflujo en DCM durante 2 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Después de la neutralización con ácido acético, la solución se concentró y el compuesto **10** se purificó por RP-HPLC:

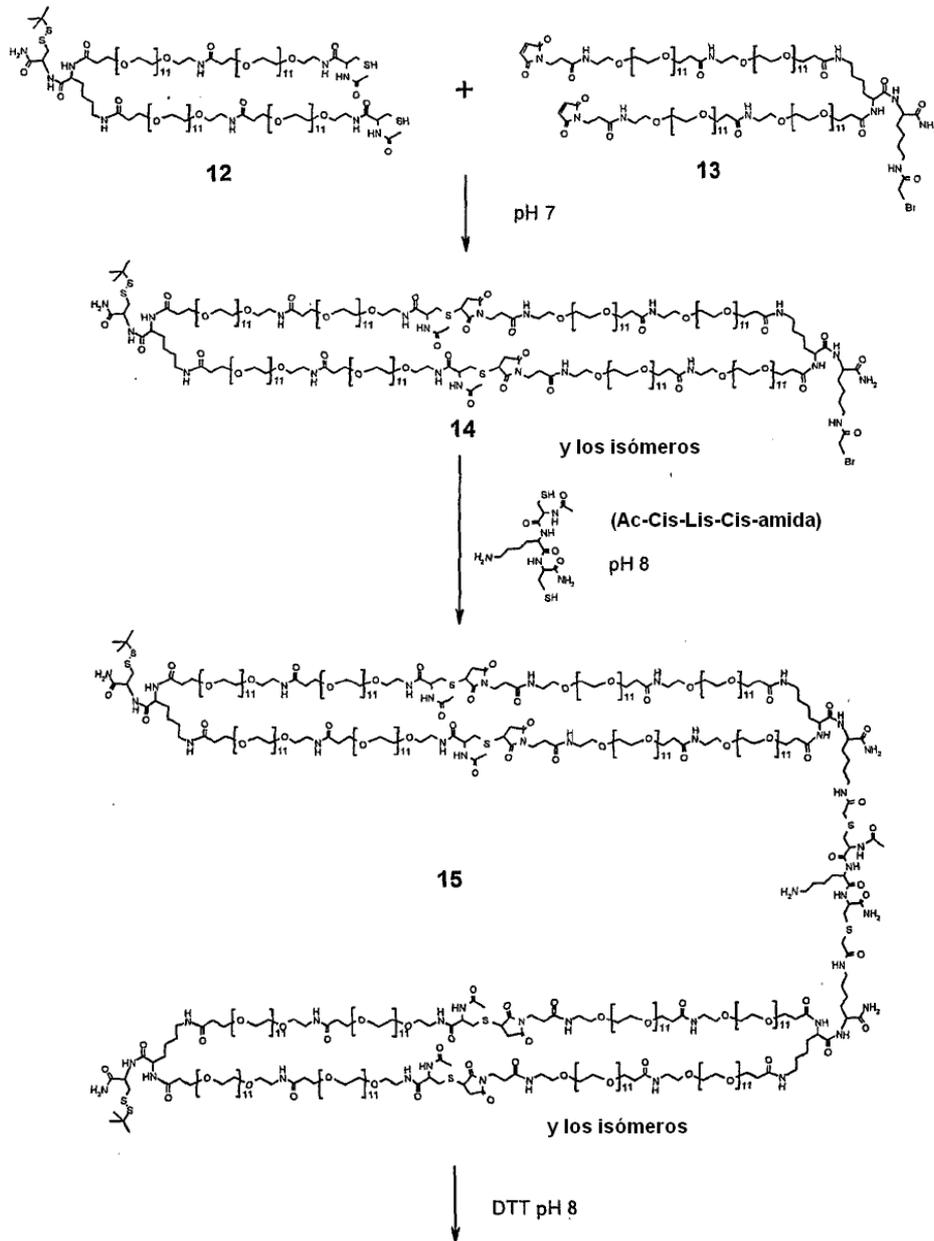
MS [M+Na]⁺ (MW+Na calculado) **10**: 537 g/mol (537,6 g/mol)

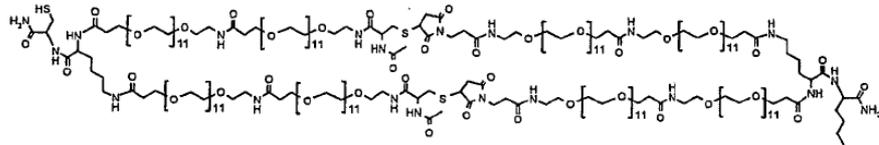
El compuesto **10**, 4-nitrofenil éster de ácido clorofórmico (10 equivalentes), y DIEA (20 equivalentes) se agitaron en dioxano seco durante 3 horas a 40°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de la adición de ácido acético (25 equivalentes) la mezcla se concentró y el compuesto **11** se purificó por RP-HPLC:

MS [M+Na]⁺ (MW+Na calculado) **11**: 702 g/mol (702.7 g/mol)

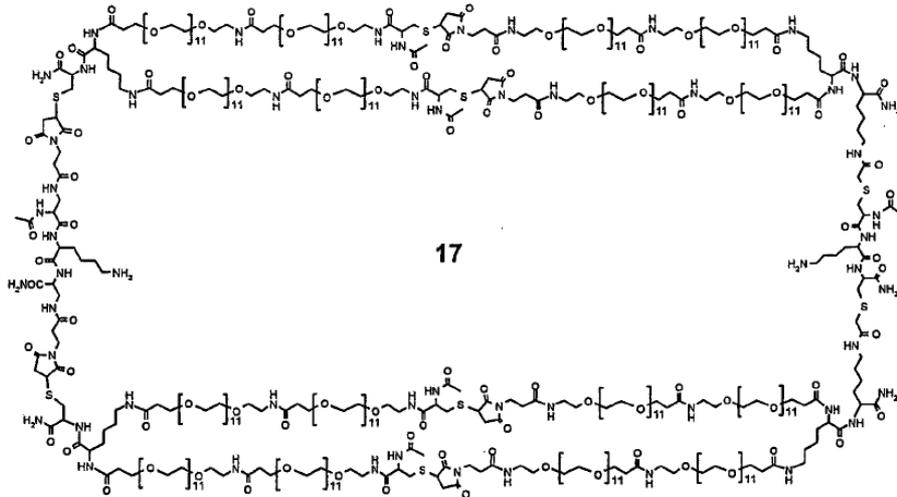
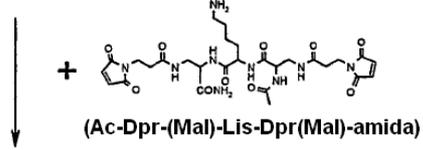
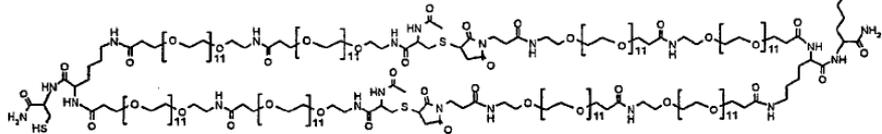
5 II - Síntesis de estructuras macrocíclicas bifuncionales

II-1) Síntesis de la estructura 18 macrocíclica de bis-maleimido



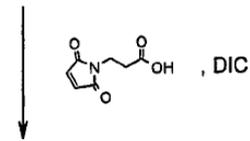


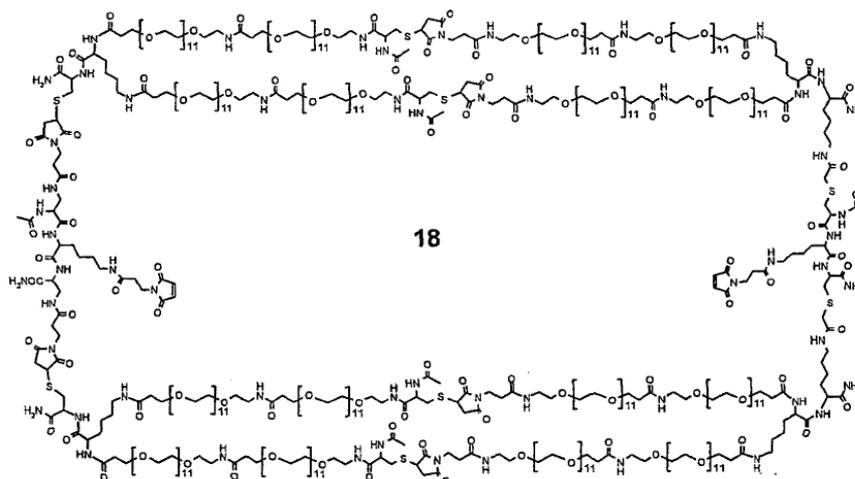
16



17

y los isómeros





y los isómeros

5 Empleando el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida, los aminoácidos Fmoc-Cys(S-tBu)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, dos unidades de Fmoc-PP-OH y Fmoc-Cys(Trt)-OH se acoplaron a la resina TGR. Después de la eliminación final de Fmoc, resina se trató con DMF/anhídrido acético/piridina 2/1/1 (v/v/v) durante 15 minutos. El compuesto **12** se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **12**: 3024.8 g/mol (3025.8 g/mol)

10 Empleando el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida, los aminoácidos Fmoc-Lys(MTT)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc) y dos unidades de Fmoc-PP-OH se acoplaron a la resina TGR. Después de la eliminación final de Fmoc, la resina se trató durante 30 min con 5 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 5 equivalentes de DIC en DMF. La eliminación del grupo protector Mtt se consigue mediante el lavado repetido de la resina con DCM/TFA 99/1 (v/v) hasta que la solución permaneció incolora. La resina se lavó con DCM, DIEA al 1% en DMF (brevemente) y DMF. Posteriormente, la resina se incubó durante 25 minutos con una solución de ácido bromoacético 0.5 M y DIC 0.5 M en DMF.

Después de la escisión, el compuesto **13** se purificó por RP-HPLC

15 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **13**: 3095.2 g/mol (3095.5 g/mol)

El compuesto **12** y el compuesto **13** se mezclaron a una relación equimolar y la concentración se ajustó a 35 μM mediante la adición de TFA acuoso al 0.1%. El pH de la solución se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.1 M (pH 7.5). Después de 20 minutos, el pH de la mezcla se llevó a 2.0 por adición de ácido fórmico, y el producto **14** se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

20 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **14**: 6120 g/mol (6121.1 g/mol).

Se mezclaron 2 eq del producto **14** con 1 eq de Ac-Cys-Lys-Cys-NH₂ (obtenido de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida) a una concentración de 350 μM y el pH de la solución se ajustó a 8.0 con regulador de fosfato. Después de 90 minutos, la reacción se detuvo por acidificación con ácido acético, y el producto **15** se purificó por RP-HPLC.

25 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **15**: 12472 g/mol (12474.2 g/mol)

Grupos protectores de S-tBu en el producto 15 se retiraron por reducción con DTT 100 μM en regulador de fosfato (pH 8.0). Después de 3 horas, el pH de la solución se ajustó a 2.0, y el compuesto **16** se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **16**: 12295 g/mol (12297.8 g/mol)

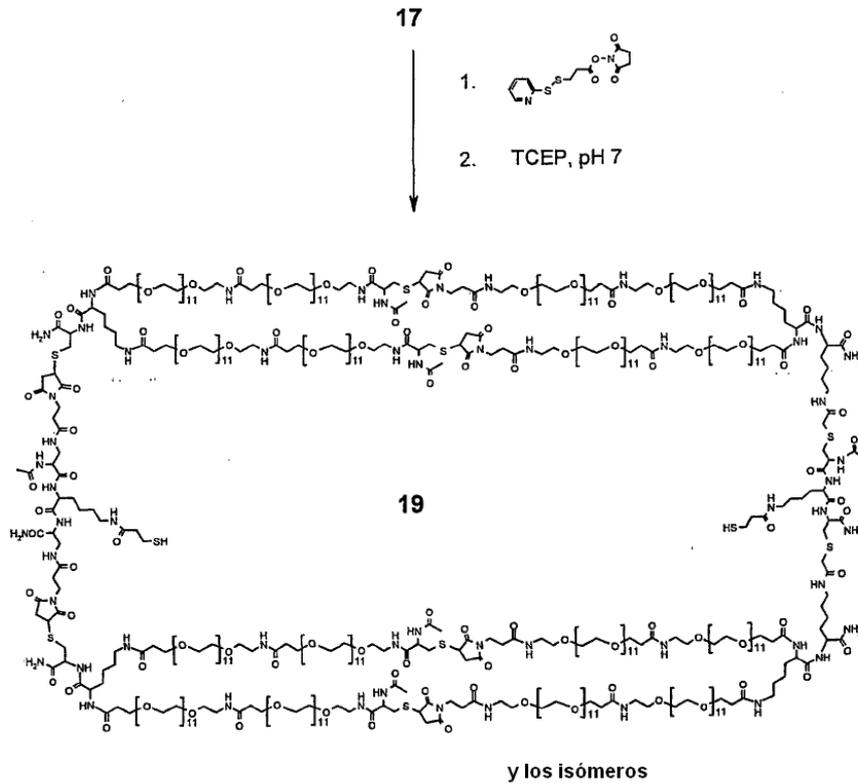
30 El compuesto **16** se mezcló con 1 equivalente de Ac-Dpr(Mal)-Lys-Dpr(Mal)-NH₂ (obtenido de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis de fase sólida) utilizando Fmoc-Dpr(ivDde)-OH) y las concentraciones se ajustaron por adición de agua a 15 μM . Subsecuentemente, el pH se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.1 M (pH 7.5) y se agitó durante 20 minutos. El pH de la solución fue llevado a 2.0 con ácido fórmico, y el compuesto **17** se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **17**: 12955 g/mol (12959.5 g/mol)

El compuesto **17** se disolvió en DMF y se agitó durante 30 minutos con una solución de 20 equivalentes de ácido maleimidopropiónico, 30 equivalentes de DIEA y 20 equivalentes de DIC en DMF. Subsecuentemente, la solución se acidificó con ácido fórmico, se diluyó con agua y el compuesto **18** se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **18**: 13257 g/mol (13261.7 g/mol)

5 II-2) Síntesis de la estructura **19** macrocíclica de bis-tiol

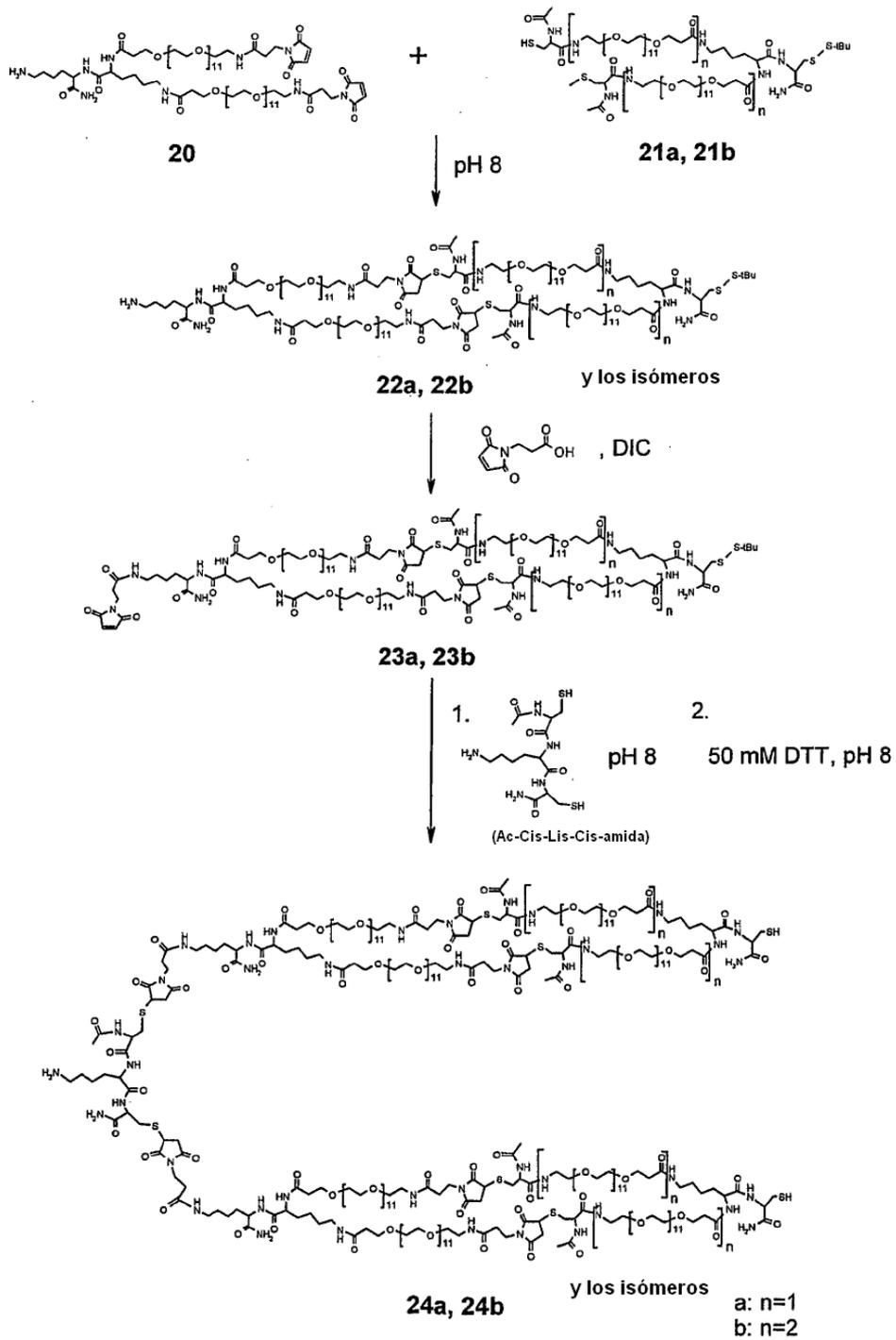


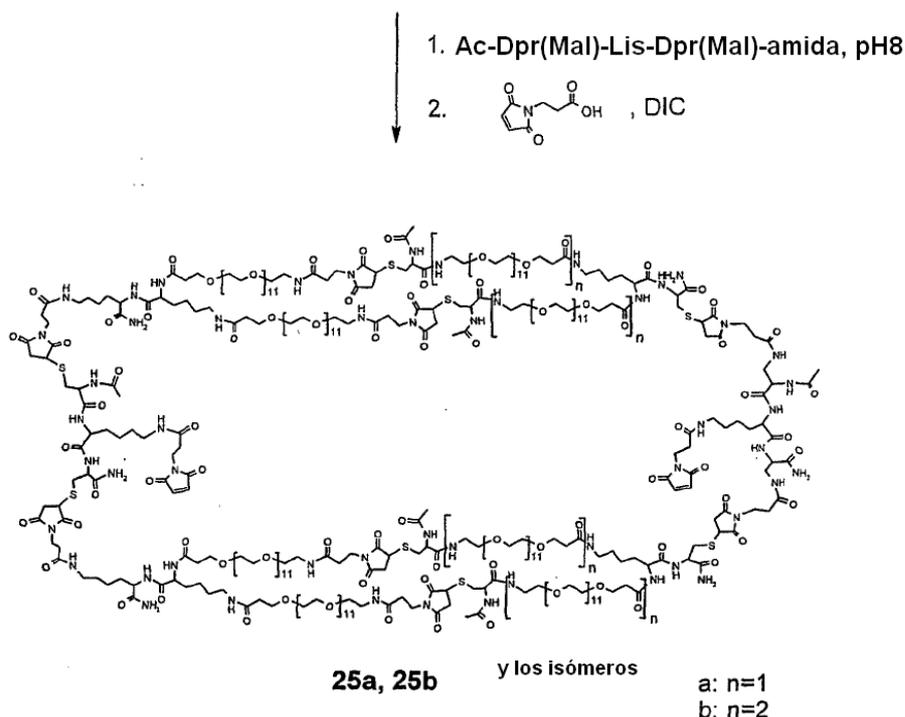
El compuesto **17** se ajustó a una concentración de 300 μM en regulador de fosfato 0.1 M (pH 7.0) y se agregaron 15 equivalentes de SPDP en DMSO. La suspensión resultante se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron TCEP 10 μM , y el cóctel se agitó durante otros 20 minutos a temperatura ambiente. El producto **19** se purificó por RP-HPLC.

10

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **19**: 13132 g/mol (13135,7 g/mol)

II-3) Síntesis de las estructuras **25a** y **25b** macrocíclicas de bis-maleimido





- 5 Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH y Fmoc-PP-OH se acoplaron de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida. Después del retiro de Fmoc, la resina se incubó con 6 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 6 equivalentes de DIC durante 30 minutos. Después de la escisión de la resina, el compuesto **20** se purificó por RP-HPLC.
- MS (Peso Molecular calculado) compuesto **20**: 774 g/mol (1775 g/mol)
- Los compuestos **21a** y **21b** fueron obtenidos por síntesis en fase sólida de acuerdo con el protocolo II-1) para el producto **12**.
- MS (Peso Molecular calculado) compuesto **21a**: 1825 g/mol (1826 g/mol)
- 10 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **21b**: 3024 g/mol (3026 g/mol)
- Las reacciones de los eductos **20** y **21a** al producto **22a**, y los eductos **20** y **21b** al producto **22b** se realizaron según el protocolo II-1) en analogía con la reacción de los compuestos **12** y **13** al producto **14**.
- MS (Peso Molecular calculado) compuesto **22a**: 3600 g/mol (3601 g/mol)
- MS (Peso Molecular calculado) compuesto **22b**: 4800 g/mol (4801 g/mol)
- 15 Los compuestos **22a** o **22b**, respectivamente, se disolvieron en DMF y el pH se ajustó a 8,0 con DIEA. Se agregaron 6 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 6 equivalentes de DIC y mezclas se incubaron durante 30 minutos para producir los compuestos **23a** y **23b**, respectivamente. La purificación se llevó a cabo por RP-HPLC.
- MS (Peso Molecular calculado) compuesto **23a**: 3752 g/mol (3753 g/mol)
- MS (Peso Molecular calculado) compuesto **23b**: 4950 g/mol (4952 g/mol)
- 20 2 equivalentes del compuesto **23a** o **23b** respectivamente se mezclaron con 1 equivalente Ac-Cys-Lys-Cys-amida (obtenido de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida). Después de ajustar el pH a 8.0 mediante la adición de regulador de fosfato 0.5 M (pH 8.0) la solución se agitó durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 equivalentes de DTT. Después de la liofilización, el residuo se recogió en acetonitrilo/50 μ M 1:1 (v/v) de regulador de fosfato (pH 8.0). La eliminación del grupo protector S-tBu por reducción con DTT 50 μ M durante 2 horas produjo los productos **24a** y **24b**, respectivamente. La purificación se realizó por RP-HPLC.
- 25

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **24a**: 7719 g/mol (7722 g/mol)

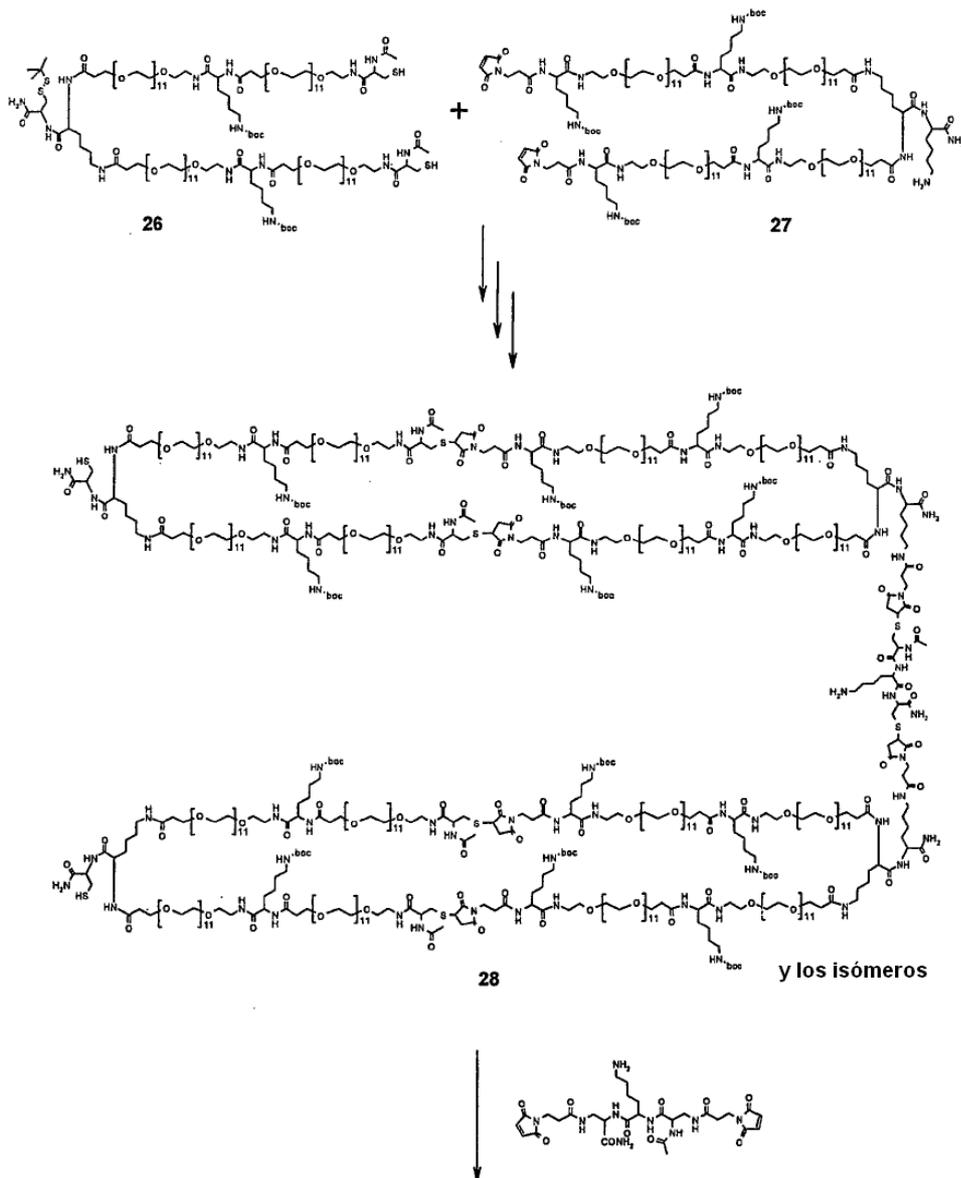
MS (Peso Molecular calculado) compuesto **24b**: 10120 g/mol (10121 g/mol)

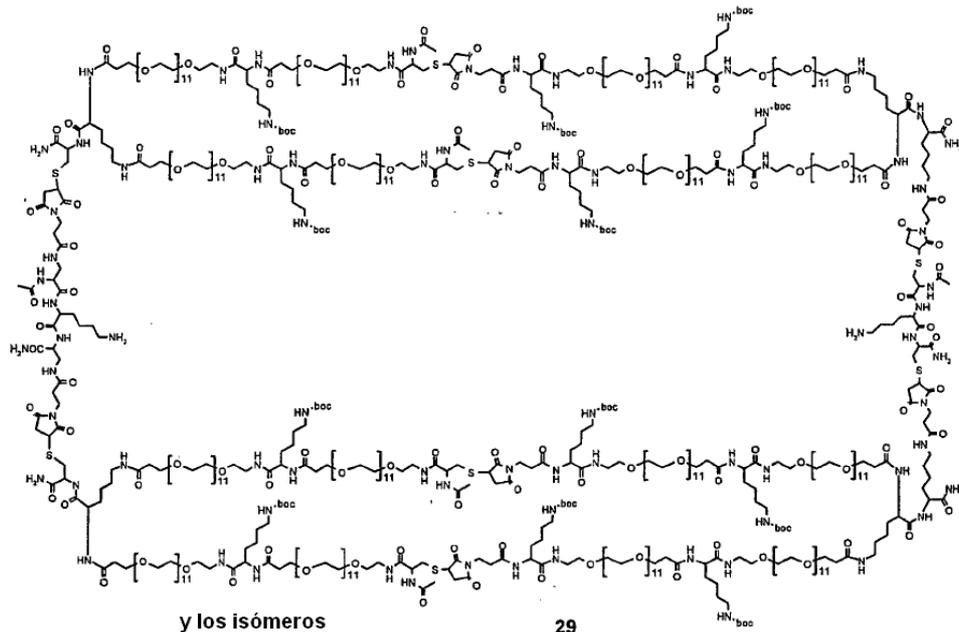
5 Los compuestos **24a** o **24b**, respectivamente, se sometieron a dos etapas de reacción adicionales para producir los compuestos **25a** o **25b**, respectivamente, de acuerdo con el protocolo II-1 y en analogía con la reacción de los compuestos **16** y **17** hasta el producto **18**.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **25a**: 8686 g/mol (8686 g/mol)

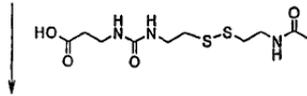
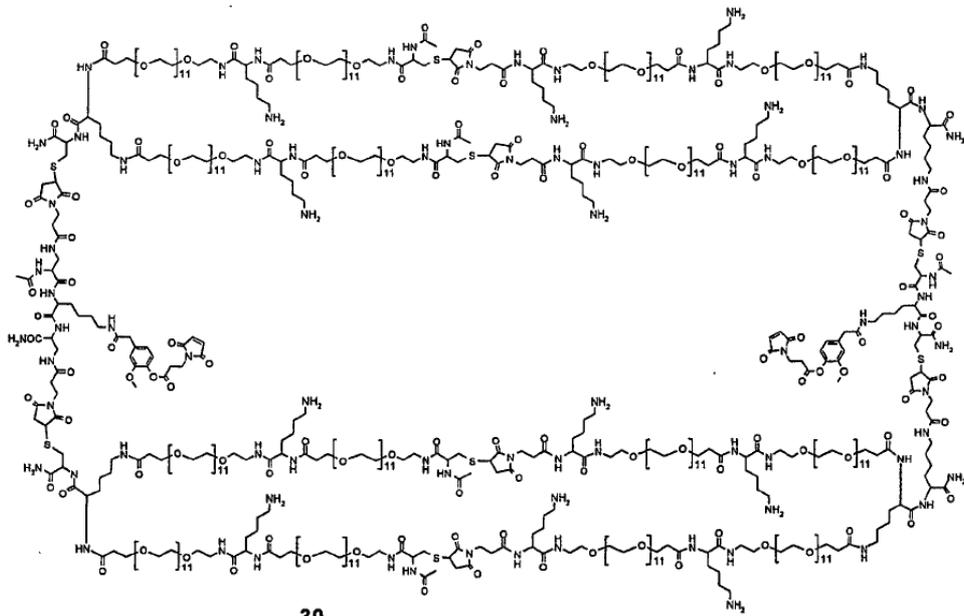
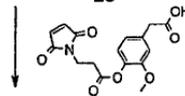
MS (Peso Molecular calculado) compuesto **25b**: 11085 g/mol (11085 g/mol)

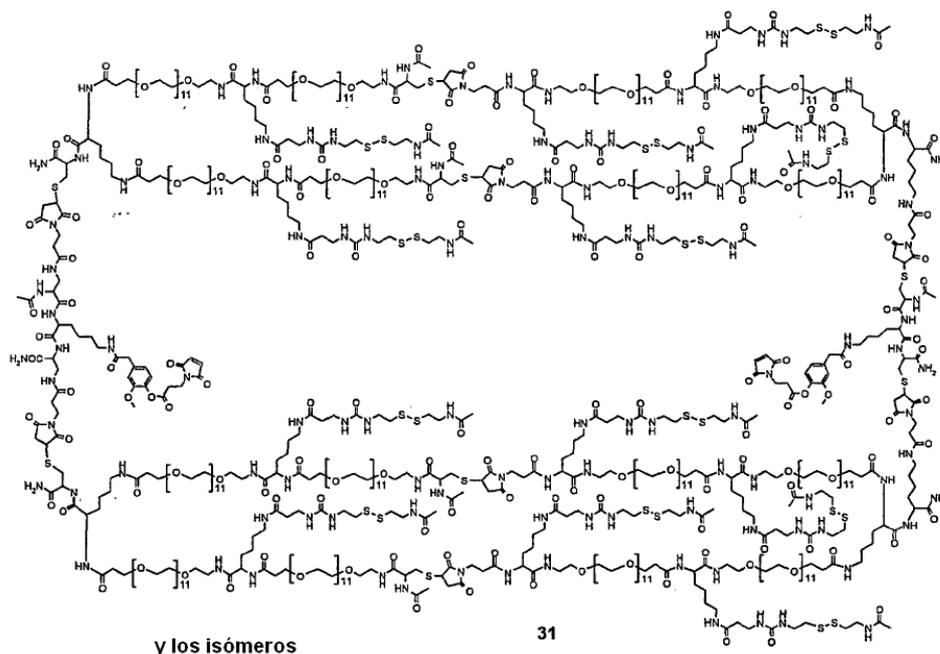
11-4) Síntesis de la estructura **31** macrocíclica de núcleo bis-maleimido





y los isómeros





- 5 El compuesto **26** se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Cys(StBu)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-PP-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-PP-OH y Fmoc-Cys(MMT) se acoplaron a la resina de amida Sieber. Después de la eliminación final de Fmoc, la resina se trató con una solución de DMF/anhídrido de ácido acético/piridina 2/1/1 (v/v/v) durante 15 minutos, se lavó con diclorometano y se secó in vacuo. La escisión se realizó mediante tratamiento repetido (15 veces) de la resina durante 2 minutos con una solución de diclorometano/TFA/TES 97/1/2 (v/v/v). El sobrenadante recogido se mezcló y se reguló con 1 equivalente de piridina (frente a TFA). Después de concentrar la mezcla, el compuesto **26** se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **26**: 3482 g/mol (3482 g/mol)

- 10 El compuesto **27** se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida. A partir de la resina de amida Sieber, la secuencia de aminoácidos Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Lys (Fmoc)-OH, Fmoc-PP-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-PP-OH y Fmoc-Lys (Boc)-OH fue ensamblada. Después de la remoción de Fmoc final, la resina se hizo reaccionar durante 30 minutos con 6 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 6 equivalentes de DIC, se lavó con diclorometano y se secó in vacuo. La escisión se llevó a cabo mediante tratamiento repetido (15 veces) de la resina durante 2 minutos con una solución de diclorometano/TFA/TES 97/1/2 (v/v/v). El sobrenadante recogido se mezcló y se reguló con 1 equivalente de piridina versus TFA. Después de concentrar la mezcla, el compuesto **27** se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **27**: 3888 g/mol (3887 g/mol)

- 20 El compuesto **28** se obtuvo a partir de los eductos **26** y **27** en analogía con la síntesis del producto **24** a partir de los eductos **20** y **21** de acuerdo con el Protocolo II-3.

La ciclización de los compuestos **28** a **29** se llevó a cabo en analogía con la ciclización del compuesto **16** de acuerdo con el Protocolo II-1.

Para el análisis, una muestra se trató con TFA para efectuar la eliminación de los grupos protectores Boc.

MS (MW calculado sin grupos Boc) **29**: 14717 g/mol (14720 g/mol)

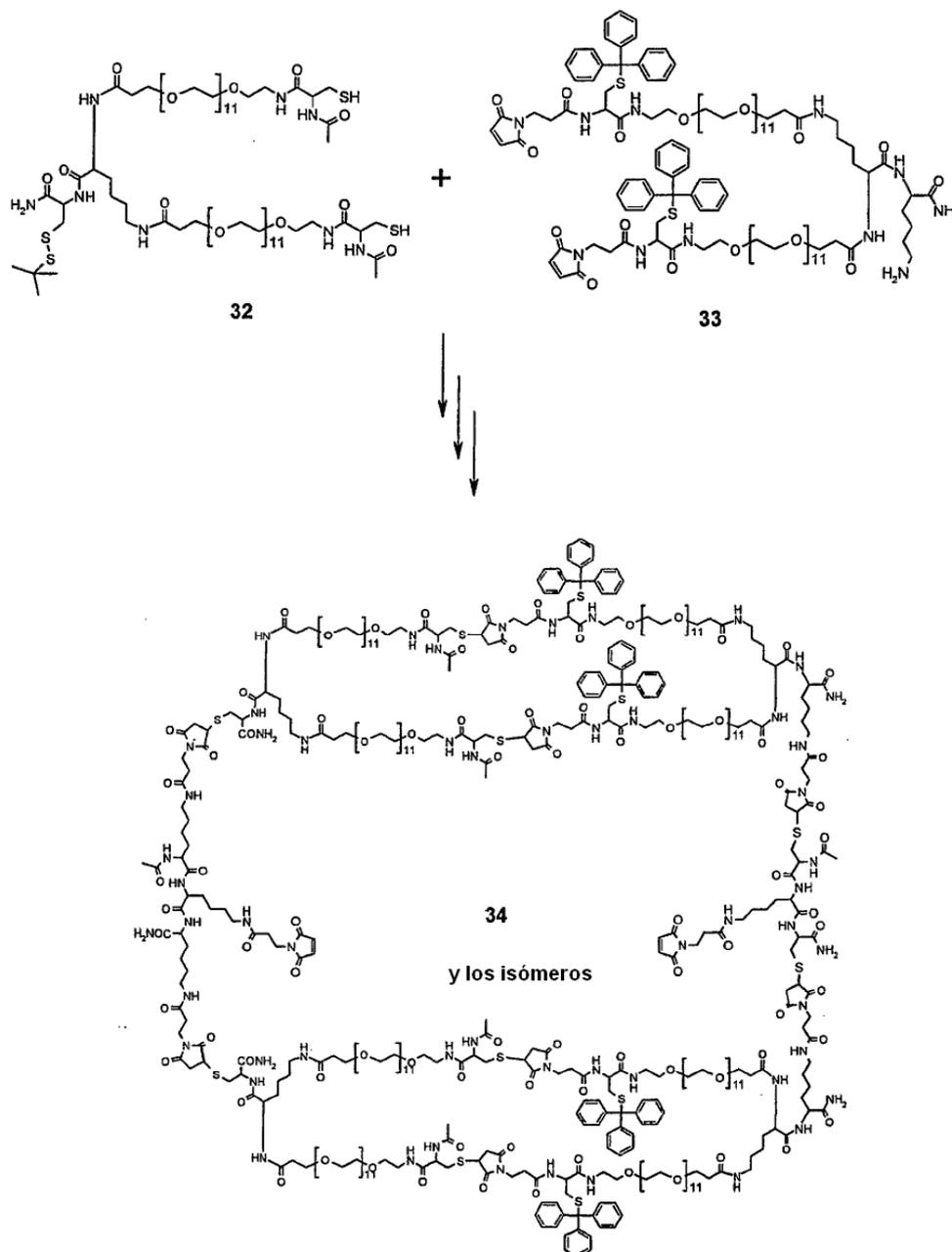
- 25 El compuesto **29** se hizo reaccionar con 10 equivalentes del compuesto **6** y 10 equivalentes de DIC en DMF durante 30 minutos. El producto se purificó por RP-HPLC y se liofilizó. Los grupos protector Boc se eliminaron mediante incubación durante 30 minutos en TFA/DCM 1/1 (v/v). El solvente se evaporó bajo flujo de nitrógeno. La extracción del residuo con agua y liofilización subsiguiente produjo el compuesto **30**.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto: 15352 g/mol (15360 g/mol)

El producto **31** se obtuvo por reacción de del compuesto **30** con 30 equivalentes del compuesto **7** y 30 equivalentes de DIC en DMF durante 45 minutos. El producto se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto: 18851 g/mol (18847 g/mol)

II-5) Síntesis de la estructura **34** macrocíclica de núcleo de bis-maleimido



5

10

El compuesto **32** se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Cys(StBu)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-PP-OH y Fmoc-Cys (Mmt)-OH se acoplaron a la resina de amida Sieber. Después de la remoción de Fmoc final, la resina se incubó con una solución de DMF/anhídrido de ácido acético/piridina 2/1/1 (v/v/v) durante 15 minutos, se lavó con diclorometano, y se secó in vacuo. La escisión de la resina se produjo mediante tratamiento con Diclorometano/TFA/TES 97/1/2 (v/v/v) durante 30 minutos. Después de la concentración, el producto **32** se purificó por RP-HPLC

El compuesto **33** se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Lys (Fmoc)-OH, Fmoc-PP-OH y Fmoc-Cys (Trt)-OH se acoplaron con la resina de amida

5 Sieber. Después de la remoción de Fmoc final, la resina se incubó con 6 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 6 equivalentes de DIC durante 30 minutos, se lavó con diclorometano, y se secó in vacuo. La escisión de la resina se produjo mediante tratamiento con 99/1/ (v/v) de diclorometano/TFA durante 15 minutos y el lavado repetido con DCM. Los eluatos reservados fueron regulados con 0.75 equivalentes de piridina (versus TFA) y el solvente se eliminó in vacuo. El producto se purificó por RP-HPLC.

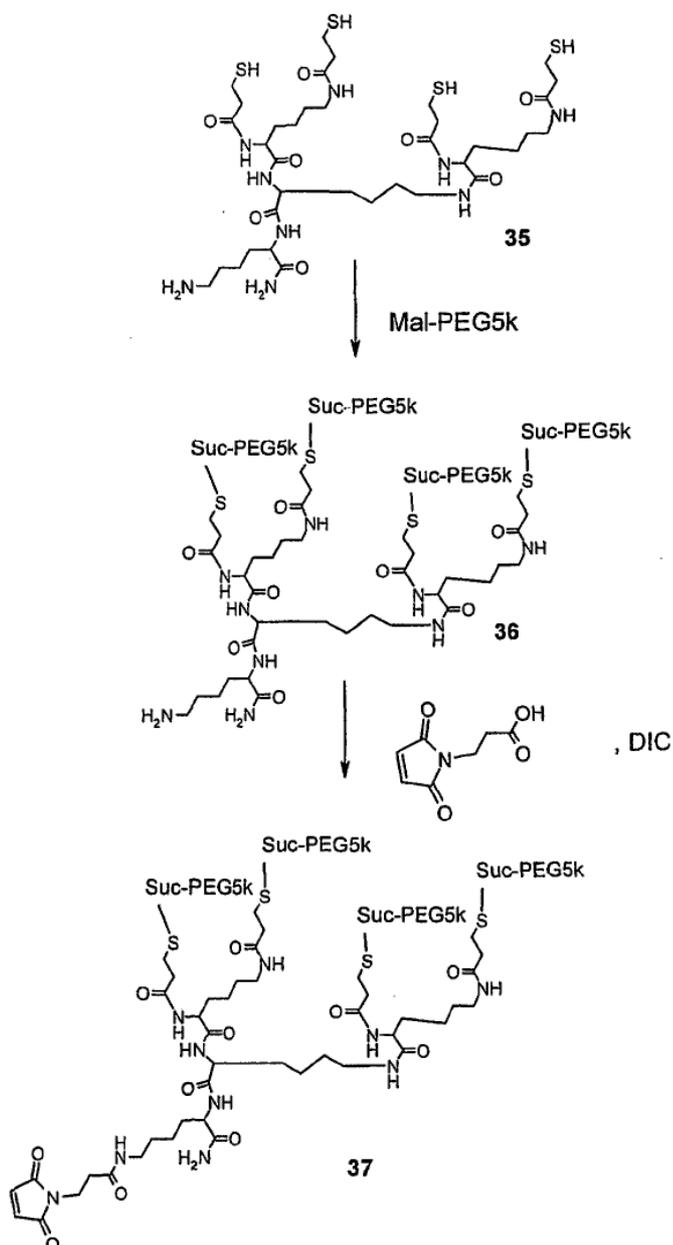
MS (Peso Molecular calculado) compuesto **33**: 2466 g/mol (2466 g/mol)

10 La síntesis del compuesto **34** se llevó a cabo en analogía con la ciclización del compuesto **25** de acuerdo con el Protocolo II-3, excepto por el uso de Ac-Lys (Mal)-Lys-Lys(Mal)-NH₂ en lugar de Ac-Dpr(Mal)-Lys-Dpr(Mal)-NH₂. Para el análisis, una muestra del compuesto **34** se trató con 48/50/2 (v/v/v) de TFA/DCM/TES durante 10 minutos para efectuar la eliminación de los grupos protectores de Trt.

MS (MW calculado sin grupos Trt) **34**: 9183 g/mol (9183 g/mol)

III - Síntesis de reactivos de cubrimiento de proteóforo

IH-1) Síntesis de Mal-PEG4x5k (37)



El compuesto **35** se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH y Fmoc-Lys(Fmoc)-OH se acoplaron a la resina TGR, y el ácido Mmt-3-mercaptopropiónico (**8**) se utilizó como el bloque de construcción final. Después de la escisión de la resina, el producto se purificó por RP-HPLC.

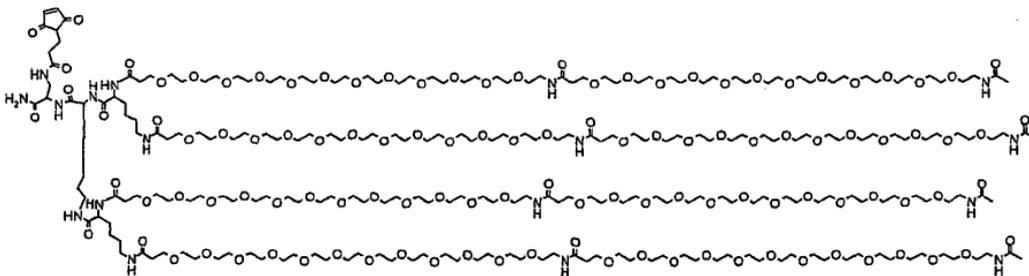
5 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **35**: 881.5 g/mol (882 g/mol)

Se disolvieron el compuesto **35** y 4.1 equivalentes de Maleimida-PEG5k en regulador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.0) y se agitó durante 30 minutos. El exceso de Maleimida-PEG5k se hizo reaccionar con mercaptoetanol y el producto **36** se purificó por RPHPLC y se liofilizó.

10 El compuesto **36** se recogió en DMF, se agregaron 6 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 6 equivalentes de DIC en DMF y la mezcla se agitó durante 30 minutos. El producto se purificó por RP-HPLC y se caracterizó por cromatografía de exclusión por tamaño (columna Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min)

SEC (tiempo de retención) compuesto **36**: 16 min

III-2) Síntesis de Mal-PP4x1.25k (38)



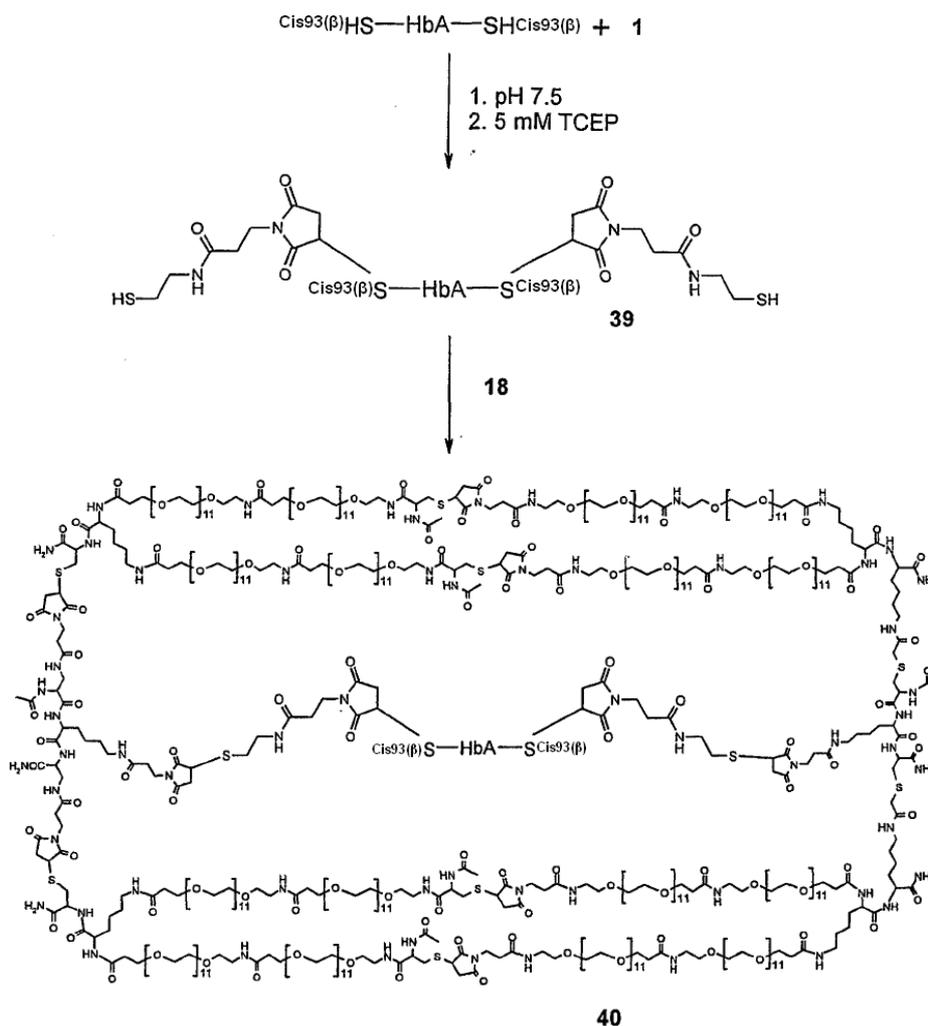
38

15 El compuesto **38** se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar para la síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Dpr(ivDde)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys (Fmoc)-OH y dos unidades de Fmoc-PP-OH se acoplaron a la resina de TGR. Después de la eliminación de Fmoc final, la resina se incubó con una solución de DMF/anhidrido de ácido acético/piridina 2/1/1 (v/v/v) durante 15 minutos. La eliminación del grupo protector ivDde se produjo agitando repetidamente (tres veces) la resina durante 5 minutos con DMF/hidracina 98/2 (v/v). La resina se lavó con DMF y se trató durante 30 minutos con una solución de 6 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 6 equivalentes de DIC en DMF.

Después de la escisión de la resina el producto se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **38**: 5600 g/mol (5603 g/mol)

IV –Síntesis de un MPIC de Hemoglobina



IV-1) Modificación de Hb Cys93(β) con el enlazante **1**

La hemoglobina humana (Hb) se ajustó a una concentración de 10 mg/ml en regulador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.5), se agregaron 5 equivalentes del compuesto **1** y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 5 El exceso del compuesto **1** se retiró por cromatografía de exclusión por tamaño (columna PD10).

MS subunidad alfa, sin modificar (Peso Molecular calculado) compuesto: 15121 g/mol (15127 g/mol)

MS subunidad beta (Peso Molecular calculado) compuesto: 16208 g/mol (16214 g/mol)

La escisión de la unión disulfuro del enlazador conjugado se llevó a cabo por reducción de la hemoglobina humana modificada durante 30 minutos en TCEP 5 μM (pH 7.5). El producto **39** se purificó mediante SEC (Superdex 200).

10 MS subunidad alfa, sin modificar (Peso Molecular calculado) compuesto **39**: **15121** g/mol (15127 g/mol)

MS subunidad beta (Peso Molecular calculado) compuesto **39**: 16090 g/mol (16096 g/mol)

IV-2) Conjugación de la estructura **18** macrocíclica de bis-maleimido

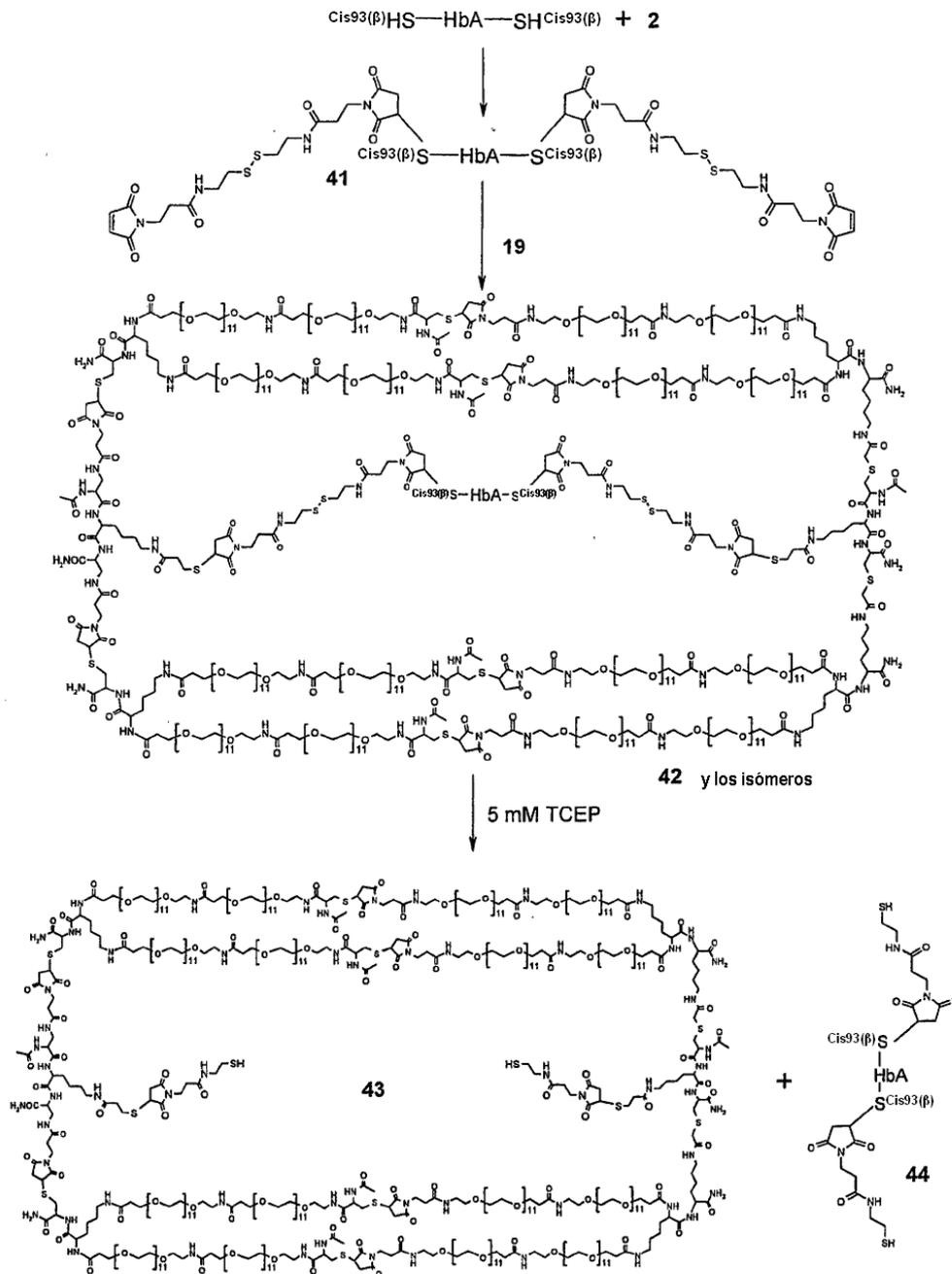
El compuesto **39** se ajustó a una concentración de 20 μM en regulador de fosfato 0.1 M (pH 7.5) y se agregaron 2 equivalentes del compuesto **18**. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, el MPIC **40** de Hb resultante se purificó mediante SEC (columna Superdex 200).
 15

La Figura 1 muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño de hemoglobina humana nativa, compuesto **39**, la mezcla de reacción del compuesto **39** y la hemoglobina humana, y el producto purificado **40**

MS subunidad alfa, sin modificar (Peso Molecular calculado) compuesto **40**: 15122 g/mol (15127 g/mol)

MS subunidades beta entrecruzadas (Peso Molecular calculado) compuesto **40**: 45432 g/mol (45454 g/mol)

V - Síntesis de un MPIC de Hemoglobina escindible



5 V-1) Modificación de la Hb Cys93(β) con el enlazante **2**

La Hb se ajustó a una concentración de 10 mg/ml en regulador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.5). Después de la adición de 10 equivalentes **2** la solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El conjugado de Hb **41** conjugado se purificó mediante SEC (Superdex 200).

MS subunidad alfa, sin modificar (Peso Molecular calculado) compuesto **41**: 15123 g/mol (15127 g/mol)

10 MS subunidad beta (Peso Molecular calculado) compuesto **41**: 16318 g/mol (16322 g/mol)

V-2) Conjugación de la estructura **19** macrocíclica de bis-tiol

La concentración del compuesto **41** se ajustó a 20 μ M en regulador de fosfato 0.1 M (pH 7.5). Después de la adición de 2 equivalentes del compuesto **19**, la solución se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. El MPIC **42** de hemoglobina se purificó mediante SEC (Superdex 200).

5 MS subunidad alfa (Peso Molecular calculado) compuesto **42**: 15125 g/mol (15127 g/mol)

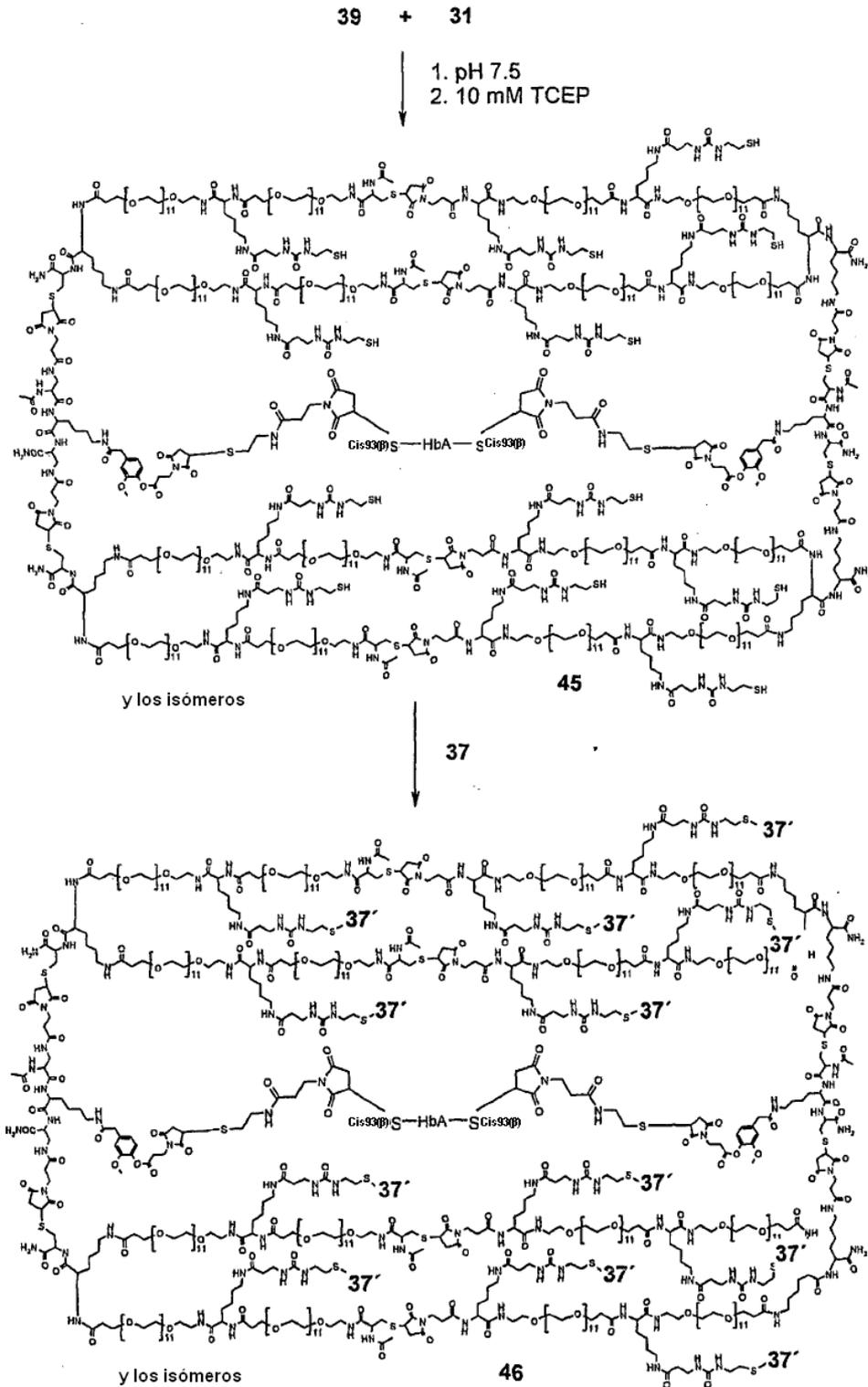
MS subunidad beta (Peso Molecular calculado) compuesto **42**: 45776 g/mol (45780 g/mol)

Con el fin de comprobar la reversibilidad de la conjugación, el producto **42** se trató con TCEP 5 μ M en regulador de fosfato 0.1 M (pH 7.5). La liberación cuantitativa de Hb a partir de MPIC se evaluó por LC/MS.

MS subunidad beta (Peso Molecular calculado) compuesto **42**: 16091 g/mol (16096 g/mol)

10 La figura 2 muestra cromatogramas de exclusión por tamaño de los productos **41**, **42** y de la Hb (compuesto **44**) liberados del producto **42**

VI - Síntesis de un MPIC de hemoglobina con reactivos de cubrimiento



El elemento estructural **37'** representa el producto que contiene succinimidilo de la adición de Michael del tiol proteóforo vecino al grupo maleimido del compuesto **37**.

VI-1) Conjugación del compuesto **39** con la estructura **31** macrocíclica de bis-maleimida

- 5 La conjugación del compuesto **39** con el compuesto **31** se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo IV-2 en analogía con la preparación del compuesto **40**. Unidades estructurales de disulfuro asociadas con el proteóforo se redujeron mediante incubación en TCEP 10 μ M (pH 7.5) durante 30 minutos.

El producto **45** se purificó mediante SEC (columna Superdex 200).

VI-2) Modificación del MPIC de Hemoglobina con Mal-PEG4x5k (compuesto 37)

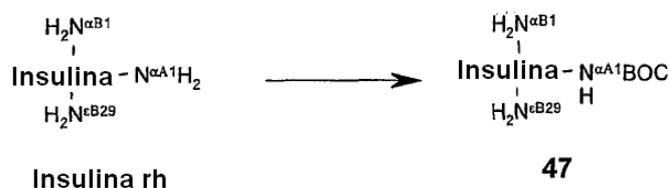
El compuesto **45** se hizo reaccionar con 30 equivalentes del compuesto **37** durante 1 hora a temperatura ambiente en regulador de fosfato de sodio 50 μM (pH 7.0) y se purificó mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min).

5

SEC (tiempo de retención) compuesto **46**: 11.2 min

VII – Síntesis de un MPIC de insulina

VII-1) Síntesis del compuesto **47** de $\text{N}^{\alpha\text{A}1}$ -Boc-insulina



10 La insulina se disolvió en DMSO y se hizo reaccionar con 1.1 equivalentes de $(\text{t-BOC})_2\text{O}$ durante 60 minutos para producir el compuesto **47** de $\text{N}^{\alpha\text{A}1}$ -Boc-insulina

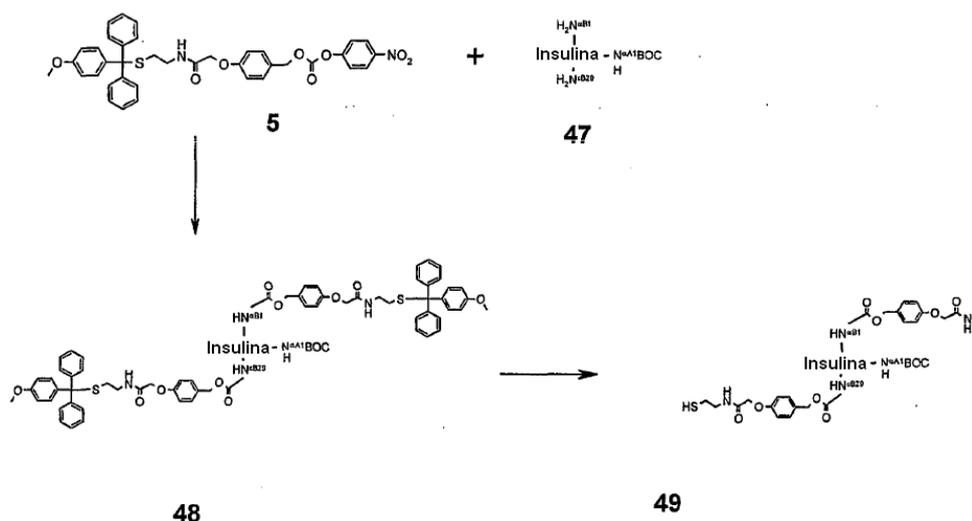
La insulina se disolvió en DMSO y se hizo reaccionar con 1.1 equivalentes de $(\text{t-BOC})_2\text{O}$ durante 60 minutos.

La purificación se logró mediante RP-HPLC. La digestión enzimática del compuesto **47** con endo-Gluc y la caracterización subsecuente de los fragmentos resultantes por LCMS confirmó la modificación regioselectiva del terminal amino de la cadena A de insulina.

15

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **47**: 5907 g/mol (5907 g/mol)

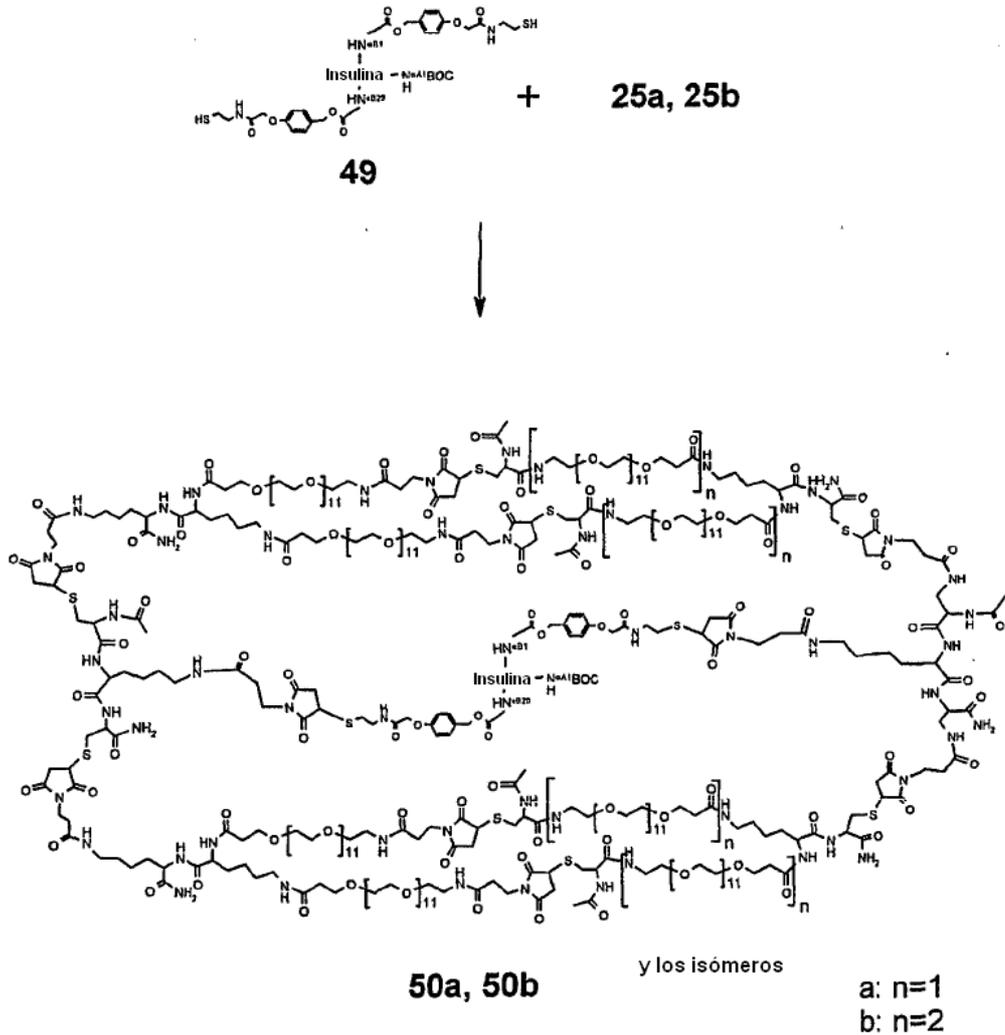
VII-2) Síntesis del compuesto **49** de $\text{N}^{\alpha\text{A}1}$ -Boc, $\text{N}^{\alpha\text{B}1}$, $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -bis-(tiolenlazante)-insulina



20 El compuesto **47** se disolvió en DMSO y se incubó con 10 equivalentes del enlazante activado del compuesto **5** durante 5 horas a pH 8-9. El pH se ajustó mediante la adición de DIEA, si es necesario. La subsecuente purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto **48** de $\text{N}^{\alpha\text{A}1}$ -Boc, $\text{N}^{\alpha\text{B}1}$, $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -bis-(MMT-tiolenlazante)-insulina. Después de la liofilización, el grupo protector MMT se eliminó por incubación durante 30 minutos con TFA/DCM 1/99 (v/v) y el producto **49** $\text{N}^{\alpha\text{A}1}$ -Boc, $\text{N}^{\alpha\text{B}1}$, $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -bis-(tiolenlazante)-insulina se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **49**: 6450 g/mol (6442 g/mol)

VII-3) Síntesis de los compuestos 50a y 50b conjugados de insulina de estructura macrocíclica

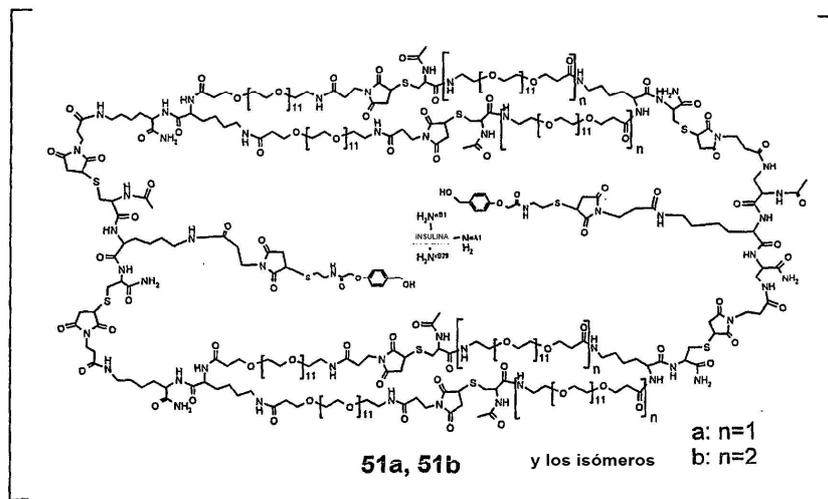
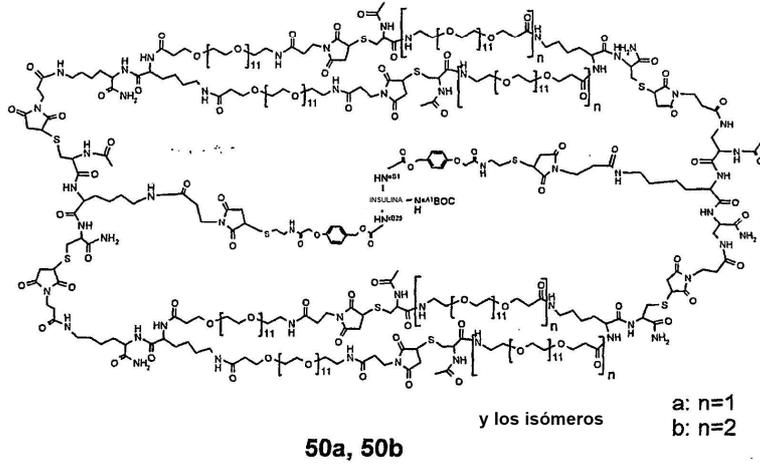


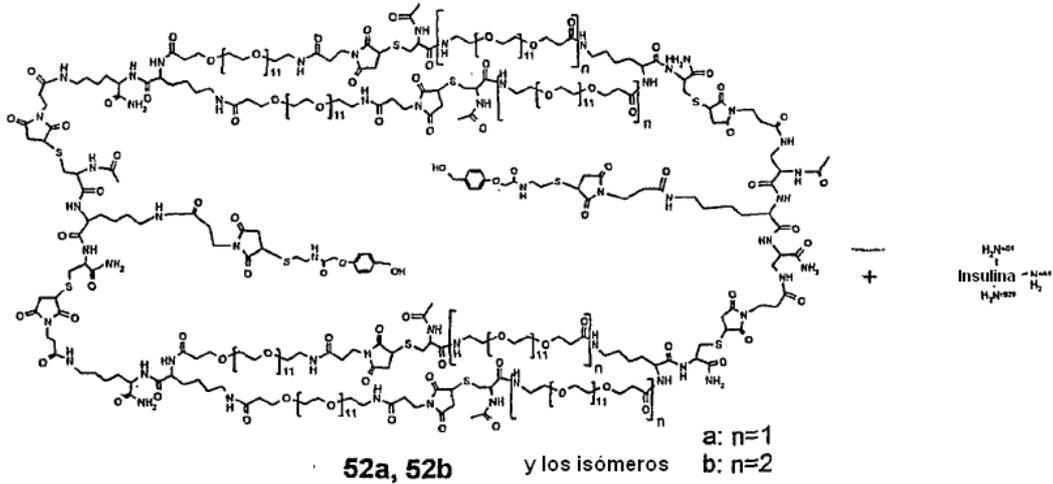
5 Una solución del compuesto **49** (20 μ M) en regulador de fosfato 25 mM (pH 7.5)/acetonitrilo 3/1 (v/v) se hizo reaccionar con 1.1 equivalentes del compuesto **25a** o **25b**, respectivamente, durante 15 minutos para producir el compuesto **50a** o **50b**, respectivamente. La purificación se logró mediante RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **50a**: 15128 g/mol (15128 g/mol)

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **50b**: 17527 g/mol (17527 g/mol)

VII-4) Liberación de insulina a partir del MPIC 50a/50b de insulina





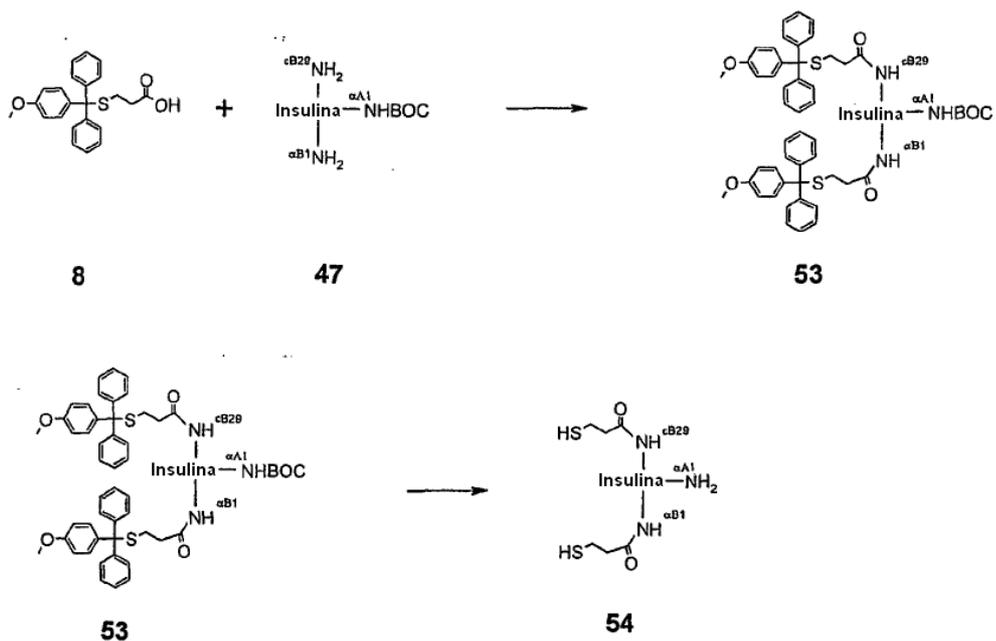
La insulina fue liberado de los compuestos **50a** o **50b** conjugados, respectivamente, por escisión de las unidades estructurales enlazantes por incubación con DCM/TFA 1:1 (v/v) durante 15 minutos. Estas condiciones también efectúan la eliminación del grupo de protección Boc en el grupo α -Amino de la cadena A de insulina.

- 5 Los eductos **50a** y **50b**, las mezclas de escisión enlazantes que contienen insulina liberada y los restantes compuestos **52a** y **52b** de estructuras macrocíclicas se caracterizaron mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min).

10 La Figura 3 muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño del compuesto **50a** y productos del proceso de escisión enlazante. Se detectaron tres picos y se identificaron mediante análisis de LCMS. El pico a los 23.2 minutos en el tiempo de retención contiene insulina, el pico a los 21.6 minutos es el EOC **52a**. El pico a los 20.7 minutos del tiempo de retención corresponde al monoconjugado de EOC-insulina.

VIII – Síntesis de los MPIC **57**, **58** y **59** de insulina

VIII-1) Síntesis del compuesto **54** de $N^{\alpha B1}$, $N^{\epsilon B29}$ -bis-(mercaptopropionilo)-insulina



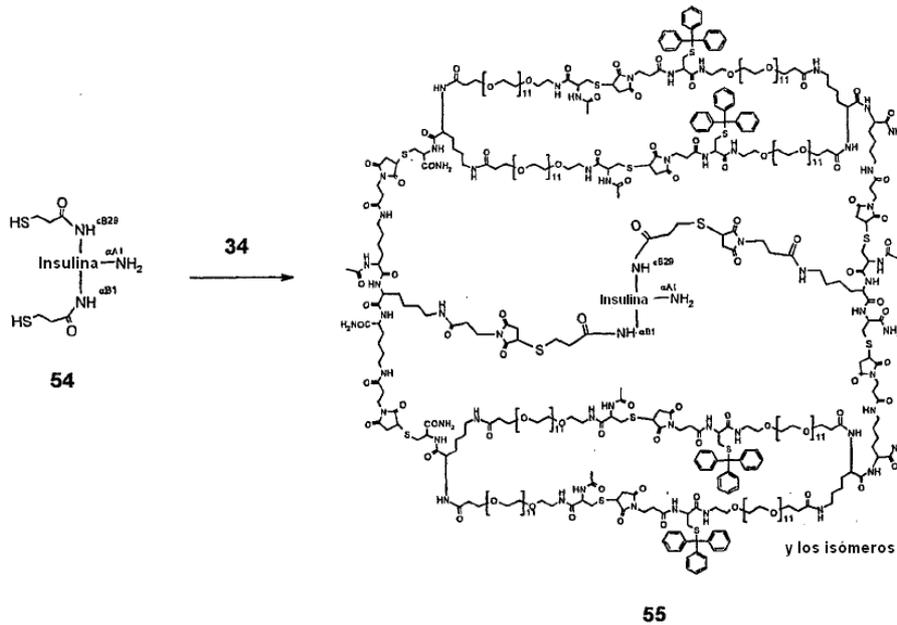
Se preincubaron 240 µl de una solución que contiene DIC 0.64 M, compuesto **8** 0.56 M y N-hidroxisuccinimida en DMF 0.29 M durante 30 minutos. Se disolvieron 15 mg del compuesto **47** en 1 ml de DMSO/agua 1/1 (v/v) y se mezcló con DIEA 40 µl. Las mezclas se combinaron y se incubaron durante 1 hora. El compuesto **53** se purificó por RP-HPLC.

5 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **53**: 6630 g/mol (6627 g/mol)

Después de la liofilización, los grupos de protección Boc y MMT se eliminaron mediante incubación con TES/TFA/DCM 2/48/50 (v/v/v) durante 30 minutos. El producto **54** se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **54**: 5981 g/mol (5983 g/mol)

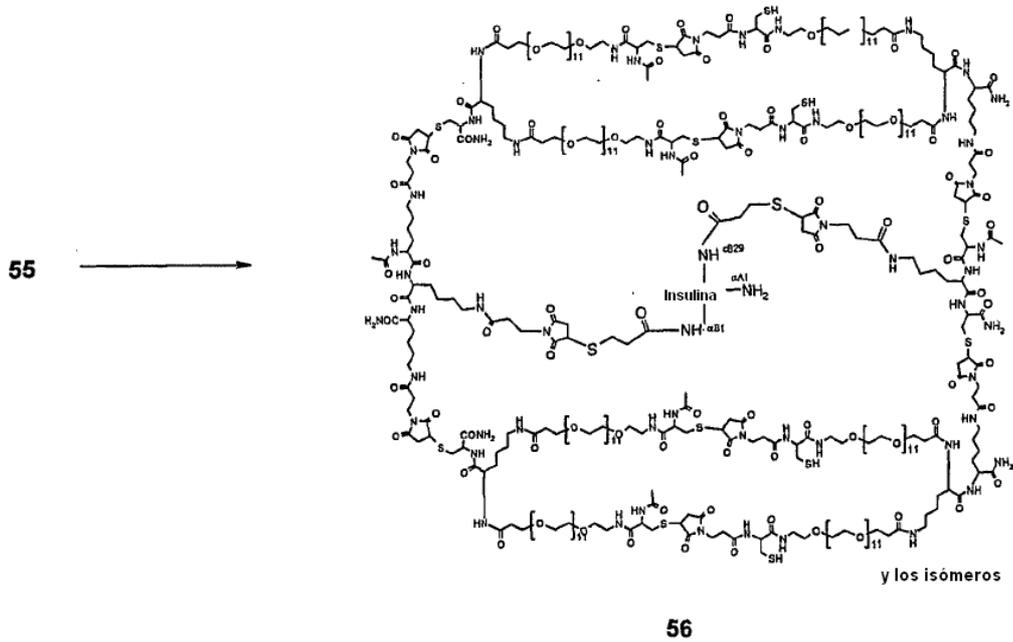
VIII-2) Síntesis de MPIC **56** de insulina



10

Se mezclaron 150 µl de una solución 3 mM del compuesto **54** en agua/acetonitrilo 1/1 (v/v) con 270 µl de una solución 1.5 mM de la estructura macrocíclica **34** en agua/acetonitrilo 1/1 (v/v) y se diluyeron con agua/acetonitrilo 20/80 (v/v) hasta un volumen total de 22 ml. Subsecuentemente, el pH se ajustó a 7.5 mediante la adición de regulador de fosfato 0.5 M pH 8.0.

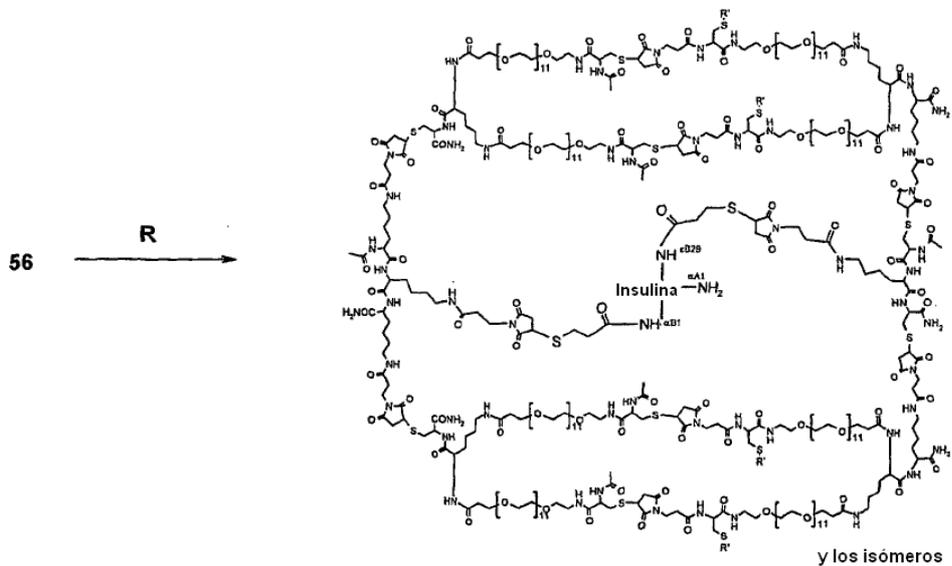
15 Después de 15 minutos de incubación, el compuesto **55** se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.



La eliminación de los grupos protectores Trt a partir del compuesto **55** se llevó a cabo mediante incubación durante 30 minutos en TES/TFA/DCM 2/58/40 (v/v/v). Un procedimiento de purificación de dos etapas empleando RP-HPLC y SEC (Superdex 75, rata de flujo: 0.75 ml/min) produjo el producto **56**.

5 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **56**: 15167 g/mol (15166 g/mol)

VIII-3) Síntesis de los MPIC 57, 58 y 59 de insulina modificada



57: R = N-Etil-Maleimida

58: R = 38

59: R = 37

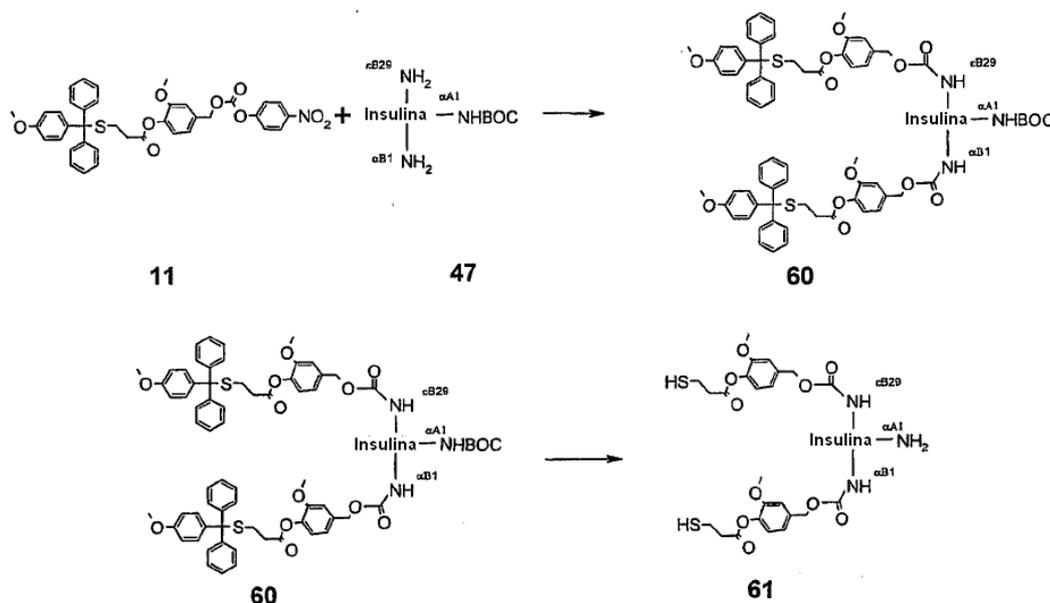
El elemento estructural R representa el producto que contiene succinimidil de la adición de Michel del tiol proteóforo cercano del grupo maleimido del compuesto **37**, **38** o N-etil maleimida, respectivamente.

Se hicieron reaccionar alícuotas (60 nmol) del compuesto **56** con 10 equivalentes de N-etil-maleimida o el compuesto **37** o **38**, respectivamente. Durante 15 minutos en 500 μ l de acetonitrilo/regulador de fosfato 100 mM 1/4 (v/v) (pH 8.0). La purificación subsecuente mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) produjo los productos **57**, **58** o **59**, respectivamente.

Compuesto	Tiempo de retención
57	20.8 min
58	16.8 min
59	13.5 min

IX – Síntesis de los MPIC **64** y **65** de insulina

LX-1) Síntesis del compuesto **61** de N ^{α B1}, N ^{α B29}-bis-(tiolenlazante)-insulina



10

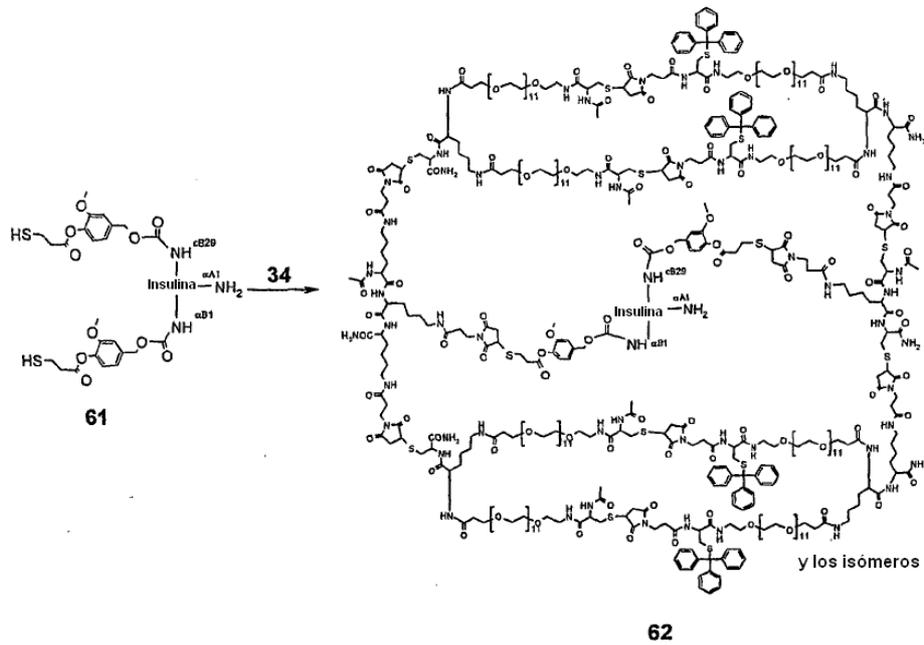
El compuesto **47** se mezcló con 4 equivalentes del compuesto **11** en DMSO. La solución se ajustó a pH 8.0 mediante la adición de DIEA y se agitó durante 2.5 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La purificación por RP-HPLC y liofilización dieron el compuesto **60**.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **60**: 6991 g/mol (6991 g/mol)

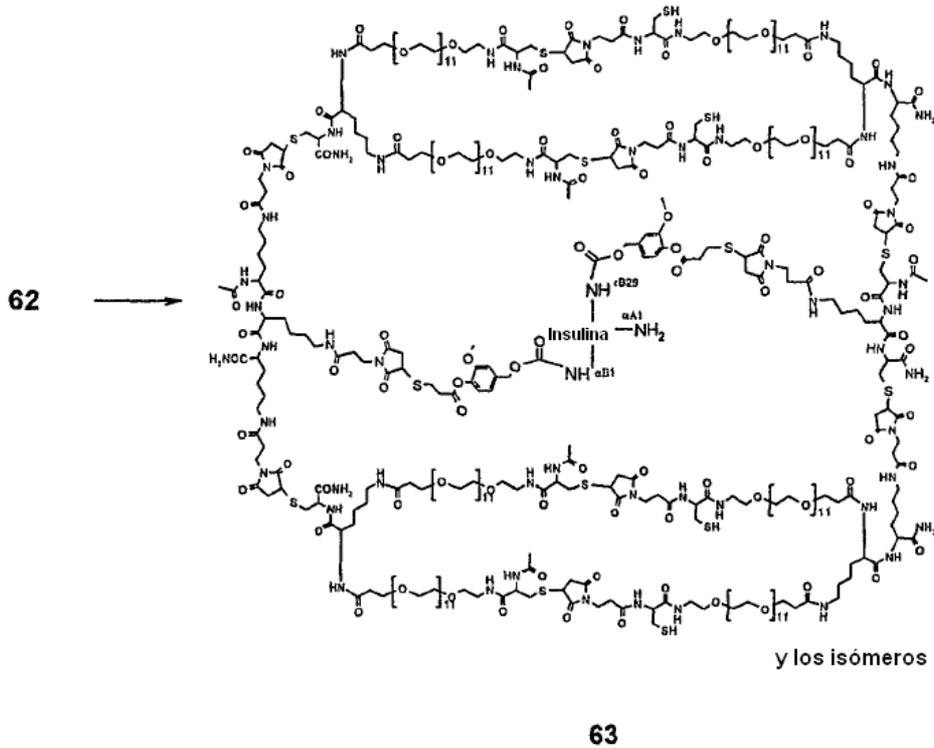
15 La eliminación de la protección Trt del compuesto **60** se dio por agitación del compuesto en TFA/TES 95/5 (v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La solución se secó bajo un flujo de nitrógeno. El residuo se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en TFA/DCM 1/1 (v/v) y el solvente se eliminó mediante un flujo de nitrógeno. El Producto **61** se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **61**: 6445 g/mol (6445 g/mol)

20 IX-2) Síntesis del MPIC **62** de insulina



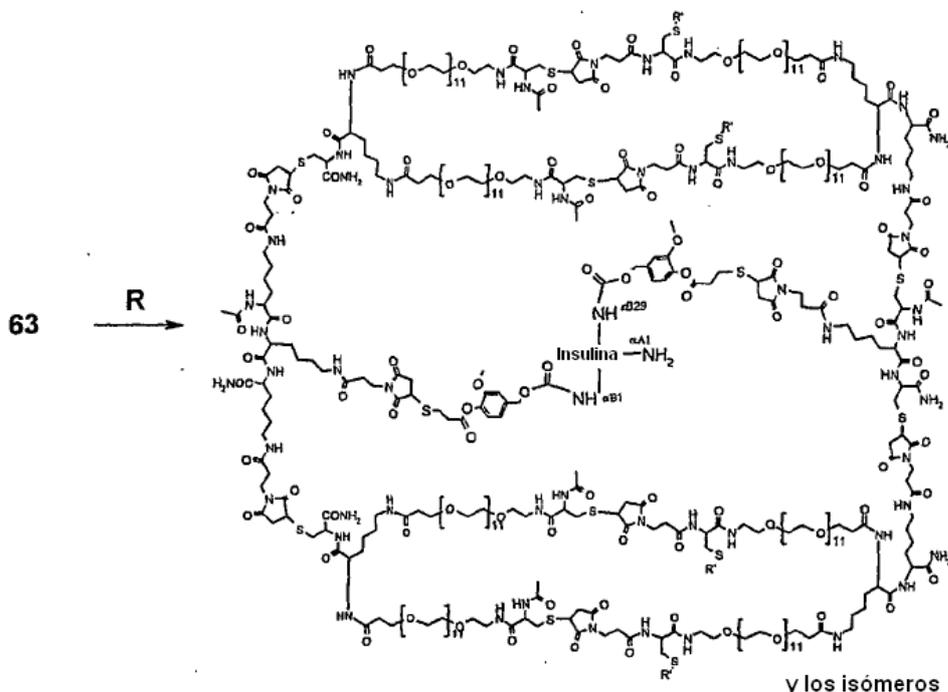
5 Se mezclaron 1.8 ml de una solución del compuesto **61** (200 μ M) en agua/acetonitrilo 1/1 (v/v) con 180 μ l de una solución 1.5 mM de la estructura macrocíclica **34** en agua/acetonitrilo 1/1 (v/v) y se diluyeron con agua/acetonitrilo 80/20 (v/v) hasta un volumen total de 24 ml. Subsecuentemente, el pH, se ajustó a 7.5 mediante la adición de regulador de fosfato 0.5 M (pH 8.0). Después de incubar durante 15 minutos, el compuesto **62** se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.



10 La destitilación del compuesto **62** se produjo por incubación durante 30 minutos con TES/TFA/DCM 2/58/40 (v/v/v). Un procedimiento de purificación de dos etapas empleando RP-HPLC y SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) produjo el producto **63**.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **63**: 15518 g/mol (15526 g/mol)

IX-3) Síntesis de los MPIC **64** y **65** de insulina modificados



64: R = N-Etil-Maleinimida

65: R = 37

5 El elemento estructural R representa el producto que contiene succinimidil de la adición de Michael del tiol proteóforo cercano al grupo maleimido del compuesto 37 o N-etil-maleimida, respectivamente.

Alícuotas (9 nmol) del compuesto **63** se incubaron con 15 equivalentes de N-etil-maleimida o el compuesto **37**, respectivamente, durante 3 minutos en 70 ml de acetonitrilo/regulador de fosfato 1/4 (v/v) 100 mM (pH 7.5). La purificación subsiguiente mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) dio los productos **64** o **65**, respectivamente.

Compuesto	Tiempo de retención
64	20.2 min
65	13.3 min

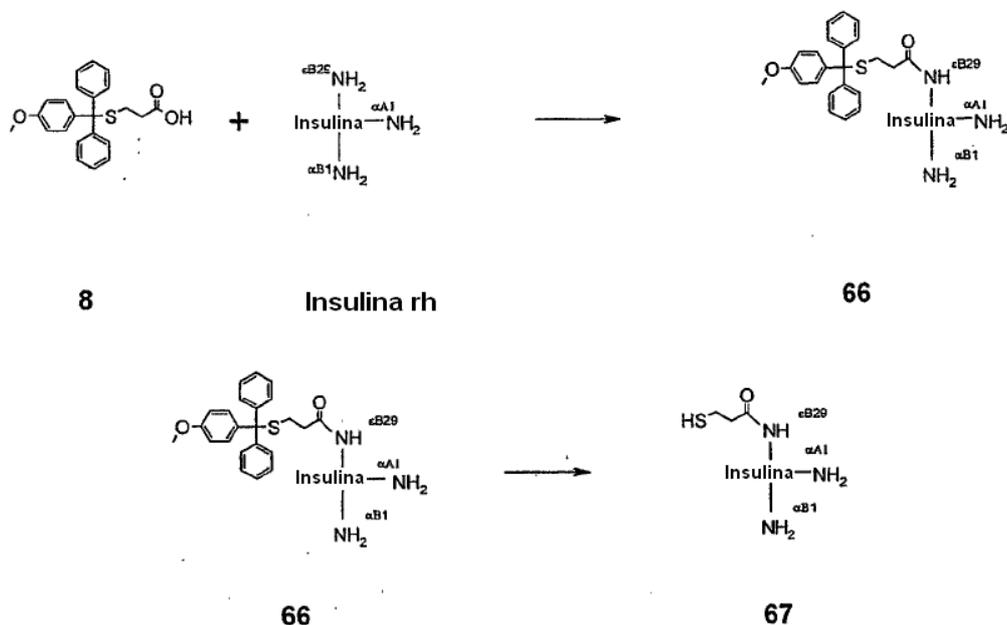
10

IX-4) Liberación de insulina a partir de los MPIC **64** y **65** de insulina

15 La liberación de insulina a partir de los MPIC **64** y **65** de insulina, respectivamente, se efectuó por hidrólisis enlazante en regulador acuoso. Una solución ca. 10 μM de conjugado se incubó en regulador HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% de. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo y se analizaron por HPLC y detección UV. El pico de correlación con el tiempo de retención de la insulina nativa se integró y se representó contra el tiempo de reacción, y el software de ajuste de curvas se aplicó para estimar el medio tiempo correspondiente de la liberación. Bajo estas condiciones, la insulina se liberó del compuesto **64** con un medio tiempo de aproximadamente 150 minutos y a partir del compuesto **65** con un medio tiempo de ca 230 minutos.

X – Síntesis de los compuestos **68-75** conjugados de insulina de referencia

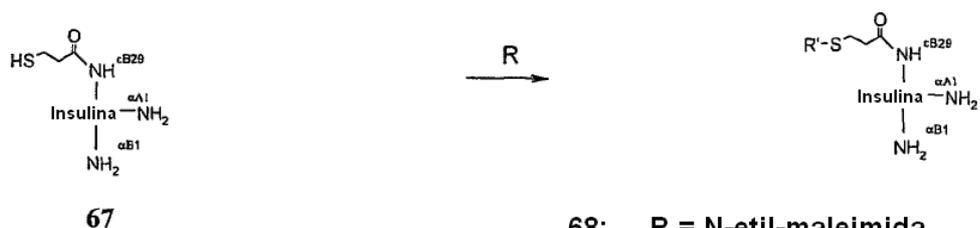
X-1) Síntesis del compuesto 67 de N^{εB29}-mercaptopropionilo-insulina



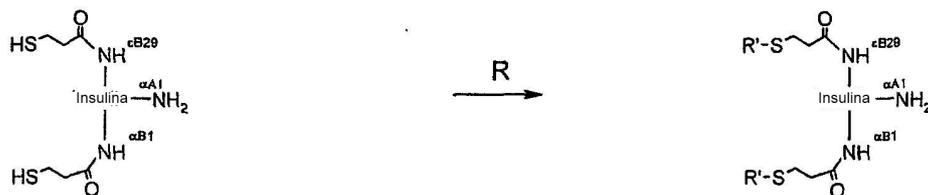
5 Se prepararon y se incubaron 150 µl de una solución de DIC 0.64 M, compuesto **8** 0.56 M y N-hidroxi succinimida 0.29 M en DMF durante 30 minutos. Se disolvieron 18 mg de insulina en DMSO/DMF/agua 20/30/50 (v/v/v) y 50 µl de DIEA, seguido de la adición de 50 µl del cóctel preincubado que contiene el compuesto **8**. Después de la incubación durante 30 minutos se agregaron otros 100 µl del compuesto **8** preactivado. Después de la incubación durante 30 minutos el producto **66** se purificó por RP-HPLC. El acetonitrilo se eliminó in vacuo y la escisión del grupo protector Mmt se dio mediante la adición de TFA/TES 98/2 (v/v) hasta que se observó un color amarillo intenso. El producto **67** se obtuvo por purificación por RP-HPLC.

10 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **67**: 5893 g/mol (5896 g/mol)

X-2) Síntesis de los compuestos **68-75** de insulina mono y bis-pegilados



- 68:** R = N-etil-maleimida
- 69:** R = Maleimida-PEG5k
- 70:** R = 37
- 71:** R = Maleimida-PEG20k
- 72:** R = Maleimida-PEG2x20k

**54****73: R = N-etil-maleimida****74: R = Maleimida-PEG5k****75: R = Maleimida-PEG20k**

5

El elemento estructural R representa el producto que contiene succinimidil de la adición de Michael de un tiol con el grupo maleimido del compuesto 37, N-etil-maleimida, maleimida-PEG5k, maleimida-PEG20k o maleimida-PEG2x20k, respectivamente. Los tioles están asociados con los compuestos 54 o 67 de insulina modificados, respectivamente.

10

Se incubaron 71 μ l de una solución del compuesto **67** (464 μ M) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) con 3.3 ml de N-etil maleimida (100 mM, 5 equivalentes) en acetonitrilo/agua 1/1 (v/v) y 10 μ l de regulador de fosfato 0.5 M (pH 8.0) durante 3 minutos. La purificación del compuesto 68 se generó mediante SEC (Superdex 200).

Se mezclaron 71 μ l de una solución del compuesto **67** (464 μ M) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) con 7 μ l de una solución de Maleimida-PEG5k 10 mM (1 equivalente) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) y 10 μ l de regulador de fosfato 0.5 M (pH 8.0) y se incubaron durante 15 minutos. El compuesto 69 se purificó mediante SEC (Superdex 200).

Los compuestos **70** y **71** se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento utilizado para la conjugación de compuestos 69 a 37 o Maleimida-PEG20k, respectivamente

15

Se mezclaron 43 μ l de una solución del compuesto **67** (464 μ M) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) con 22 μ l de una solución de Maleimida-PEG2x20k 2 mM (2 equivalentes) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) y 10 ml de regulador de fosfato 0.5 M (pH 8.0) y se incubaron durante 15 minutos. El compuesto **72** se purificó mediante SEC (Superdex 200).

20

Se mezclaron 11.4 μ l de una solución del compuesto **54** (2.9 mM) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) con 50 μ l acetonitrilo/agua 1/1 (v/v), 7 μ l de una solución 100 mM de N-etil maleimida (10 equivalentes) y 10ml de regulador de fosfato 0.5 M (pH 8.0) y se incubaron durante 3 minutos. El compuesto **73** se purificó mediante SEC (Superdex 200).

25

Se mezclaron 11.4 μ l de una solución del compuesto 54 (2.9 mM) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) con 50 μ l de de acetonitrilo/agua 1/1 (v/v), 15 μ l de una solución 10 mM de maleimida-PEGS5 (2 equivalentes) en acetonitrilo/agua 1/4 (v/v) y 10 ml de regulador de fosfato 0.5 M (pH 8.0) y se incubaron durante 15 minutos. El compuesto 74 se purificó mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min). El compuesto 75 se obtuvo en consecuencia a través de la reacción del compuesto 74 con Maleimida-PEG20k

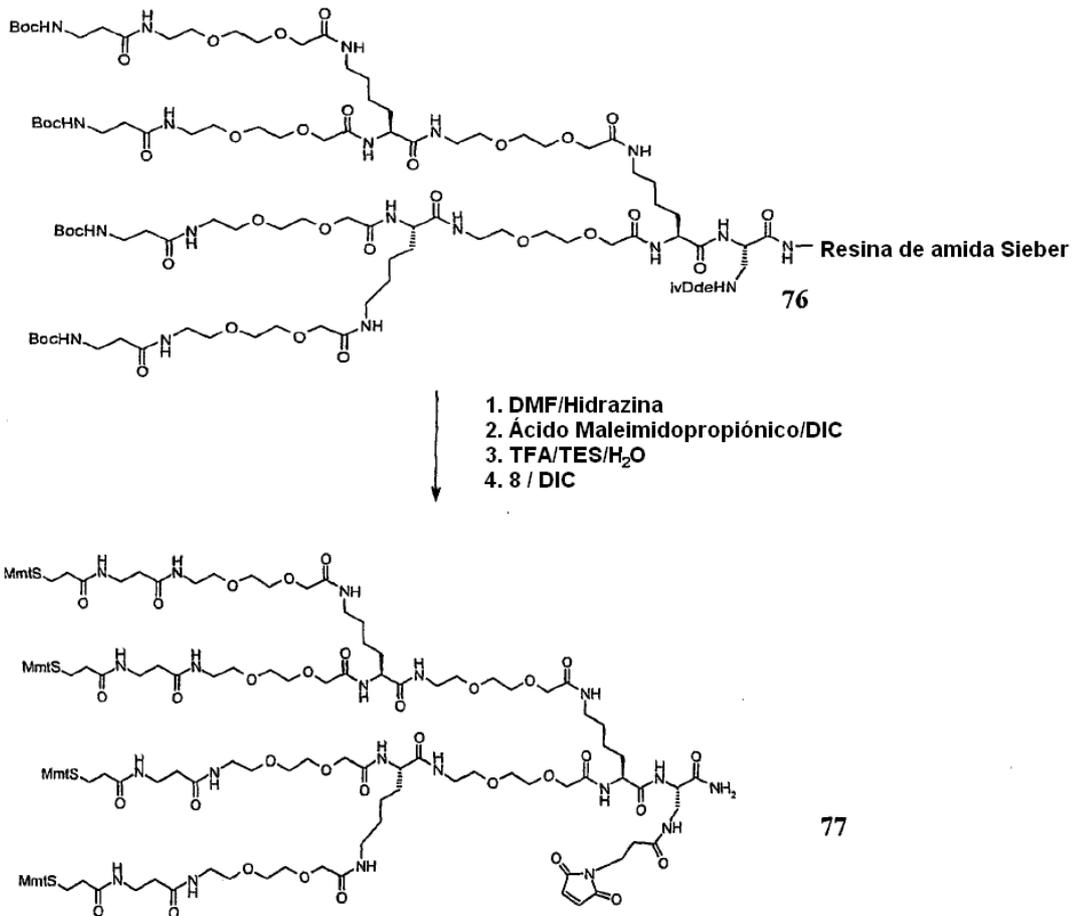
La SEC preparativa de los compuestos **68-75** produjo fracciones de 1.4-2.2 ml. Las concentraciones se determinaron midiendo la extinción UV a 275 nm, asumiendo un coeficiente medio de extinción de $\epsilon_{275} = 7,500$.

Compuesto	E_{275} / mOD	Concentración / μMol	Tiempo de retención /min
68	97	12.9	23.0
69	102	13.6	18.8
70	33	4.4	16.1
71	60	8.0	15.9
72	38	5.0	14.3

73	100	13.3	23.3
74	75	10.0	17.8
75	59	7.9	14.1

XI) Síntesis de los DPIC de insulina

XI-1) Síntesis del bloque **77** de construcción de dendrón

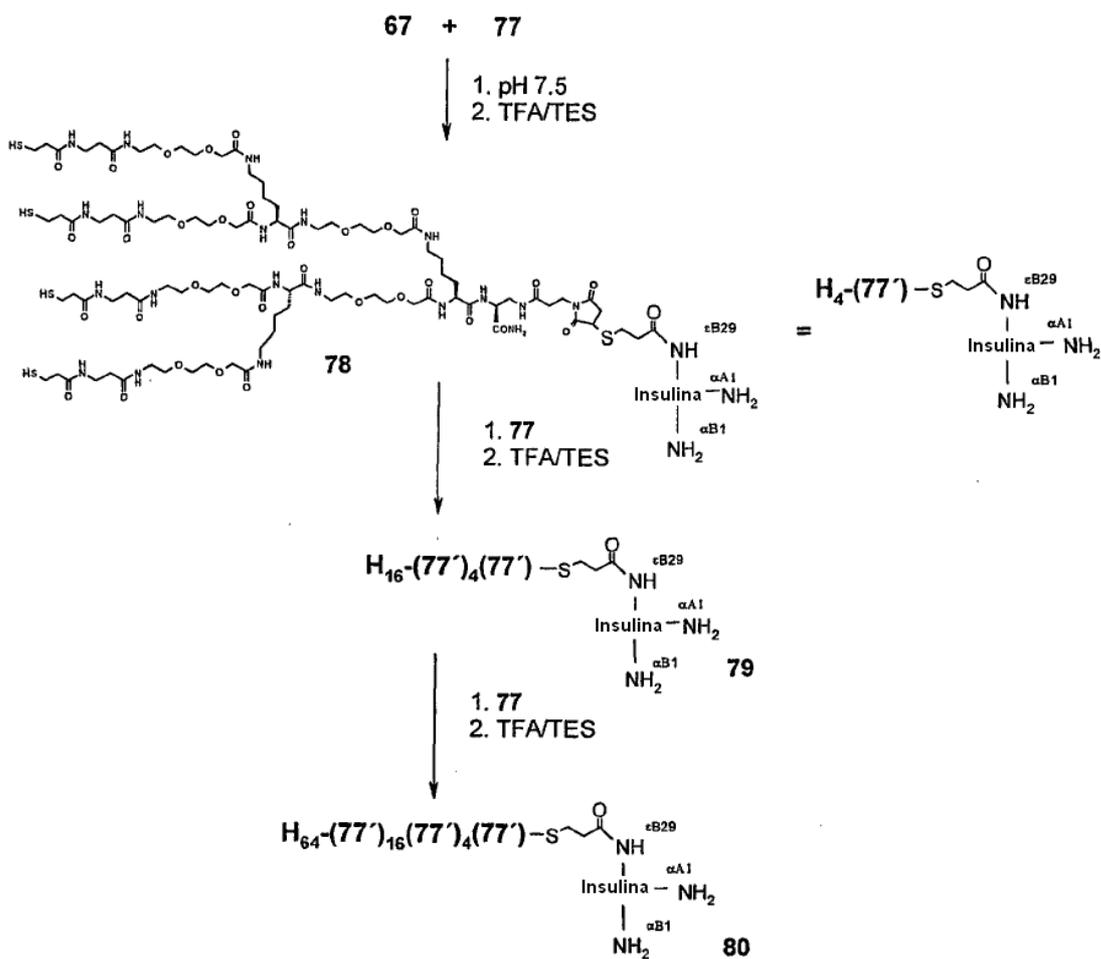


5 El compuesto **76** se obtuvo de acuerdo con el protocolo de síntesis en fase sólida estándar. La secuencia de aminoácidos Fmoc-Dpr (ivDde)-OH, Fmoc-Lys (Fmoc)-OH, Fmoc-Ado-OH, Fmoc-Lys (Fmoc)-OH, Fmoc-Ado-OH y Boc-βAla-OH se acoplaron a la resina de amida Sieber.

10 La resina se trató con DMF/hidrazina 98/2 (v/v), se lavó y se agitó con 5 equivalentes de ácido maleimidopropiónico y 5 equivalentes de DIC en DMF durante 30 minutos. Producto se escindió de la resina con TFA/TES/agua 95/3/2 (v/v/v). Después de la evaporación del solvente, el residuo se recogió en DMF/colidina 3/1 (v/v) de y se hizo reaccionar durante 30 minutos con una solución de 15 equivalentes del compuesto **8** preactivado durante 15 minutos con 10 equivalentes de DIC en DMF. Después de la acidificación con ácido acético, el producto **77** se purificó por RP-HPLC.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **77**: 3233,7 g/mol (3236,0 g/mol).

15 XI-2) Síntesis de los dendrímeros **78**, **79** y **80** de insulina



El elemento estructural 77' representa el producto que contiene succinimidil de la adición de Michael de un grupo tiol al grupo maleimido del compuesto 77 después de la eliminación del grupo protector Mtm. Los grupos tiol son o bien asociados con el conjugado de insulina-enlazante o con un conjugado de dendrón-insulina.

5 XI-2-1) Síntesis del dendrímero (**78**) de insulina-N^{εB29}-Mpa de primera generación

Se disolvieron 2.9 mg del compuesto **67** en 100 μl de acetonitrilo/agua 4/1 y se mezclaron con 180 μl de una solución del compuesto **77** (3.4 mM) en acetonitrilo/agua 4/1. Se agregaron 20 μl de regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se trató durante 30 minutos con un baño ultrasónico. El cóctel se mezcló con TFA 300 μl y TES 10 μl agitado durante 30 segundos. Después de la dilución con acetonitrilo/agua 1/1, el compuesto **78** se purificó mediante RP-HPLC. Rendimiento: 43%

10

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **78**: 8035 g/mol (8042 g/mol).

XI-2-2) Síntesis del dendrímero (**79**) de insulina-N^{εB29}-Mpa de segunda generación

Se mezclaron 350 μl de una solución del compuesto **78** (420 μM) en acetonitrilo/agua 4/1 con 150 μl de una solución 5.2 mM de dendrón **77** en acetonitrilo/agua 4/1. Se agregaron 20 μl de regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se trató durante 30 minutos en un baño ultrasónico. El cóctel se mezcló con 500 μl de TFA y 20 μl de TES y se agitó durante 30 segundos. Después de la dilución con acetonitrilo/agua 1/1, el compuesto **79** se purificó por RP-HPLC.

15

Rendimiento: 40%

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **79**: 16621 g/mol (16622 g/mol).

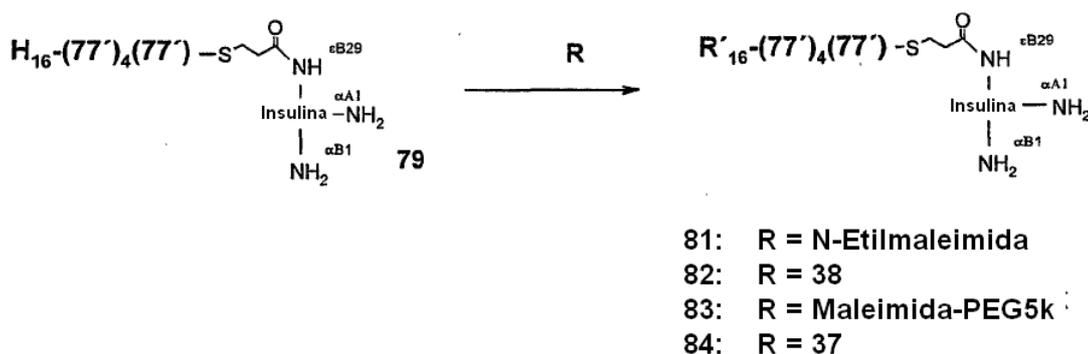
XI-2-3) Síntesis del dendrímero (80) de insulina-N^{εB29}-Mpa de tercera generación

5 Se mezclaron 46 μl de una solución del compuesto 79 (235 μM) en acetonitrilo/agua 4/1 con 60 μl de una solución 5.2 mM del dendrón 77 en acetonitrilo/agua 4/1. Se agregaron 20 ml de regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se trató durante 30 minutos en un baño ultrasónico. El cóctel se mezcló con 100 μl de TFA y 5 μl de TES y se agitó durante 30 segundos. Después de la dilución con agua/acetonitrilo 1/1, el compuesto 80 se purificó por HPLC.

Rendimiento: 38%

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **80**: 50967 g/mol (50967 g/mol)

10 X-3) Síntesis de los dendrímeros 81, 82, 83 y 84 de cubrimiento final basados en dendrímeros de insulina-N^{εB29}-Mpa de segunda generación



El elemento estructural R representa el producto que contiene succinimidil de la adición de Michael de un grupo tiol del compuesto 77' para el grupo maleimido del compuesto 37, compuesto 38, N-etil-maleimida, o maleimida-PEG5k, respectivamente.

15 XI-3-1) Síntesis del compuesto 81

Se mezclaron 70 μl de una solución del compuesto **79** (230 μM) in acetonitrilo/agua 1/1 con 10 μl de una solución 24 mM de N-etil-maleimida en acetonitrilo. El pH se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) dio el compuesto 81.

20 SEC (tiempo de retención) compuesto **81**: 20.28 min

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **81**: 18629 g/mol (18624 g/mol)

XI-3-2) Síntesis del compuesto 82

25 Se mezclaron 70 μl de una solución del compuesto 79 (230 μM) en acetonitrilo/agua 1/1 con 3 mg del compuesto 38. El pH se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min), produjo el compuesto 82.

SEC (tiempo de retención) compuesto **82**: 14.5 min

XI-3-3) Síntesis del compuesto **83**

30 Se mezclaron 70 μl de una solución del compuesto **79** (230 μM) en acetonitrilo/agua 1/1 con 2.6 mg de Maleimida-PEG5k. El pH se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) dio el compuesto 83.

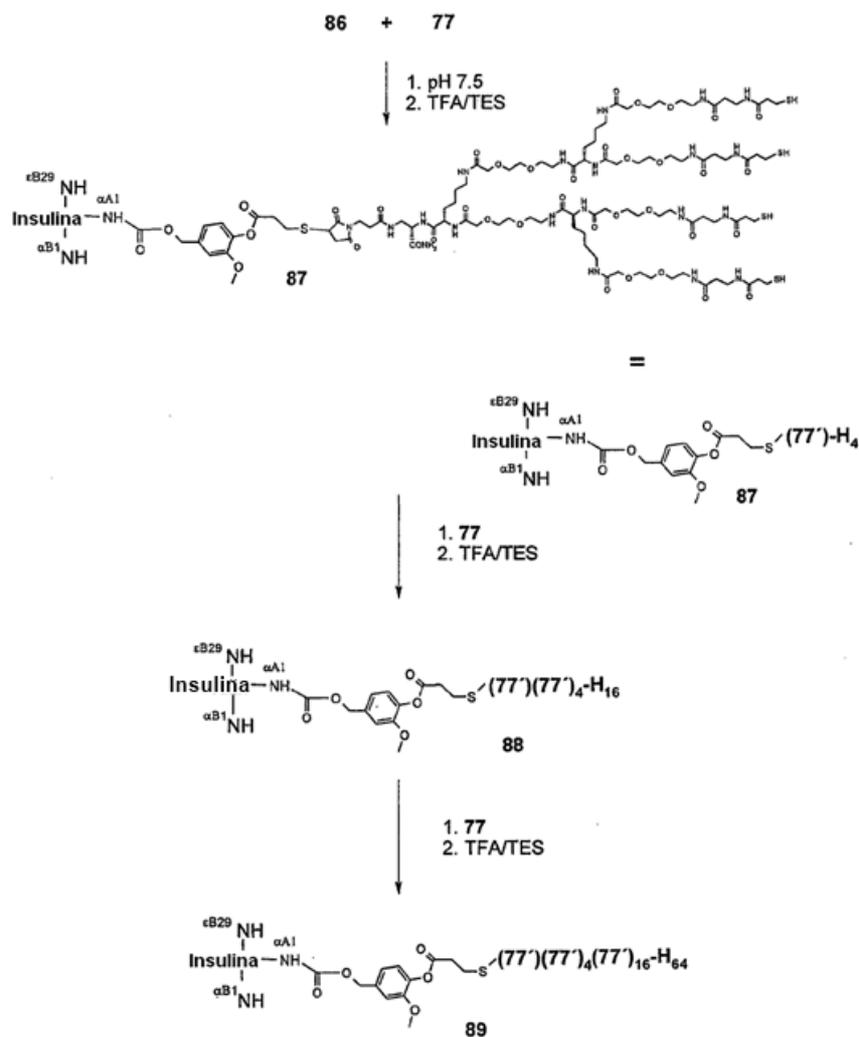
SEC (tiempo de retención) compuesto **83**: 12.9 min

XI-3-4) Síntesis del compuesto 84

Se mezclaron 115 μ l de una solución del compuesto **79** (65 μ M) en acetonitrilo/agua 1/1 con 5 mg del compuesto **37**. El pH se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) dio el compuesto **84**.

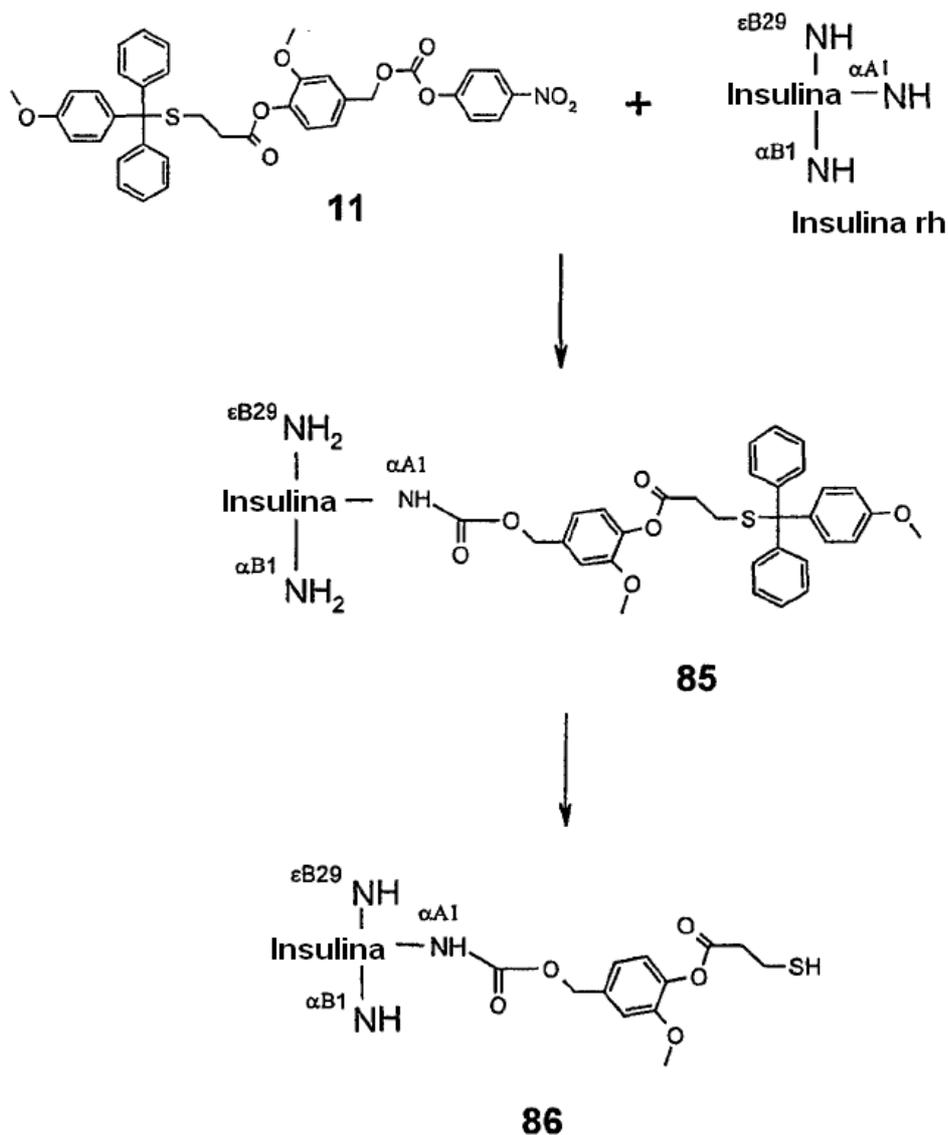
SEC (tiempo de retención) compuesto **84**: 10.9 min

5 XI-4) Síntesis de los dendrímeros **87**, **88** y **89** de insulina escindibles.



El elemento estructural **77'** representa el producto que contiene succinimidil de la adición de Michael de un grupo tiol al grupo maleimido del compuesto **77** después de eliminar el grupo protector Mmt. Los grupos tiol son o bien asociados con el conjugado de insulina-enlazante o con un conjugado dendrón-insulina.

10 XI-4-1) Síntesis del compuesto **86** de N ^{α A1}-tiolenlazante-insulina



Se mezcló insulina en DMSO con una solución de 0.9 equivalentes del compuesto **11** en DMSO. La solución resultante se ajustó a pH 8.0 con DIEA y se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente. La purificación por RP-HPLC dio el intermediario **85** protegido de Mmt.

5 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **85**: 6350 g/mol (6350 g/mol)

La regioselectividad de la monoconjugación se determinó mediante la reducción del compuesto **85** con DTT (10 μ M) en regulador de fosfato 0.5 M pH 8.0 durante 1 hora a temperatura ambiente y el análisis subsecuente de las cadenas A y B de insulina mediante LC-MS.

10 Después de la liofilización, el compuesto **85** se mezcló con TFA/trietilsilano 95:5 (v/v) y se agitó durante 5 minutos. Los volátiles se eliminaron bajo flujo de nitrógeno y el compuesto **86** se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **86**: 6077 g/mol (6077 g/mol)

XI-4-2) Síntesis del dendrímero **87** de N ^{α 1}-tíenlazante-insulina de primera generación

La síntesis del compuesto **87** se llevó a cabo en analogía con la síntesis del compuesto **78**.

Rendimiento: 27 %

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **87**: 8218 g/mol (8223 g/mol).

XI-4-3) Síntesis del dendrímero **88** N^{αA1}-tíenlazante-insulina de segunda generación

La síntesis del compuesto 88 se llevó a cabo en analogía con la síntesis del compuesto 79.

Rendimiento: 17%

5 MS (Peso Molecular calculado) compuesto **88**: 16809 g/mol (16809 g/mol).

XI-4-4) Síntesis del dendrímero 89 de N^{αA1}-tíenlazante-insulina de tercera generación

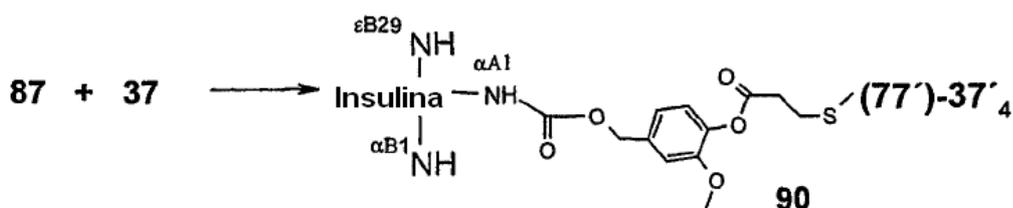
La síntesis del compuesto 89 se llevó a cabo en analogía con la síntesis del compuesto 80.

Rendimiento: 44%

MS (Peso Molecular calculado) compuesto **89**: 51117 g/mol (51155 g/mol).

10 XI-5) Síntesis de los dendrímeros 90 y 91 de cubrimiento final basados en dendrímeros N^{αA1}-tíenlazantes-insulina de primera y segunda generación

XI-5-1) Síntesis del compuesto 90

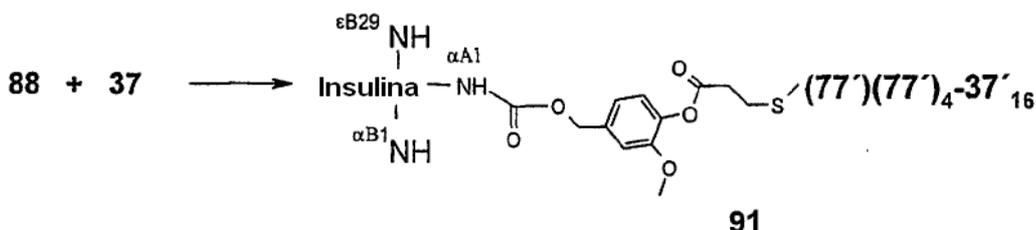


15 El elemento estructural 37' representa el producto que contiene succinimidil de la adición de Michael de un grupo tiol al grupo maleimido del compuesto 37. Los grupos tiol se asocian con una generación 1 conjugada dendrón-insulina.

Se mezclaron 50 µl de una solución del compuesto **87** (450 µM) en acetonitrilo/agua con 3.5 mg del compuesto 37. El pH se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo 0.75 ml/min) dio el compuesto 90.

SEC (tiempo de retención) compuesto **90**: 13.0 min

20 XI-5-2) Síntesis del compuesto 91



El elemento estructural 37' representa el grupo que contiene succinimidilo de la adición de Michael de un grupo tiol al grupo maleimido de compuesto 37. Los grupos tiol se asocian con una generación 2 conjugada dendrón-insulina.

25 Se mezclaron 75 µl de una solución del compuesto 88 (206 µM) en acetonitrilo/agua 1/1 con 9 mg del compuesto 37. El pH de la solución se ajustó a 7.5 con regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.5) y la solución se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación mediante SEC (Superdex 200, rata de flujo 0.75 ml/min), produjo el compuesto 91.

SEC (tiempo de retención) compuesto **91**: 10.9 min

XI-6) Liberación de insulina a partir del DPIC de insulina 90 y 91

5 SEC-eluidos de los compuestos 90 y 91 se incubaron con regulador HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% a 37°C, y la cantidad de insulina libre se cuantificó por HPLC usando detección UV a 215 nm (Figura 5).

XII - Análisis de la eficiencia de encapsulación

El análisis fue realizado en un instrumento de resonancia de plasmón de superficie BIAcore 2000 utilizando chips sensores CM5 (Biacore).

XII-1) Reparación de chips sensores

10 Un chip sensor se montó en el instrumento y el RAMFc (anticuerpo Fc anti ratón de conejo, BIAcore) se inmovilizó según Karlsson et al. (J. Immun. Meth, 200, 1997, 121-133) utilizando la activación de EDC/NHS. El cubrimiento de grupos carboxi de superficie sin reaccionar activados se efectuó mediante etanolamina

XII-2) Análisis de interacciones entre la insulina encapsulada de proteóforo y los anticuerpos anti-insulina

Los compuesto 68-75, 57-59 y 81-84 de insulina y conjugados de insulina fueron objeto de análisis.

15 Para la aplicación de la muestra, la disociación y la regeneración, se utilizó un regulador de flujo estándar que contiene HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 al 0,005 %.

20 Tres anticuerpos monoclonales anti insulina de murinos (Advanced ImmunoChemical Inc., clones C7C9, 8E2, o 7F8, respectivamente,) se cargaron sobre áreas del chip sensor preespecificadas mediante inyección de 15 µl de una solución de 30 mg/ml. Una cuarta área del sensor se utilizó para propósitos de referencia. Después de equilibrar durante 2.5 minutos, se inyectaron 150 µl de una solución de insulina o de conjugado de insulina 100 nM y fluyeron a través de todas las cuatro zonas del sensor. Una fase de disociación de 3 minutos fue seguida por la eliminación de los anti-insulinas mediante inyección de 60 µl de regulador de glicina (pH 2.0) y la regeneración de la superficie del chip sensor. La eficiencia de encapsulación se midió mediante el registro de las unidades de índice de refracción (RU) de cada una de las cuatro áreas del sensor antes de la disociación.

25 La encapsulación altamente eficiente de la insulina se logró mediante la conjugación de la proteína a las estructuras proteóforo 84, 58 o 59, respectivamente, como se evidencia por la supresión de la unión de los anticuerpos.

Abreviaturas:

	Boc	t-butiloxicarbonilo
	DBU	1,3-diazabicyclo[5.4.0]andeceno
30	DCM	diclorometano
	(iv)Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohexiliden)3-metil-butil
	DIC	diisopropilcarbodiimida
	DIEA	diisopropiletilamina
	DMAP	dimetilamino-piridina
35	DMF	N,N-dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	Dpr	ácido diaminopropiónico
	DTT	ditiotreitól
	EDC-HCl	Clorhidrato de 1-Etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida

40

	Endo-GluC	endoproteinasa-GluC
	eq	equivalente estequiométrico
	Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
	Fmoc-PP-OH	Ácido Fmoc-aminoetil-undecaetilenoxido-propiónico
5	Fmoc-Ado-OH	Ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico
	Hb	hemoglobina (humana)
	HEPES	N-(2-hidroxietyl) piperazin-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
	HOBT	N-hidroxibenzotriazol
	LCMS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
10	Mal	maleimidopropionilo
	Mmt	4-metoxitritilo
	Mpa	mercaptopropionilo
	MS	espectro de masas
	MSNT	1-(mesitilen-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
15	Mtt	4-metiltritilo
	MW	masa molecular
	NHS	N-hidroxi succinimida
	RP-HPLC	cromatografía líquida de alta presión de fase reversa
	RT	temperatura ambiente
20	RU	unidades de respuesta
	SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
	SPDP	succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato
	S-tBu	t-butiltio
	Suc	succinimidopropionilo
25	TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	TCEP	tricarboxietilfosfina
	TES	trietilsilano
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
30	Trt	tritilo, trifenilmetilo
	UV	ultravioleta

REIVINDICACIONES

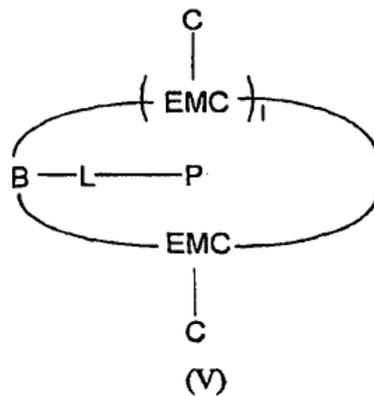
1. Una composición que comprende:

- un polímero hiperramificado que comprende grupos oxietileno unidos a un núcleo; y

- una unidad estructural biológicamente activa siendo una proteína o polipéptido

5 con lo cual la unidad estructural activa biológicamente está unida al núcleo por medio de un enlazante L sin traza sustancialmente no enzimáticamente escindible que comprende un grupo carbamato, en donde el polímero hiperramificado contiene al menos dos cadenas moleculares, cadenas moleculares que son de longitud suficiente para estar así dispuestas de manera que forman una cavidad para acomodar la unidad estructural activa biológicamente, en donde las cadenas moleculares contienen grupos de cubrimiento C estéricamente exigentes que

10 contienen grupos oxietileno; que tienen la fórmula (V)



en donde B es el núcleo;

EMC son las cadenas moleculares;

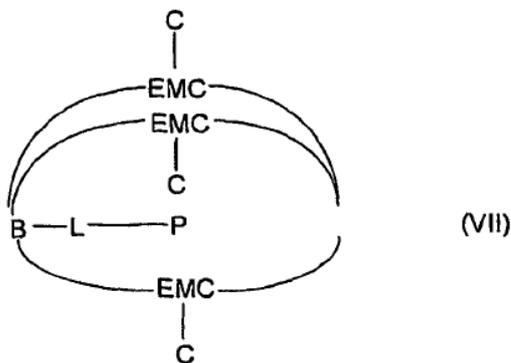
15 L es el enlazante;

I es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12;

P es la unidad estructural biológicamente activa; y

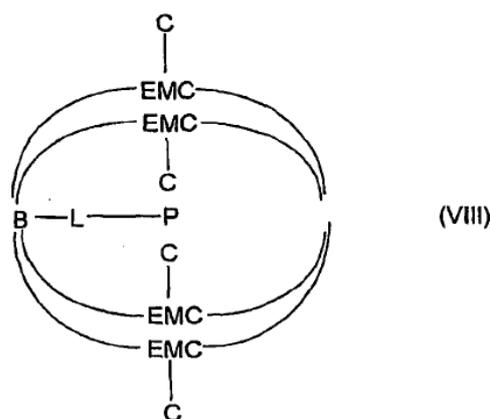
C denota uno o más de los grupos de cubrimiento.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde I es 2 o 3 dando como resultado la fórmula



20

o



3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde el polímero hiperramificado es soluble en agua.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde grupos adicionales están presentes en las cadenas de polímero, los grupos adicionales están siendo seleccionados de los grupos que consisten de S, N, O, (-SS)-, oxipropileno y oxibutileno, amida-C(O)NH- o C(O)NR-, -S-succinimido, amino (-NR-), éster carboxílico (-C(O)O-), sulfonamida (-S(O)₂-NR-), carbamato (-OC(O)-NR-), carbonato (-OC(O)-O-), sulfona (-S(O)₂-), éter (-O-), oxima (-CR=N-O-), hidrazona (-CR=N-NR-), urea (-NR-C(O)-NR-), tiourea (-NR-C(S)-NR-), carbohidratos, glicerilo, fosfato (-OP(O)(OR)O-), fosfonato (-P(O)(OR)O-), grupos (hetero)cíclicos saturados y no saturados, en los cuales R es H, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos los cuales pueden contener grupos funcionales adicionales o heteroátomos.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los grupos de cubrimiento C contienen grupos adicionales seleccionados de los grupos que consisten de S, N, O, (-S-S)-, oxipropileno y oxibutileno, amida -C(O)NH- o C(O)NR-, -S-succinimido, amino (-NR-), éster carboxílico (-C(O)O-), sulfonamida (-S(O)₂-NR-), carbamato (-OC(O)-NR-), carbonato (-OC(O)-O-), sulfona (-S(O)₂-), éter (-O-), oxima (-CR=N-O-), hidrazona (-CR=N-NR-), urea (-NR-C(O)-NR-), tiourea (-NR-C(S)-NR-), carbohidratos, glicerilo, fosfato (-OP(O)(OR)O-), fosfonato (-P(O)(OR)O-), grupos (hetero)cíclicos saturados y no saturados en los cuales R es H, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos los cuales pueden contener grupos funcionales adicionales o heteroátomos.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, en donde la unidad estructural biológicamente activa es seleccionada del grupo de proteínas o polipéptidos que consisten de ACTH, adenosina desaminasa, agalsidasa, albúmina, alfa-1 antitripsina (AAT), inhibidor de proteinasa alfa-1 alfa-1 (API), alteplasa, anistreplasa, proteasa serina ancrod, anticuerpos (monoclonales o policlonales, y fragmentos o fusiones), antitrombina III, antitripsinas, aprotinina, asparaginasa, bifalina, proteínas morfogénicas óseas, calcitonina (salmón), collagenasa, DNasa, endorfinas, encefalinas, eritropoyetinas, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisisina, proteínas de fusión, hormonas estimulantes del folículo, factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), galactosidasa, glucagón, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-C'SF), proteína de activación de fosfolipasa (PLAP), gonadotropina coriónica (hCG), hemoglobinas, vacunas de hepatitis B, hirudina, hialuronidasas, idumonidasa, inmunoglobulinas, vacunas de influenza, interleucinas (1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12), antagonista del receptor de IL-1 (rhIL-lra), insulinas, interferones (alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1 b, gamma 1 a, gamma 1 b), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factores de crecimiento transformante, lactasa, leuprolida, levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna de Lyme, péptido natriurético, pancrelipasa, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH), prolactina, proteína C, octreotida, secretina, sermorelina, superóxido dismutasa (SOD), somatropina (hormona del crecimiento), somatostatina, estreptoquinasa, sacarasa, fragmento de toxina del tétanos, Tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tirotropina, factor de necrosis tumoral (TNF), Fc IgG del receptor de TNF, activador del plasminógeno tisular (tPA), TSH, urato oxidasa, uroquinasa, vacunas, y proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas.
7. La composición de la reivindicación 1 a 6, en donde la unidad estructural biológicamente activa es insulina.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el enlazante escindible L es un enlazante profármaco sin traza y contiene un enlace éster hidrolizable que puede ser hidrolizado y el carbamato.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde el enlace éster hidrolizable es un éster de fenol.
10. Un fármaco que contiene la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

Fig. 1

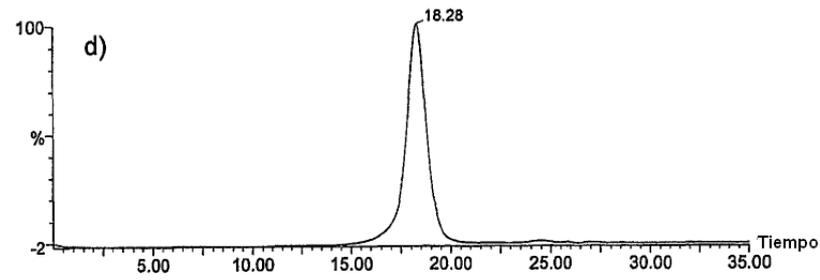
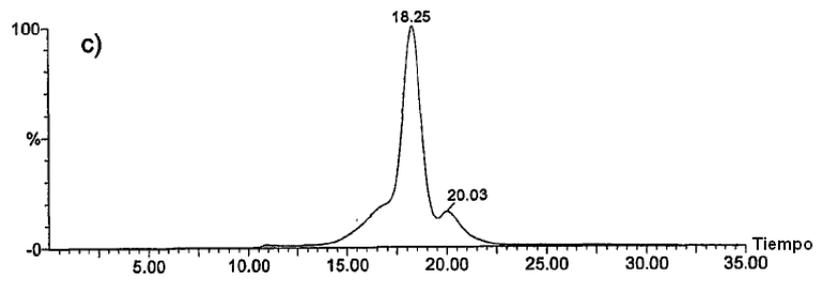
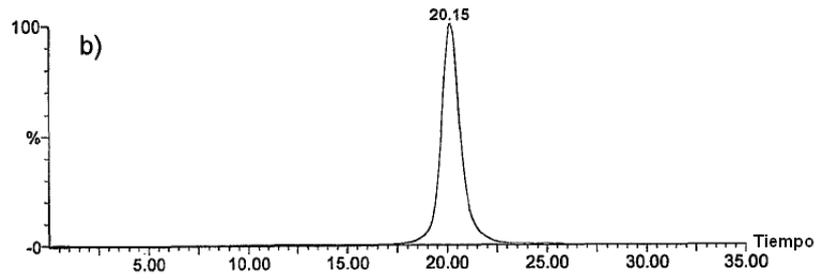
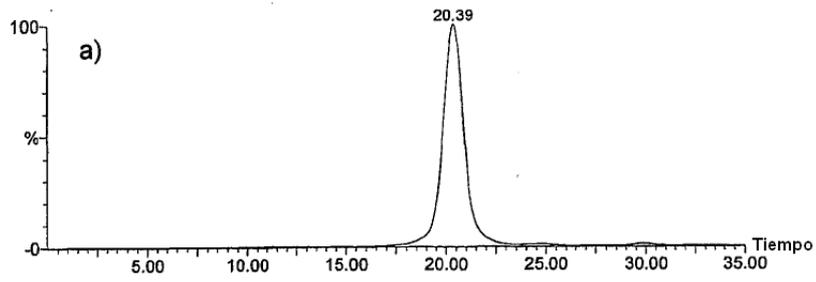


Fig. 2

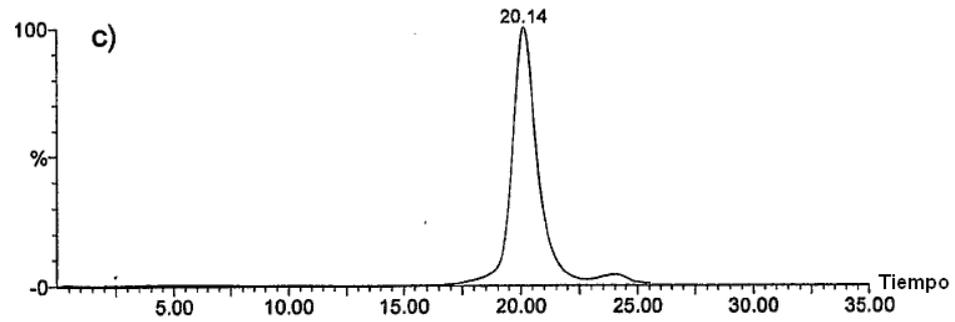
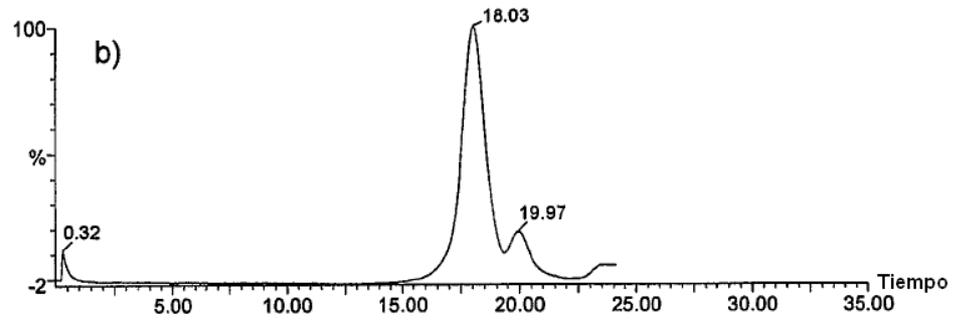
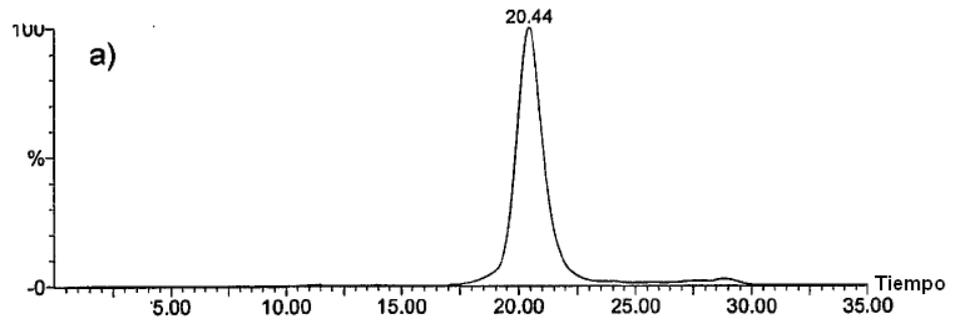


Fig. 3

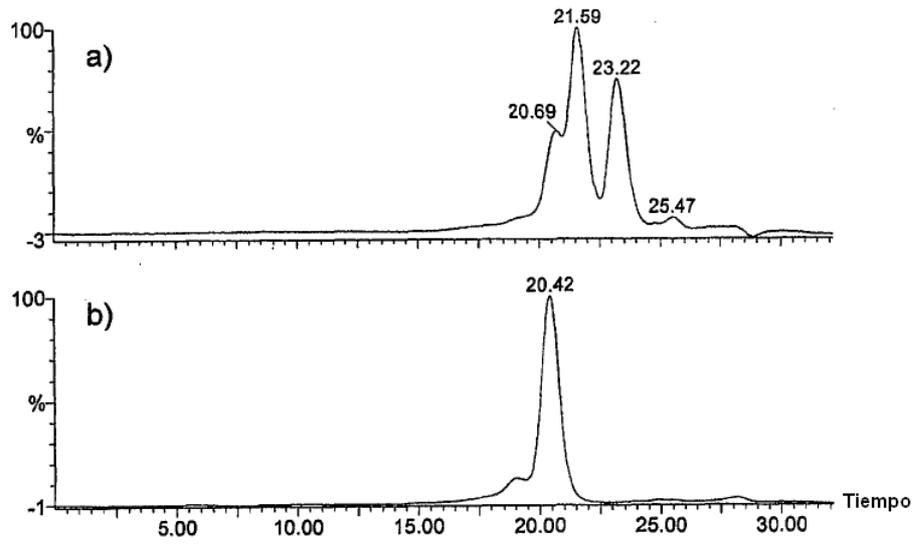


Fig. 4

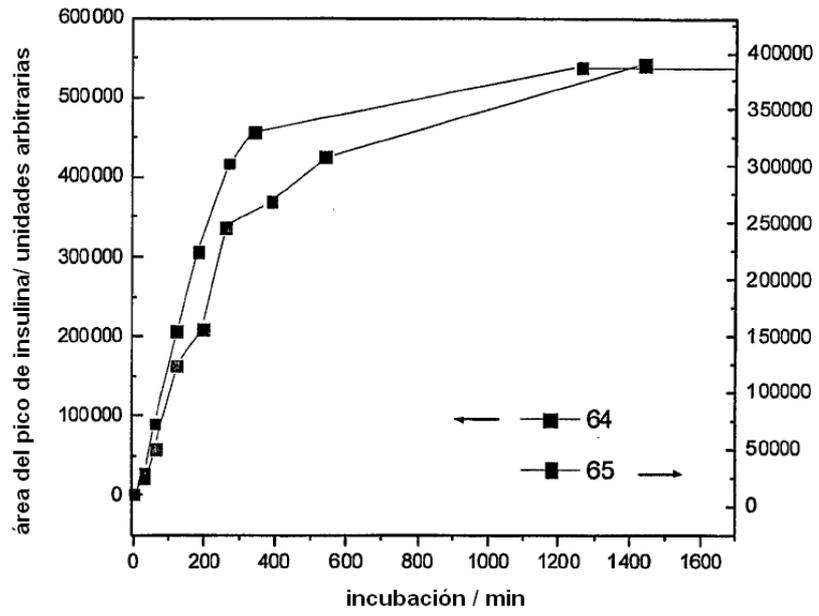


Fig. 5

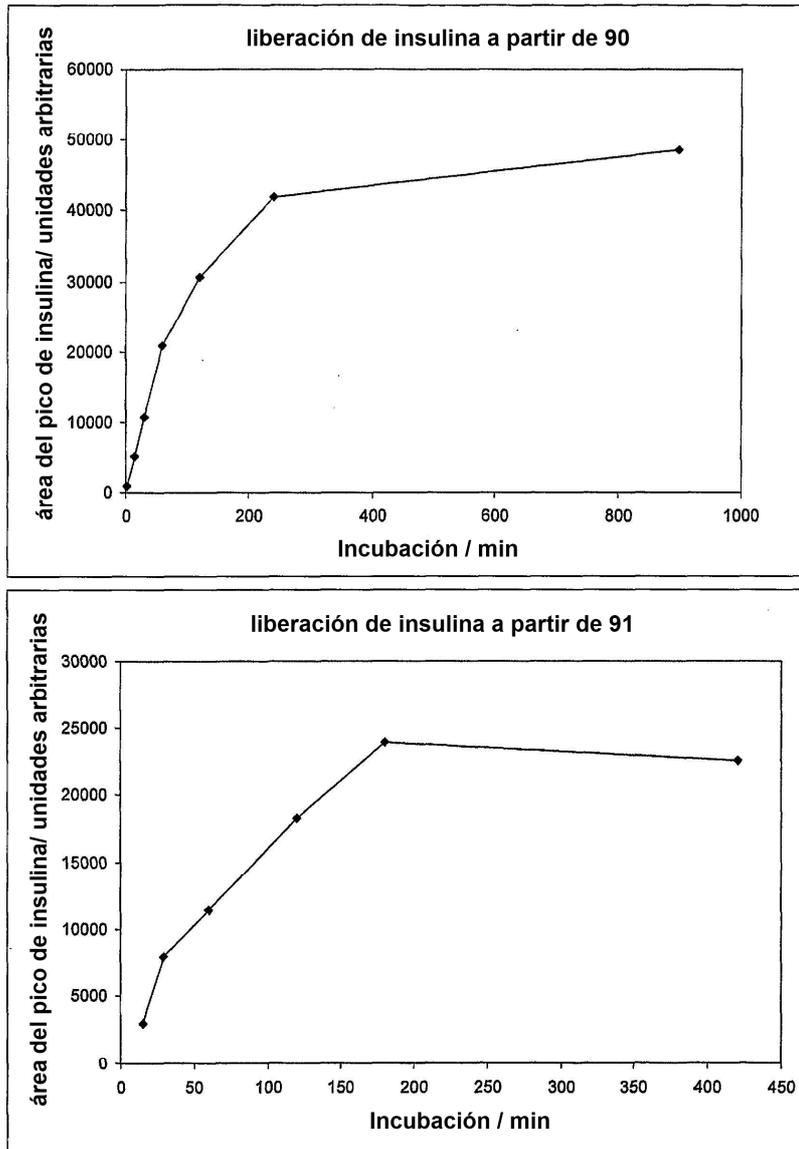


Fig. 6

