

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 866**

51 Int. Cl.:

**C08F 220/60** (2006.01)

**C12N 11/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2010 E 10776749 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2501734**

54 Título: **Polímeros que comprenden una mayoría de monómeros anfífilos destinados a la captura y a la manipulación de proteínas membranaaria**

30 Prioridad:

**16.11.2009 FR 0958072**

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

**14.12.2015**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)**

**3, rue Michel Ange  
75016 Paris, FR y  
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DU  
VAUCLUSE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PUCCI, BERNARD;  
POPOT, JEAN-LUC;  
SHARMA, KSHATRAPATI SHIVAJI;  
BAZZACCO, PAOLA;  
DURAND, GREGORY y  
GIUSTI, FABRICE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 553 866 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

Polímeros que comprenden una mayoría de monómeros anfífilos destinados a la captura y a la manipulación de proteínas membranaria.

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a unos polímeros anfífilos útiles para la manipulación de compuestos hidrófobos en solución acuosa, a los complejos hidrosolubles formados entre unos compuestos hidrófobos, en particular unas proteínas membranarias, y estos polímeros, a unos procedimientos de preparación de estos complejos, y a las aplicaciones de estos complejos, en particular a los métodos de diagnóstico o de análisis.

10

**Técnica anterior**

Las proteínas membranarias integrales, una clase particular de proteínas, son insertadas *in vivo* en las membranas biológicas, las cuales atraviesan la doble capa lipídica. La superficie de estas proteínas que entran naturalmente en contacto con las membranas (zona transmembranaria) es particularmente hidrófoba, siendo las superficies extramembranarias principalmente hidrófilas. Las proteínas membranarias aseguran unas funciones biológicas esenciales, en particular en lo que se refiere a los intercambios de información o de moléculas entre los diversos compartimentos celulares y entre la célula y su entorno.

15

20

En este sentido, las proteínas membranarias presentan un gran interés en el campo médico. Representan, por ejemplo, unas dianas privilegiadas para las moléculas medicamentosas. Están también implicadas en numerosas enfermedades humanas, de las cuales algunas (por ejemplo la esclerosis múltiple o la *myasthenia gravis*) tienen un componente autoinmune manifestado por la presencia en el suero de autoanticuerpos dirigidos contra unas proteínas membranarias.

25

La manipulación en solución acuosa de las proteínas membranarias es por lo general un requisito previo indispensable para su purificación y para su estudio estructural y funcional. Necesita evitar la agregación espontánea de los campos hidrófobos y, para ello, mantener alrededor de las zonas transmembranarias un entorno anfífilo.

30

Las preparaciones habituales de unas proteínas de este tipo en estado hidrosoluble contienen unas concentraciones supramicelares de tensioactivos particulares, los detergentes. El éxito del procedimiento se basa en la adsorción sobre las regiones proteicas transmembranarias de estos compuestos anfífilos y dispersantes. La manipulación de los complejos así formados es, no obstante, mucho más delicada que la de las proteínas solubles, debido precisamente a la presencia de detergente. Éste debe estar presente a una concentración superior a su concentración micelar crítica (cmc) en todas las soluciones que contienen la proteína estudiada. Además de los eventuales problemas de coste planteados por el consumo de detergente, los experimentos son con frecuencia delicados debido a que las proteínas membranarias son generalmente inestables en solución detergente. Así, en presencia de un exceso de micelas, tienen tendencia a desnaturalizarse irreversiblemente, mientras que un defecto de tensioactivo conduce en general a su precipitación.

35

40

Esta situación ha llevado a buscar unas alternativas a la utilización de los detergentes, entre las cuales se citarán por ejemplo las bicelas, que son unos pequeños discos lipídicos estabilizados por unos tensioactivos, los nanodiscos, cuya estructura es similar pero en la que el tensioactivo es una proteína, los peptitodetergentes, que son unos péptidos anfífilos, los lipopéptidos, también peptídicos pero portadores de cadenas hidrocarbonadas, los tensioactivos fluorados o semifluorados, los "amphipols", a cuya familia pertenecen las moléculas que son objeto de la presente solicitud de patente. Los amphipols son unos polímeros anfífilos especialmente concebidos para subsistir a los detergentes en la superficie transmembranaria de las proteínas membranarias (Tribet *et al.*, WO 1998/027434). Esta patente describe el uso de copolímeros anfífilos para el mantenimiento de las proteínas membranarias en medio acuoso.

45

50

La mayoría de los amphipols o supuestas moléculas, tales como se describen en la actualidad, son unos polímeros iónicos, en particular aniónicos, lo cual impide su uso en diversos sistemas analíticos (isoelectrofocalización) o de separación (cromatografía sobre columna intercambiadora de iones), y no es un factor favorable para la cristalización de las proteínas membranarias así estabilizadas. Por lo tanto, existe una necesidad de unos polímeros anfífilos que tengan las ventajas de los amphipols existentes para la manipulación de las proteínas membranarias y que serían no iónicos.

55

Unos amphipols no iónicos se han descrito en Prata *et al.* y Sharma *et al.* En Prata *et al.*, los amphipols son unos copolímeros que comprenden dos tipos de monómeros (véase la figura 2 de este documento), uno hidrófilo (2 OH y 1 azúcar o 3 OH) y el otro anfífilo (2 OH y una cadena grasa). En este documento, la relación molar entre los monómeros hidrófilos y los monómeros anfífilos se ha mantenido entre 3,0 y 6,7, lo cual corresponde al 75-87% de monómeros hidrófilos y al 13-25% de monómeros anfífilos, que son por lo tanto minoritarios.

60

65

En Sharma *et al.*, los amphipols son unos copolímeros que comprenden dos tipos de monómeros (véase el esquema

1 de este documento), uno hidrófilo (2 OH y 1 azúcar) y el otro anfífilo (1 OH, 1 azúcar y una cadena grasa). En este documento, la relación molar entre los monómeros hidrófilos A y los monómeros anfífilos B se ha mantenido entre 3 y 5, lo cual corresponde al 75-83% de monómeros hidrófilos A y el 17-25% de monómeros anfífilos B, que son por lo tanto minoritarios. Esto se explica por el hecho de que los autores han observado que el amphipol que comprende el porcentaje más alto (25%) de monómeros anfífilos ya tenía una solubilidad acuosa reducida.

La solicitud WO 2008/058963 describe la inmovilización de proteínas membranas sobre unos soportes con la ayuda de amphipols que son unos copolímeros que comprenden diferentes tipos de monómeros (hidrófilos, anfífilos o hidrófobos), en los que la relación del porcentaje total de monómeros hidrófobos o anfífilos con el porcentaje total de monómeros hidrófilos está comprendida entre 0,25 y 2,5 (véase la reivindicación 3 del documento WO 2008/058963). El amphipol ejemplificado es un copolímero iónico que comprende unos monómeros hidrófilos y unos monómeros hidrófobos (véase la figura 1A de este documento). Además, los grupos definidos como anfífilos en esta solicitud comprenden unas funciones hidrófilas e hidrófobas mezcladas dentro de un mismo "injerto", y no unos grupos hidrófilos y unos grupos hidrófobos distintos, injertados por separado en la cadena lateral.

Así, todos los amphipols o supuestas moléculas, tales como se describen en la actualidad, son unos copolímeros que comprenden unas unidades de propiedades diferentes, unas hidrófilas, otras hidrófobas y/o anfífilas, siendo los monómeros anfífilos minoritarios cuando están presentes.

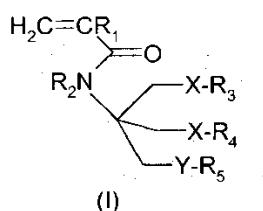
Además, los resultados presentados en Sharma *et al.* sugieren que es necesario incluir unos monómeros hidrófilos además de los monómeros anfífilos, con el fin de conservar una solubilidad acuosa suficiente de los amphipols.

Sin embargo, la estructura copolimérica de todas las moléculas descritas en la actualidad adolece de un inconveniente importante: hace difícil reproducir exactamente la misma estructura química de un lote a otro. En efecto, la síntesis necesita o bien una copolimerización radicalaria, o bien una funcionalización aleatoria de un precursor de tipo homopolímero, dos tipos de reacciones no selectivas por esencia. Existe por lo tanto una necesidad de polímeros anfífilos que presenten las mismas ventajas para la manipulación de compuestos hidrófobos, y de las proteínas membranas en particular, que las de la técnica anterior, y cuya preparación sea mucho más reproducible de un lote a otro.

### Descripción de la invención

Al contrario de lo que se sugiere en Sharma *et al.* (4), los inventores han demostrado de manera sorprendente que unos homopolímeros anfífilos (homoAPols) constituidos por monómeros anfífilos, o unos copolímeros que comprenden una gran mayoría de unos monómeros anfífilos de este tipo ("casi-homopolímeros") pueden tener una solubilidad en agua suficiente para permitir la manipulación de las proteínas membranas así como los amphipols copoliméricos conocidos en la técnica anterior. Además, estos homopolímeros o casi-homopolímeros pueden ser fabricados de manera muy reproducible y por lo tanto no adolecen de los inconvenientes de los amphipols copoliméricos conocidos de la técnica anterior.

La presente solicitud se refiere por lo tanto a un polímero anfífilo que comprende por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, ventajosamente por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99%, incluso el 100% de monómeros anfífilos de fórmula (I):



en la que

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de entre H o un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> (preferentemente un metilo);

X e Y se seleccionan independientemente de entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo carbonilo (-COO-) u oxicarbonilo (-O(CO)-), un grupo uretano (-OCONH-), y un grupo amida de fórmula (-CONR<sub>6</sub>-) o (-NR<sub>6</sub>CO-) en las que R<sub>6</sub> es un átomo de hidrógeno o un alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (preferentemente un metilo o un etilo);

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre:

a) los grupos glicosídicos,

b) los residuos zwitteriónicos,

c) los grupos poli(oxialquileno) de fórmula  $-(O(CH_2)_x)_y-OH$ , en la que x está comprendido entre 1 y 6 (ventajosamente x vale 2) e y está comprendido entre 4 y 30, ventajosamente entre 4 y 20 o entre 4 y 10,

d) los grupos alquilamidas de fórmula  $-(CH_2)_nCONR_7R_8$  o  $-(CH_2)_nNR_7COR_8$  en las que n está comprendido entre 1 y 4,  $R_7$  y  $R_8$  se seleccionan independientemente de entre un átomo de hidrógeno (-H), un grupo alquilo de  $C_1-C_6$ , (preferentemente un metilo) un grupo glicosídico, un residuo zwitteriónico o un grupo poli(oxialquileno) de fórmula  $-(O(CH_2)_x)_y-OH$ , en la que x está comprendido entre 1 y 6 (ventajosamente x vale 2) e y está comprendido entre 4 y 30, ventajosamente entre 4 y 20 o entre 4 y 10,

$R_5$  es na cadena hidrocarbonada cíclica ( $R_5$  puede contener uno o dos ciclos saturados o no, en particular de tipo ciclohexano, ciclopentano o aromático) o acíclica (lineal o ramificada), saturada o insaturada (una o varias insaturaciones) que comprende de 5 a 16 átomos de carbono, o una cadena semifluorocarbonada de fórmula  $C_tF_{2t+1}(CH_2)_m$  estando t comprendido entre 2 y 10 y m comprendido entre 2 y 10.

estando la masa molar media del polímero comprendida entre 800 y 100000, lo cual corresponde a un número de monómeros comprendidos entre 1 y 120, ventajosamente inferior o igual a 50000, preferentemente entre 8000 y 50000. La masa molar media se da en peso.

Se entiende por "alquilo de  $C_x-C_y$ " un radical hidrocarbonado saturado lineal o ramificado de fórmula  $-C_jH_{2j+1}$ , en la que  $x \leq j \leq y$ . En particular, un alquilo de  $C_1-C_6$  puede ser un alquilo de  $C_1$  (metilo),  $C_2$  (etilo),  $C_3$  (n-propilo o isopropilo),  $C_4$  (n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo),  $C_5$  (por ejemplo: n-pentilo, neopentilo, isopentilo, terc-pentilo) o  $C_6$  (n-hexilo por ejemplo).

Cuando el polímero según la invención comprende otros monómeros distintos de los de fórmula (I), estos monómeros son unos monómeros de motivo acrílico o vinílico con una cadena lateral sustituida por un grupo hidrófilo o hidrófobo. En particular, los grupos hidrófilos o hidrófobos de las cadenas laterales se pueden seleccionar de entre los definidos en las reivindicaciones 3 y 4 de la publicación PCT WO 2008/058963, siendo el contenido de estas reivindicaciones incorporado a modo de referencia.

Ventajosamente,  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan independientemente de entre H o un grupo metilo. Más ventajosamente,  $R_1$  y/o  $R_2$  son un átomo de hidrógeno.

Ventajosamente también, X es un átomo de oxígeno.

Ventajosamente también, Y es un grupo uretano (-CONH-).

Por "grupo glicosídico" se entiende cualquier grupo que comprende un azúcar. Los grupos glicosídicos ventajosos para  $R_3$  y/o  $R_4$  son en particular:

- los mono- o di-sacáridos, o
- los mono- o di-sacáridos aminados.

Por "monosacárido" u "osa" se entiende un monómero de glúcido no hidrolizable. Ventajosamente, el monosacárido se selecciona de entre las hexosas (osas de 6 átomos de carbono), en particular entre la glucosa, manosa, galactosa, alosa, altrosa, idosa, o maltosa.

Por "disacárido" o "diholósido" se entiende un azúcar formado por dos osas unidas por un enlace osídico hidrolizable por vía química (uso de ácidos concentrados en caliente) o por vía enzimática. Ventajosamente, el disacárido se selecciona de entre las dihexosas, formadas por dos hexosas, tales como la lactosa (Galactosa  $\beta(1 \rightarrow 4)$  Glucosa), la celobiosa (Glucosa  $\beta(1 \rightarrow 4)$  Glucosa) o la maltosa (Glucosa  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  Glucosa).

Por "polisacárido" se entiende un azúcar constituido por un polímero lineal o ramificado compuesto por lo menos por 2 monómeros seleccionados de entre los monosacáridos tales como se han definido anteriormente y que pueden alcanzar 20 unidades, tales como algunas amilosas. El término polisacárido incluye por lo tanto los disacáridos (o diosas), los trisacáridos (o triosas), etc. hasta 20 unidades de monosacáridos. Preferentemente, las unidades monosacáridos son unas unidades hexosas tales como las definidas anteriormente.

Por "mono-, di- o polisacárido aminado" se entiende cualquier monosacárido, disacárido o polisacárido tal como se han definido anteriormente, de los que una o varias funciones alcohol (-OH) han sido sustituidas por una amina (-NH<sub>2</sub>). Se pueden citar en particular como ejemplos de monosacáridos aminados la glucosamina, la galactosamina, la fructosamina, o la manosamina, y como ejemplo de di-sacárido aminado el aminolactitol.

Los mono- o di-sacáridos, particularmente se prefieren, en particular las mono- o di-hexosas de tipo glucosa, manosa, galactosa, lactosa, alosa, altrosa, idosa, lactosa, maltosa o celobiosa; siendo particularmente preferidas la

glucosa, la manosa y la galactosa, sobre todo la glucosa.

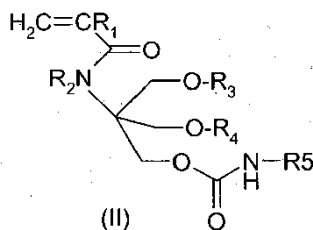
5 Estos grupos glicosídicos son injertados, en particular cuando X es un átomo de oxígeno, o bien por el oxígeno del carbono anomérico (O glicosilación), o bien por el del hidroxilo primario (enlace éster), o bien por la función amina (enlace amida), o bien finalmente por el grupo azida del cual se habrá previamente dotado el carbono anomérico en sustitución del grupo hidroxilo. En este último caso, los azúcares se introducen por medio de la reacción de Huygens en un motivo propargilo previamente injertada en la función X que, en este caso, será un átomo de oxígeno. Ventajosamente, el grupo glicosídico es injertado por el oxígeno del carbono anomérico (O glicosilación).

10 Por "residuo zwitteriónico" se entiende un grupo que posee unas cargas eléctricas formales de una unidad, de signos opuestos y situadas en general sobre unos átomos no adyacentes. Estos compuestos poseen al mismo tiempo unas cargas positivas y negativas, son muy solubles en agua, que es un disolvente polar. Los residuos zwitteriónicos ventajosos proceden, por ejemplo, de betaínas simples (en particular de tipo  $-N^+(CH_3)_2C(CH_2)_iCO_2^-$ ,  $-N^+(CH_3)_2C(CH_2)_iSO_3^-$ ,  $N^+(CH_3)_2C(CH_2)_iOSO_3^-$  estando i comprendido entre 1 y 10), o de motivos aminoácidos, en particular tales como la lisina, la ornitina, el ácido aspártico o glutámico dotados de un grupo acrílico polimerizable tales como  $CH_2=CHCONH-(CH_2)_j-$  estando j comprendido entre 2 y 5.

20 En un modo de realización ventajoso,  $R_3$  y/o  $R_4$  son un grupo glicosídico, preferentemente un monosacárido o disacárido o un mono- o di-sacárido aminado, ventajosamente un mono- o di-sacárido. Preferentemente, el mono- o di-sacárido es una mono- o di-hexosa, en particular de tipo glucosa, manosa, galactosa, lactosa, alosa, altrosa, idosa, lactosa, maltosa o celobiosa, ventajosamente una glucosa, una manosa o una galactosa, más preferentemente una glucosa.

25 Ventajosamente,  $R_5$  es una cadena hidrocarbonada cíclica ( $R_5$  puede contener uno o dos ciclos saturados o no, en particular de tipo ciclohexano o ciclopentano) o acíclica (lineal o ramificada), saturada o insaturada (una o varias insaturaciones), ventajosamente lineal y/o saturada, que comprende de 5 a 16 átomos de carbono. Preferentemente,  $R_5$  es un grupo alquilo de  $C_5-C_{16}$ , preferentemente de  $C_8-C_{12}$ , en particular de  $C_{11}$ , ventajosamente lineal.

30 Más precisamente, un polímero ventajoso según la invención comprende por lo menos un 75%, preferentemente por lo menos un 80%, ventajosamente por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99%, incluso el 100%, de monómeros anfífilos de fórmula (II):



35 en la que

$R_1$  y  $R_2$  se seleccionan independientemente de entre H o un grupo alquilo de  $C_1-C_6$  (preferentemente metilo),

40  $R_3$  y  $R_4$  son unos grupos glicosídicos tales como los definidos anteriormente,

$R_5$  es una cadena hidrocarbonada cíclica ( $R_5$  puede contener uno o dos ciclos saturados o no, en particular de tipo ciclohexano, o ciclopentano o aromático) o acíclica (lineal o ramificada), saturada o insaturada (una o varias insaturaciones) que comprende de 5 a 16 átomos de carbonos tal como se han definido anteriormente.

45 Ventajosamente,  $R_3$  y  $R_4$ , idénticos o diferentes, preferentemente idénticos, son unos mono- o di-sacáridos, preferentemente unas mono- o di-hexasas, en particular de tipo glucosa, manosa, galactosa, lactosa, alosa, altrosa, idosa, lactosa, maltosa, o celobiosa, preferentemente una glucosa, una manosa o una galactosa, ventajosamente  $R_3$  y  $R_4$  son unas glucosas.

50 Ventajosamente,  $R_5$  es un alquilo de  $C_5-C_{16}$ , preferentemente de  $C_8-C_{12}$ , en particular de  $C_{11}$ , preferentemente lineal.

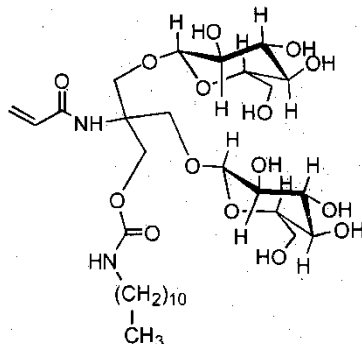
En un modo de realización ventajoso:

55 -  $R_3$  y  $R_4$  son idénticos y representan una glucosa, una manosa o una galactosa, preferentemente una glucosa, y

-  $R_5$  es un alquilo de  $C_5-C_{16}$ , preferentemente de  $C_8-C_{12}$ , en particular de  $C_{11}$ , ventajosamente lineal.

Un polímero particularmente ventajoso según la invención comprende por lo menos un 75%, preferentemente por lo menos un 80%, ventajosamente por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99%, incluso el 100% de monómeros anfífilos de fórmula (III):

5



(III)

Los monómeros de fórmula (I), (II) o (III) tal como se ha descrito anteriormente, son unos monómeros de motivo acrílico o vinílico que comprenden una cadena grasa hidrófoba y dos grupos hidrófilos (grupos glicosídicos o residuos zwitteriónicos). Son sintetizables por unas reacciones químicas bien conocidas por los especialistas, tales como unas reacciones de glicosilación, de amidificación o por el uso de isocianato. La síntesis del monómero de fórmula (III) se describe en detalle en los ejemplos. Una vía de síntesis muy comparable se puede utilizar para injertar unas galactosas o manosas en el lugar de las glucosas, y/o para injertar otro tipo de cadena grasa, en particular cualquier otra cadena alquilo.

10

15

El polímero según la invención comprende principalmente unos monómeros anfífilos. En un modo de realización ventajoso, el polímero según la invención es un homopolímero que comprende el 100% de monómeros de fórmula (I), (II) o (III) tal como se ha definido anteriormente, que forman una cadena homogénea, eventualmente enlazada en la cabeza de la cadena a otro grupo.

20

En efecto, se pueden preparar los polímeros según la invención por polimerización iniciada por unos iniciadores radicalarios tales como AIBN o el peróxido de benzoilo, en unos disolventes anhidros llevados a un mínimo de 60°C tales como el THF, el acetonitrilo o también el metanol, siendo el disolvente preferido el THF. Ventajosamente, el tamaño del polímero durante su síntesis es controlado por adición de agente de transferencia de cadena de tipo tiol, controlando el tamaño del polímero la relación de las concentraciones de este último y del monómero. La segunda ventaja de la presencia de este agente de transferencia es permitir la introducción en el extremo de cadena de un grupo específico susceptible de ser utilizado por sus propiedades particulares. Así, en este caso, el polímero según la invención comprende un grupo específico en la cabeza de la cadena del polímero. Cuando se hace referencia a un homopolímero según la invención, esto incluye por lo tanto la posibilidad de la presencia en la cabeza de la cadena del polímero de un grupo específico distinto que proviene del agente de transferencia de la cadena, y que ha podido ser después modificado.

25

30

En particular, el polímero según la invención puede comprender además en la cabeza de la cadena (es decir en uno de sus extremos) un grupo que comprende una función tiol de fórmula  $R_9-S-$ , en la que  $R_9$  se selecciona ventajosamente de entre:

35

- $(CH_2)_m$  COOH siendo  $m = 1$  a 11,
- $(CH_2)_m$ -NH<sub>2</sub> siendo  $m = 2$  a 11,
- $(CH_2)_m$ -X- $R_{10}$  siendo  $m = 1$  a 11; X = O, NH, COO, CONH, S, fosfonato  $P(O)(O-R_{10})_2$ ; y  $R_{10}$  se selecciona de entre H, CH<sub>3</sub>, un grupo benzoilo o bencilo, un agente fluorescente (tal como el NBD, un derivado de la fluoresceína o de la rodamina, etc.) una biotina, un polisacárido (en particular un trisacárido) lineal o ramificado que comprende unas hexosas, un agente de captura de radicales libres tal como una nitrona o una especie paramagnética cíclica de tipo nitróxido.
- $(CH_2)_m$ -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>S- $R_{11}$  estando  $m$  comprendido entre 1 y 10,  $p$  comprendido entre 2 y 11, y  $R_{11}$  seleccionado de entre H, -C(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, un agente fluorescente tal como el NBD o la fluoresceína, un agente de captura de radicales libres tal como una nitrona o una especie paramagnética cíclica de tipo nitróxido, un oligómero derivado de un monómero acrílico o vinílico tal como el acrilato de metilo, la acrilamida, el THAM, el acetato de vinilo.
- $(CH_2)_m$ -CO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>S- $R_{11}$  estando  $m$  comprendido entre 1 y 10,  $x$  comprendido entre 3 y 100,  $p$

50

comprendido entre 2 y 11, y R<sub>11</sub> es tal como se ha definido anteriormente,

- (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-O-R<sub>10</sub> siendo q = 1 a 100, y R<sub>10</sub> es tal como se ha definido anteriormente,
- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CONHC(CH<sub>2</sub>OR<sub>12</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONHC(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>OR<sub>12</sub>)<sub>2</sub>, o -CH<sub>2</sub>CONHCH(CH<sub>2</sub>OR<sub>12</sub>)<sub>2</sub> estando r comprendido entre 1 y 11, y R<sub>12</sub> se selecciona de entre H, un grupo bencilo o un grupo benzoilo, un agente fluorescente (tal como el NBD, un derivado de la fluoresceína o de la rodamina), una biotina, un monosacárido o un polisacárido lineal o ramificado, eventualmente aminado, preferentemente compuesto por monómeros de manosa, galactosa, glucosa, ácido siálico, glucosamina, galactosamina y/o manosamina, un agente de captura de radicales libres tal como una nitrona o una especie paramagnética cíclica de tipo nitróxido.
- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> P(O)(OR<sub>13</sub>)<sub>2</sub> estando m comprendido entre 2 y 11, y R<sub>13</sub> representa un grupo alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>16</sub> lineal, eventualmente sustituido,
- una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 3 a 20 átomos de carbono, saturada o insaturada, eventualmente sustituida, en particular por uno o varios grupos OH, ventajosamente un grupo alquilo lineal de C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> o alquenilo lineal de C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> eventualmente sustituido con uno o más grupos OH (como el fitol por ejemplo), o
- una cadena perfluorada de fórmula C<sub>t</sub>F<sub>2t+1</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> estando t comprendido entre 2 y 10 y m comprendido entre 2 y 10.

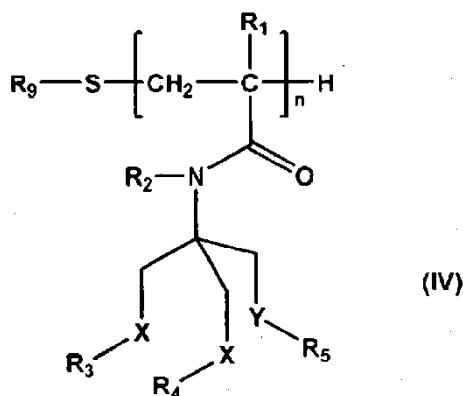
El conjunto de estos compuestos de tipo tiol es o bien accesible comercialmente, o bien preparado fácilmente por unas reacciones químicas simples de alto rendimiento.

Por "alquenilo lineal de C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>" se entiende una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 3 a 20 átomos de carbono y que comprende por lo menos un doble enlace.

Ventajosamente, R<sub>9</sub> representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CONHC(CH<sub>2</sub>OR<sub>12</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONHC(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>OR<sub>12</sub>)<sub>2</sub>, o -CH<sub>2</sub>CONHCH(CH<sub>2</sub>OR<sub>12</sub>)<sub>2</sub> estando r comprendido entre 1 y 11, en la que R<sub>9</sub> representa H, un grupo bencilo o un grupo benzoilo, un agente fluorescente (tal como NBD, un derivado de la fluoresceína o de la rodamina), una biotina, o un monosacárido o un polisacárido lineal o ramificado, eventualmente aminado, preferentemente compuesto de monómeros de manosa, galactosa, glucosa, ácido siálico, glucosamina, galactosamina y/o manosamina.

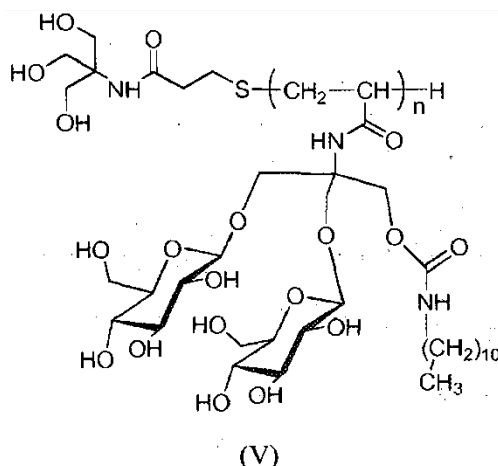
Un agente de transferencia de cadena particularmente preferido es aquél en el que R es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONHC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>.

En el caso en el que el polímero según la invención comprenda el 100% de los monómeros de fórmula (I), esto resulta entonces en un polímero de fórmula (IV):



en la que R<sub>1</sub> a R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub> son tales como se han definido anteriormente, y n es tal que el polímero posee una masa molar media comprendida entre 8000 y 100000, lo cual corresponde a que n esté comprendido entre 10 y 120, ventajosamente sea inferior o igual a 50000 (n inferior o igual a 60), preferentemente comprendido entre 8000 y 50000 (n comprendido entre 10 y 60).

Un polímero según la invención muy particularmente preferido es el de fórmula (V):



en la que  $n$  está comprendido entre 1 y 120, preferentemente entre 1 y 60.

5 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de un polímero anfífilo según la invención, que comprende la reacción de un monómero de fórmula (I), (II) o (III) tal como se ha descrito anteriormente con un agente de transferencia de cadena en presencia de un iniciador radicalario en un disolvente anhidro a por lo menos 60°C.

10 El agente de transferencia de cadena es un compuesto de tipo tiol, preferentemente de fórmula (VI):



en la que  $R_9$  es tal como se ha definido anteriormente.

15 El iniciador radicalario puede ser en particular el azobisisobutironitrilo (AIBN) o el peróxido de benzoilo.

20 La invención se refiere asimismo a un complejo hidrosoluble de un compuesto hidrófobo o anfífilo, ventajosamente una proteína membranaria y de un polímero anfífilo según la invención. Ventajosamente, la proteína membranaria se selecciona de entre el grupo constituido por las enzimas membranarias, los receptores membranarios, los canales iónicos membranarios, los antígenos membranarios de microorganismos o de tumores, y las proteínas medicamentosas (tales como en particular los anticuerpos). El complejo según la invención puede presentarse además en forma congelada o liofilizada.

25 La invención se refiere asimismo a una solución acuosa que posee una concentración superior a 1 g/l, ventajosamente superior a 2 g/l, 3 g/l, o 4 g/l, preferentemente superior a 5 g/l, 6 g/l, 7 g/l, 8 g/l, 9 g/l, o 10 g/l, de uno o varios complejo(s) según la invención. La concentración es ventajosamente inferior a 500 g/l. Preferentemente, la concentración de la solución está entre 10 y 500 g/l.

30 La invención se refiere también a un producto que comprende un soporte y por lo menos un complejo según la invención, estando dicho complejo fijado sobre dicho soporte por medio del polímero anfífilo según la invención.

35 Por último, la invención se refiere a la utilización de un complejo, de una solución acuosa o de un producto según la invención para detectar la presencia o la ausencia en una muestra biológica de un ligando de dicho compuesto hidrófobo o anfífilo.

### Descripción de las figuras

40 Figura 1. Estimación por filtración sobre tamiz molecular del tamaño y de la dispersidad de las partículas de telómero anfífilo. Se han diluido cien  $\mu$ l de una solución madre de homotelómero (lote SS174) en 900  $\mu$ l de tampón Tris/HCl (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH = 8,5) y se han inyectado en una columna de Superose 12 10-300GL. Se ha efectuado la elución con el tampón Tris y la detección a 220 nm.  $V_0$  y  $V_T$  indican respectivamente el volumen excluido y el volumen total de la columna (respectivamente 7,53 y 19,9 ml). El radio de Stokes aparente es de 2,6 nm. Para comparación, se ha analizado una muestra de amphipol aniónico clásico de tipo A8-35 en las mismas condiciones (lote FGH20). El radio de Stokes aparente de las partículas de A8-35 es de 3,15 nm.

50 Figura 2. Estimación por filtración sobre tamiz molecular del tamaño y de la dispersidad de los complejos tOmpA/telómero anfífilo. Se ha capturado el campo transmembranario (tOmpA) de la proteína OmpA de la membrana externa de la bacteria *Escherichia coli* con la ayuda de un homotelómero anfífilo con dos relaciones



másicas proteína/polímero diferentes, 1:4 (pico central) o 1:10 (pico de la derecha) y las muestras diluidas en el tampón Tris/HCl (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH = 8,5) inyectadas en una columna de Superose 12 10-300GL. La elución se ha efectuado con el tampón Tris y la detección a 280 nm. Los picos se han normalizado al mismo máximo.  $V_0$  y  $V_T$  indican respectivamente el volumen excluido y el volumen total de la columna. Para comparación, se ha analizado una muestra de tOmpA capturado con el amphipol aniónico clásico de tipo A8-35 en las mismas condiciones (pico de la izquierda). Los volúmenes de elución son, de izquierda a derecha, 11,9, 12,2 y 12,6 ml; las anchuras de pico a media altura son respectivamente de 1,00, 1,13 y 0,89 ml.

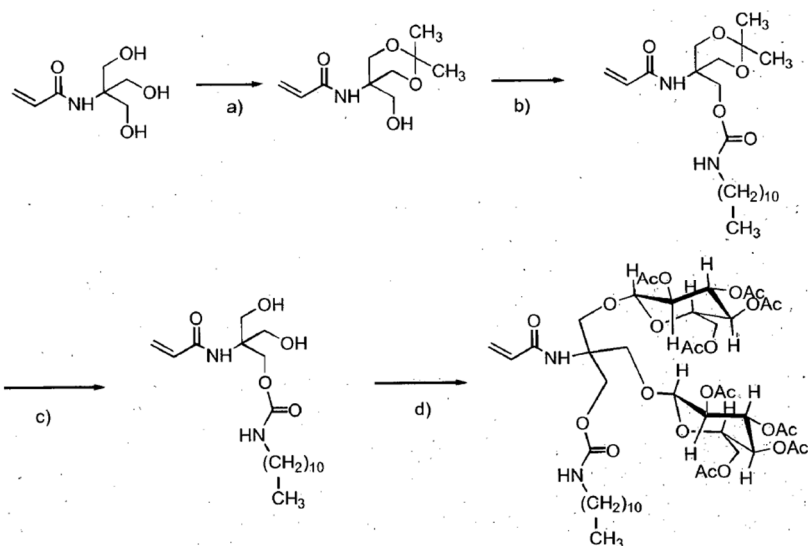
Figura 3. Espectro de absorción UV/visible de la bacteriorodopsina después de la captura con A8-35 o con unos homotelómeros no iónicos. Se ha capturado la BR a una relación en masa proteína/amphipol de 1:5, siendo el amphipol o bien el A8-35 (lote FGH20; en negro), o bien un homotelómero no iónico (lote SS174; en gris; lote SS298: en líneas discontinuas negras). Los espectros se han registrado justo después de la eliminación del detergente (2h de incubación a 4°C con BioBead, centrifugación a 16.000 x g durante 30 minutos).

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Preparación de los homopolímeros anfífilos

#### 1.1. Síntesis del monómero acrilamida diglucosilado: ejemplo de *N*-(1,1-di-(*O*-β-*D*-glucopiranosiloximetil)-1-(undecilcarbamoiloximetil)metil)acrilamida.

Según un primer procedimiento, que es el que ha generado los monómeros que han sido utilizados a continuación en los ejemplos, la síntesis se desarrolla en tres etapas a partir del THAM comercial (que puede ser obtenido con un rendimiento superior al 90% a partir del Tris-(hidroximetil)aminometano), según el esquema 1 siguiente.



Esquema 1. Primer procedimiento de síntesis del monómero acrilamida diglucosilado.

Reactivos y condiciones de reacciones: a)  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , apts, 20°, R = 80%;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{NCO}$ , DABCO, tolueno, 80°C, R = 98%; resina MK-10, 48h,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 84%;  $\text{HgCN}_2$ , drierita, tolueno, acetobromoglucosa (3 equivalentes), r = 63%

#### Síntesis del THAM isopropilideno

En primer lugar, se bloquean dos funciones hidroxilos en forma de un grupo isopropilideno tratando durante 24h el THAM con dimetoxipropano en presencia de una cantidad catalítica de ácido paratoluensulfónico en el acetonitrilo a temperatura ambiente. Después del tratamiento habitual, el THAM isopropilideno cristaliza y se aísla con un rendimiento del 80%.

#### 5-acrilamido-5-undecilcarbamoiloximetil-2,2-dimetil-ciclo 1,3 dioxahexano

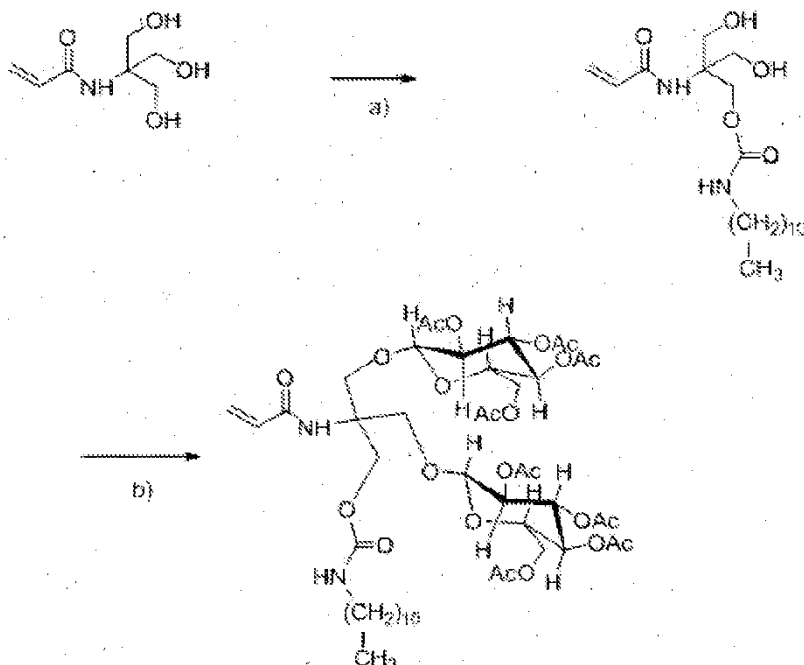
El THAM isopropilideno (2,64 g, 12,28 mmoles, 1,0 eq.) y el 1,4-diaza bicyclo[2,2,2]octano DABCO (4,05 g, 14,74 mmoles, 1,2 eq.) se disuelven en tolueno anhidro y la mezcla se calienta a reflujo durante 30 minutos bajo argón. El dodecil isocianato (2,91 g, 14,74 mmoles, 1,2 eq.) en solución en tolueno se añade gota a gota a la solución mantenida a 80°C. Después de 12h de agitación, se añaden 5 gotas de metanol y la mezcla se vierte en el acetato de etilo (150 ml). La fase orgánica se lava con HCl 1N (3 x 100 ml) y una solución saturada de NaCl (2 x

100 ml), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentra al vacío para dar lugar al compuesto THAM isopropilideno dotado de una cadena undecilo enlazada por un grupo carbamato (5,0 g, 12,12 mmoles, 98%) en forma de un polvo blanco.  $R_f$  ~ 0,7, etilacetato/ciclohexano (7:3 v/v). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$   $\delta$  7,01 (s, 1H), 6,21 (dd,  $J = 1,6$  y 17,0 Hz, 1H), 6,08 (dd,  $J = 10,0$  y 17,0 Hz, 1H), 5,65 (dd,  $J = 1,6$  y 10,0 Hz, 1H), 4,99 (m, 1H), 4,72 (d,  $J = 12,1$  Hz, 2H), 3,62 (d,  $J = 12,0$  Hz, 2H), 3,20 (q,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,62 (s, 3H), 1,48 (m, 2H), 1,42 (s, 3H), 1,27 (s, 18H), 0,89 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H), RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$   $\delta$  165,7, 157,6 (CO), 131,4 (CH), 126,5 ( $\text{CH}_2$ ), 98,5 (C), 64,9, 60,5 ( $\text{CH}_2$ ), 53,5 (C), 43,0, 41,3, 31,9, 31,3, 29,8, 29,6, 29,6, 29,5, 29,3, 26,7 ( $\text{CH}_2$ ), 26,6 ( $\text{CH}_3$ ), 22,7 ( $\text{CH}_2$ ), 21,0, 14,1 ( $\text{CH}_3$ ).

*N*-(1,1-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosiloxi-metil)-1-(undecilcarbamoiloximetil)-metil)-acril-amida

El compuesto anterior (5,0 g, 12,12 mmoles) y la resina MK-10 (30 g) se agitan en diclorometano (200 ml) durante 48h, la resina se filtra después sobre una columna corta de celite y se aclara en metanol (2 x 100 ml). La fase orgánica se concentra al vacío para dar lugar al *N*-(1,1-bishidroximetil-1-(undecilcarbamoiloximetil)metil)-acrilamida (3,8 g, 10,2 mmoles, 84%). Se mezcla este compuesto (2,0 g, 5,37 mmoles, 1,0 eq.), cianuro de mercurio (2,13 g, 16,10 mmoles, 3,0 eq.) y drierita en tolueno bajo argón. Después de 2 minutos de sonicación, se añade la bromotetraacetilglucosa TAGB (6,62 g, 16,10 mmoles, 3 eq.) y la mezcla se somete a sonicación durante 30 minutos. La mezcla de reacción se filtra después sobre celite y se aclara con acetato de etilo (100 ml). Las fases orgánicas se lavan sucesivamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 100 ml), agua (100 ml), solución al 10% de yoduro de potasio (4 x 50 ml), solución saturada de tiosulfato tiosulfato (4 x 50 ml) y agua (2 x 50 ml). Las fases orgánicas se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentran bajo presión reducida, el bruto resultante se somete a una cromatografía ultrarrápida, se eluye con etilacetato/ciclohexano (3:7 v/v) para conducir al monómero esperado en forma de un polvo blanco. (3,5 g, 3,39 mmoles, 63%).  $R_f$  ~ 0,35, etilacetato/ciclohexano (7:3 v/v). P.f. 58,0°C.  $[\alpha_D^{25}] = -12,70$  (c, 1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$   $\delta$  6,92 (s, 1H), 6,24 (dd,  $J = 1,4$  y 16,0 Hz, 1H), 6,04 (dd,  $J = 10,0$  y 16,9 Hz, 1H), 5,64 (dd,  $J = 1,4$  y 10,0 Hz, 1H), 5,3-4,9 (m, 7H), 4,5 (m, 2H), 4,4-3,9 (m, 10H), 3,71 (dt,  $J = 2,4$  y 7,3 Hz, 2H), 3,16 (q,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 2,11, 2,09, 2,07, 2,05, 2,02 (5s, 24H), 1,34 (m, 18H), 0,89 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$   $\delta$  170,8, 170,7, 170,7, 170,2, 169,6, 169,5, 169,5, 169,5, 165,7, 157,2 (CO), 131,3 (CH), 126,6 ( $\text{CH}_2$ ), 101,0, 100,8, 77,3, 72:6, 72,5, 71,8, 71,8, 71,1, 68,3, 68,2, (CH), 68,6, 68,3, 68,0, 64,5, 61,7, 60,4 ( $\text{CH}_2$ ), 59,6 (C), 41,2, 31,9, 29,8, 29,6, 29,3, 26,9, 26,8, 26,8, 22,7 ( $\text{CH}_2$ ), 21,1, 20,8, 20,8, 20,7, 20,7, 20,6, 20,6, 20,6, 14,2 ( $\text{CH}_3$ ). HRMS (ESI+) calculado para  $\text{C}_{47}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{23}$  ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ): 1033,4599. Encontrado: 1033,4609  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

Según un procedimiento alternativo, la síntesis del monómero acrilamida (*N*-(1,1-di(-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosiloximetil)-1(undecilcarbamoiloximetil)metil)acrilamida) se desarrolla en dos etapas a partir del THAM comercial (que puede ser obtenido con un rendimiento superior al 90% a partir del Tris-(hidroximetil)aminometano), según el esquema 1 siguiente.



Esquema 2. Segundo procedimiento de síntesis del monómero acrilamida diglicosilado.

Reactivos y condiciones de reacciones: a) THAM (5 eq.),  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{NCO}$  (1 eq.), DABCO (0,5 eq.), DMF, 60°C, 3H,  $R = 80\%$ ; b)  $\text{HgCN}_2$ , drierita, tolueno, acetobromoglucosa (3 eq.),  $r = 63\%$

N-1,1-di(hidroximetilmetil)-1(undecilcarbamoiloximetil)-metil)acrilamida

A una solución agitada de THAM (21,9 g, 125 mmoles, 5 eq.) y de diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO) (1,5 g, 13,4 mmoles, 0,5 eq.) en 40 ml de DMF calentado a 60°C, se añade gota a gota bajo atmósfera de argón el undecilisocianato (5g, 25 mmoles, 1 eq.) previamente solubilizado en 10 ml de cloruro de metileno. La mezcla de reacción se mantiene a 60°C hasta la desaparición total del undecilisocianato (~30 mn). Los disolventes se evaporan después bajo presión reducida y el precipitado se recoge con 200 ml de cloruro de metileno. La suspensión se agita mecánicamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado residual se filtra y se resuspende de nuevo en 100 ml de cloruro de metileno y se filtra de nuevo. La operación se reproduce dos veces. El precipitado restante se recrystaliza inmediatamente en metanol anhidro para dar 16,5 g de THAM que puede así ser puesto de nuevo en reacción. Las fases orgánicas se juntan, se lavan con 2x50 ml de una solución de HCl 1N, 2x50 ml de una solución saturada de carbonato de sodio y 2x50 ml de agua, se secan sobre sulfato de sodio y se concentran bajo presión reducida. El producto bruto se cristaliza en una solución de AcOEt/Hexano 2/8 para dar el N-1,1-di(hidroximetilmetil)-1(undecilcarbamoiloximetil)-metil)acrilamida en forma de polvo blanco (7,55 g, R = 80%). Rf ~ 0,5 (etilacetato/ciclohexano (8:2 v/v)). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,56 (s, 1H), 7,12 (t, J = 5, 1H), 6,36 (dd, J = 10 y 17,5 Hz, 1H), 6,04 (dd, J = 2,2 y 17,5 Hz, 1H), 5,56 (dd, J = 2,2 y 10 Hz, 1H), 4,87 (m, 2H), 4,17, (s, 2H), 3,63 (s, 2H), 3,61 (s, 2H), 2,95 (m, 2H), 1,37 (m, 2H), 1,24 (m, 16H), 0,86 (t, J = 6,75, 3H). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 166,5, 156,8, 132,8, 125,5 (CO), 62,6, 61,5, 60,4 (CH<sub>2</sub>), 31,8, 29,9, 29,5, 29,2, 29,3, 26,7, 22,6, 14,5 (CH<sub>3</sub>).

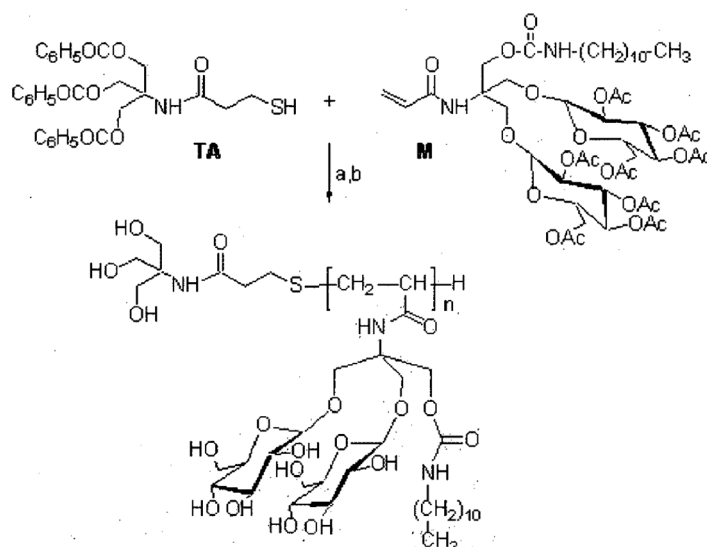
N-(1,1-(2',3',4',6'tetra-O-acetil-β-D-glucopianosiloxi-metil)-1-(undecilcarbamoiloximetil)-metil)-acril-amida

El compuesto anterior (2,0 g, 5,37 mmoles, 1,0 equiv.), cianuro de mercurio (2,13 g, 16,10 mmoles, 3,0 eq.) y drierita se mezclan en tolueno bajo argón. Después de 2 minutos de sonicación, se añade la bromotetraacetilglucosa TAGB (6,62 g, 16,10 mmoles, 3 eq.) y se somete la mezcla a sonicación durante 30 minutos. La mezcla de reacción se filtra después sobre celite y se aclara con acetato de etilo (100 ml). Las fases orgánicas se lavan sucesivamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 100 ml), agua (100 ml), solución al 10% de yoduro de potasio (4 x 50 ml), solución saturada de tiosulfato (4 x 50 ml) y agua (2 x 50 ml). Las fases orgánicas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentran bajo presión reducida, el bruto resultante se somete a una cromatografía ultrarrápida, se eluye con etilacetato/ciclohexano (3:7 v/v) para dar lugar al monómero esperado en forma de un polvo blanco. (3,5 g, 3,39 mmoles, 63%). Rf ~ 0,35, etilacetato/ciclohexano (7:3 v/v). P.f. 58,0°C. [α<sub>D</sub><sup>25</sup>] = -12,70 (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,92 (s, 1H), 6,24 (dd, J = 1,4 y 16,0 Hz, 1H), 6,04 (dd, J = 10,0 y 16,9 Hz, 1H), 5,64 (dd, J = 1,4 y 10,0 Hz, 1H), 5,3-4,9 (m, 7H), 4,5 (m, 2H), 4,4-3,9 (m, 10H), 3,71 (dt, J = 2,4 y 7,3 Hz, 2H), 3,16 (q, J = 6,5 Hz, 2H), 2,11, 2,09, 2,07, 2,05, 2,02 (5s, 24H), 1,34 (m, 18H), 0,89 (t, J = 6,6 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 170,8, 170,7, 170,7, 170,2, 169,6, 169,5, 169,5, 169,5, 165,7, 157,2 (CO), 131,3 (CH), 126,6 (CH<sub>2</sub>), 101,0, 100,8, 77,3, 72,6, 72,5, 71,8, 71,8, 71,1, 68,3, 68,2, (CH), 68,6, 68,3, 68,0, 64,5, 61,7, 60,4 (CH<sub>2</sub>), 59,6 (C), 41,2, 31,9, 29,8, 29,6, 29,3, 26,9, 26,8, 26,8, 22,7 (CH<sub>2</sub>), 21,1, 20,8, 20,8, 20,7, 20,7, 20,6, 20,6, 20,6, 14,2 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI+) calculado para C<sub>47</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>23</sub> ([M + H]<sup>+</sup>): 1033,459. Encontrado: 1033,4609 [M+H]<sup>+</sup>.

1,2. síntesis de NAPol.

La síntesis del telómero (esquema 3) se basa en la utilización de un agente de transferencia derivado del ácido mercaptopropiónico dotado de un grupo Tris polibenzoilado. Estos diferentes grupos benzoilos presentan una fuerte absorción UV y se encuentran en el extremo de la cadena del polímero. De este modo, permiten la determinación exacta, por medición de la absorción UV del producto final, de la masa del telómero y por lo tanto del grado de polimerización medio. Cabe señalar en este caso que la selección del motivo tribenzoilado puede ser tomada como un ejemplo de las posibilidades de introducción (por medio de la naturaleza del agente de transferencia utilizado) de motivos interesantes (fluoresceína, colesterol, biotina, nitronas, etc.) y por lo tanto de la funcionalización del extremo de la cadena. Esta funcionalización puede tener lugar también después de la telomerización por medio de grupos de tipo éster activo (tales como hidroxisuccinimida, paranitro-benzoato, pentafluoro-benzoato, etc.) previamente introducidos en el telógeno.

La síntesis del NAPol se resume en el esquema 3 siguiente:



Esquema 3. Ilustración esquemática de la síntesis del homotelómero.

- 5 Reactivos y condiciones: (a) AIBN (0,5 eq.), THF, Ar, 66°C, 24h, ~ 51%; (b) MeONa, MeOH, pH 8-9, temperatura ambiente, 12h, ~ 65% después de la diálisis.

El monómero THAM, N-(1,1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosiloxi-metil)-1-(undecilcarbamioiloximetil)-metil)-acril-amida (1,0 g, 0,968 mmoles, 40,0 eq.) se disuelve en THF (15 ml). La solución se desgasifica por burbujeo de argón y calentamiento a reflujo durante 30 minutos. El agente telógeno TA (12,62 mg, 0,024 mmoles, 1,0 eq.) cuya síntesis se ha descrito anteriormente (Sharma *et al.*) y AIBN (1,98 mg, 0,012 mmoles, 0,5 eq.) disueltos en THF, se añaden entonces con una microjeringa. La mezcla se agita a reflujo hasta la desaparición total del monómero (~24h). Después, se concentra al vacío, y se aísla el telómero por cromatografía de exclusión de tamaño (Sephadex® LH-20) eluyendo con una mezcla de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v), y después se seca al vacío. El telómero en forma protegida se aísla en forma de polvo blanco (0,524 g, 52%).  $R_f = 0,0$  etilacetato/ciclohexano (6:4 v/v). RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) 0,8 (-CH<sub>3</sub> de la cadena alquilo), 1,3-1,7 (-CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub> de la cadena alquilo), 2,1-2,4 (s ancho, -OCOCH<sub>3</sub>), 3,1 (-NH- metileno vecinal), 4,8-5,3 (m, unidad de glucosa 2H, 3H, 4H, 5H, y 6H), 6,6 (-NH), 7,4-8,1 (tres t, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> del TA).

Después de la determinación de la masa molecular por RMN <sup>1</sup>H y UV, el homotelómero (2,0 g, 1,91 mmol) se disuelve en metanol anhidro (50 ml) bajo atmósfera de argón. Se añade una cantidad catalítica de metóxido de sodio MeONa y se agita la solución a temperatura ambiente durante una noche. La solución se neutraliza después con resina IRC 50 ácida (hasta pH = 8) por agitación durante 15 minutos. Después de la filtración de la resina y de la evaporación del disolvente, el telómero se somete a una diálisis con una membrana cuyo punto de corte es de 6-8 KDa. El polímero purificado se aísla por liofilización, se obtiene en forma de polvo blanco (0,850 mg, 65%). RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) 0,8 (-CH<sub>3</sub> de la cadena alquilo), 1,2-1,6 (-CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub> de la cadena alquilo), 3,2 (-NH metileno vecinal), 4,8-5,2 (m, unidad de glucosa 2H, 3H, 4H, 5H, y 6H), 7,1 (-NH).

La técnica implementada es universal y se ha aplicado ya a unos motivos monómeros portadores de azúcar diferentes (galactosa y manosa en particular) y a unos monómeros portadores de cadenas fluorocarbonadas. Por otro lado, puede ser fácilmente extendida a unos cotelómeros que incorporan diversos tipos de monómeros, ya sean anfífilos, hidrófobos o hidrófilos, tal como se ha establecido anteriormente para unas mezclas de monómeros hidrófilos e hidrófobos.

### 35 Ejemplo 2 Reproducibilidad del homotelómero obtenido

Se han sintetizado diferentes homotelómeros, en función de las cantidades relativas de monómero y de agente telógeno TA. Las condiciones de síntesis y la estructura química de los homotelómeros sintetizados se resumen en la tabla 1.

40

Tabla 1. Condiciones de síntesis y estructura química de los diferentes NAPols

NAPol	Homotelómero		Masa Mw media /10 <sup>3</sup> ± 1x10 <sup>3</sup> (g·mol <sup>-1</sup> )	
	Ro <sup>a</sup>	DPn <sup>b</sup>	Protegido	Desprotegido
SS174	20	14	15 ± 1	10 ± 1
SS293	20	11	12 ± 1	8 ± 1

NAPol	Homotelómero		Masa Mw media /10 <sup>3</sup> ± 1x10 <sup>3</sup> (g·mol <sup>-1</sup> )	
	Ro <sup>a</sup>	DPn <sup>b</sup>	Protegido	Desprotegido
SS298	40	42	44,0 ± 1	29 ± 1
SS292	100	90	93 ± 2	63 ± 2
SS325	15	16	17 ± 2	11,3 ± 0,5

<sup>a</sup>Relación molar inicial monómero/TA, <sup>b,c</sup> estimado por análisis UV

Además, se han sintetizado SS298 y SS325 por varios lotes diferentes con los mismos precursores y las mismas condiciones. El análisis de la reproductibilidad de los lotes SS298 se muestra en la tabla 2 siguiente.

5 Tabla 2. Reproducibilidad de los lotes de SS298

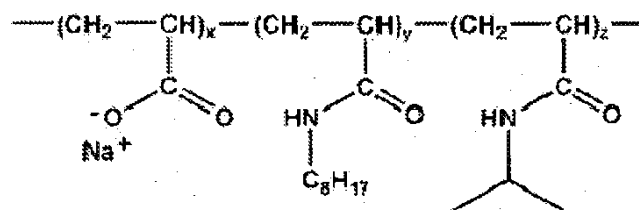
Lotes	Homotelómero		Telómero aislado después de Sephadex LH 20 (mg)	Masa molecular media en forma acetilada determinada por UV M <sub>w</sub> /10 <sup>3</sup> (g·mol <sup>-1</sup> )
	Ro <sup>a</sup>	DPn <sup>b</sup>		
SS291	40	34	478	36
SS294	40	46	532	48
SS295	40	44	524	46
SS296	40	55	534	57
Combinados SS298	40	42	-	44

<sup>a</sup>Relación molar inicial monómero/TA, <sup>b,c</sup> Estimada por análisis UV

Los resultados muestran una buena reproductibilidad de los lotes de homotelómero affílo según la invención.

10 **Ejemplo 3. Caracterización del homotelómero y propiedades fisicoquímicas**

En los ejemplos 3 y 4, los nuevos homotelómeros anfífilos según la invención se comparan con el amphipol de referencia A8-35, que es un amphipol aniónico copolimérico de fórmula:



15 Esquema 4. Fórmula química del amphipol A8-35.

20 Todos los homotelómeros anfífilos según la invención, preparados en el ejemplo 1 presentan, después de la hidrólisis de las funciones ésteres, una solubilidad en agua superior a 100 g/l. Las soluciones son incoloras y se espuman un poco después de una agitación vigorosa. No se puede detectar ninguna concentración micelar crítica (CMC) ni concentración de agregación crítica (CAC) midiendo la tensión de superficie, lo que indica que, al igual que para el amphipol de referencia A8-35, la CAC es extremadamente baja. Unas mediciones de difusión de neutrones en los pequeños ángulos (SANS; no mostradas) y de filtración sobre tamiz molecular (SEC; figura 1) indican que este tipo de telómero se asocia en solución acuosa para dar unas partículas de una masa total del orden de 50 kDa, lo cual corresponde sustancialmente a la asociación de dos moléculas de telómero y está cerca de los valores determinados anteriormente para los amphipols clásicos de tipo A9-35 (~ 40 kDa). Su radio aparente es comparable con el de las partículas de A8-35 (~2,6 frente a ~3,15 nm), así como su dispersibilidad (figura 1). Observadas en difusión cuasi-elástica de la luz (QLS), las soluciones de estos telómeros aparecen formadas por partículas de tamaño homogéneo de 5-6 nm de diámetro, de acuerdo con los datos de SEC (tabla 3). El tamaño de las partículas es poco sensible a la concentración (tabla 3) o a la temperatura (tabla 4).

30 Tabla 3. Diámetro de las partículas de homotelómero no iónico SS174 a concentraciones de 10, 50 y 100 g/l, determinado por QLS a diferentes temperaturas.

Muestra	Concentración (g/l <sup>-1</sup> )	D <sub>H</sub> (nm)	Anchura del pico a media altura (nm)	Distribución volúmica del pico principal (en %)
SS174	10	5,8	1,4	100
	50	5,9	1,5	100
	100	6,3	1,6	100

35

Tabla 4. Diámetro de las partículas de homotelómero no iónico SS298, SS293 y SS292 a una concentración de 50 g/l, determinada por QLS a diferentes temperaturas.

Temp. (°C)	SS298			SS293			SS292		
	$D_H$ (nm)	Anchura del pico a media altura (nm)	Distribución volúmica del pico principal (en %)	$D_H$ (nm)	Anchura del pico a media altura (nm)	Distribución volúmica del pico principal (en %)	$D_H$ (nm)	Anchura del pico a media altura (nm)	Distribución volúmica del pico principal (en %)
2	6,14	1,77	100	5,06	1,52	100	6,63	1,48	99,9
10	5,92	1,68	100	4,91	1,47	100	6,44	1,45	99,9
20	5,74	1,74	100	4,81	1,45	100	6,0	1,69	100
30	5,71	1,74	100	4,82	1,45	100	5,93	1,71	100
40	5,70	1,74	100	4,79	1,42	100	5,92	1,69	100
50	5,62	1,73	100	4,74	1,43	100	5,9	1,76	100
60	5,48	1,76	100	4,70	1,44	100	a	a	a
70	5,47	1,79	100	a	a	a	6,08	1,80	100

<sup>a</sup> no determinado

- 5 Así, la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los homotelómeros anfífilos no iónicos según la invención muestra que estos amphipols tienen unas propiedades similares a las del amphipol copolimérico aniónico A8-35.

#### Ejemplo 4. Complejación del homotelómero con las proteínas membranas

10 Los amphipols son, por definición, unos polímeros anfífilos concebidos para conservar las proteínas membranas solubles y bioquímicamente estables en ausencia de detergentes. La capacidad de los homotelómeros no iónicos según la invención para cumplir estas dos funciones se ha ensayado sobre dos proteínas, la región transmembrana de la proteína OmpA de la membrana externa de *Escherichia coli* (tOmpA) y la bacteriorodopsina (BR). Estas dos proteínas son representativas de los dos grandes tipos de estructuras adoptadas por las proteínas transmembranas, el tonel (tOmpA) y el haz de hélices  $\alpha$  (BR). Por otro lado, la BR es una proteína relativamente inestable en solución detergente, y cuya desnaturalización se mide fácilmente por la liberación de su cofactor, el retinal, lo cual se traduce por una pérdida de absorción alrededor de 564 nm (desaparición de la holoproteína) y la aparición de un pico a 380 nm (debido al retinal libre).

20 Los datos reunidos en la tabla 5 indican que los dos lotes de homotelómeros ensayados son prácticamente tan eficaces como el amphipol aniónico de referencia A8-35 para conservar en solución las dos proteínas después de que la concentración del detergente haya bajado por debajo de su concentración micelar crítica, o bien por dilución con un tampón sin detergente (tOmpA), o bien por adsorción sobre bolas de poliestireno (BR): los porcentajes en solución varían del 75 al 94%, frente al 89-98% después de la complejación por el A8-35, siendo la diferencia observada para tOmpA (~75% frente al ~90%) debida muy probablemente a la densidad más importante de los complejos formados con los amphipols no iónicos, que causa una ligera precipitación durante la centrifugación a alta velocidad utilizada como ensayo de mantenimiento en solución. Se ha utilizado una velocidad más baja para la BR, lo cual explica que la diferencia de mantenimiento en solución sea menos importante (y la precipitación de la proteína en ausencia de amphipol - línea 2 - menos completa).

Experimento	APols	Relación en peso MP/APol	tOmpA en el sobrenadante	BR nativa en el sobrenadante
1	Sin	1:0 ([detergente] > CMC)	98%	85%
2	Sin	1:0 ([detergente] < CMC)	5%	17%
3	A8-35	1:4-1:5	89%	98%
4	SS174	1:4-1:5	76%	93%
5	SS174	1:10	75%	92%
6	SS298	1:5	n.d.	93%
7	SS298	1:10	n.d.	94%

Tabla 5. Capacidad de los telómeros no iónicos para mantener en solución las proteínas membranas

35 Se han añadido unas soluciones detergentes de tOmpA y de BR de homotelómero no iónico del tipo descrito en el esquema 3 anterior, o bien del lote SS174 (4-5), o bien del lote SS298 (6-7), con las relaciones en masa indicadas. Después de 20 minutos de incubación, las soluciones de tOmpA se han diluido con un tampón sin detergente con el fin de rebajar la concentración de detergente por debajo de la cmc, mientras que las de BR estaban adicionadas con bolas de poliestireno (BioBeads), sobre las que se adsorbe el detergente. Después de 2h de incubación, se han centrifugado las soluciones durante 30 minutos a 200000 x g (tOmpA) o a 16000 x g (BR). La fracción de proteína presente en el sobrenadante se ha estimado por medición de la absorción a 280 nm (tOmpA, BR) o a 554 nm (BR).

Los controles incluyen la dilución de las muestras de proteínas en solución detergente con una solución de detergente por encima de la cmc de éste (1), o con un tampón sin detergente (2) y un experimento de captura con el amphipol aniónico A8-35 (3), realizado en las mismas condiciones que los experimentos 4 a 7. n.d.: no determinado.

5 Unos datos preliminares (no mostrados) indican que los complejos BR/telómeros no iónicos son de un tamaño comparable (en SEC) a los complejos BR/A8-35, por lo tanto de un tamaño pequeño compatible con su utilización en bioquímica y biofísica. Este es asimismo el caso para los complejos tOmpA/telómeros no iónicos, como aparece claramente en la figura 2.

10 La inocuidad de los homotelómeros no iónicos frente a BR se ilustra (figura 3) por los espectros UV/visibles de la BR capturada en A8-35 o con cada uno de los dos lotes de homotelómero no iónico ensayados. En los tres casos, la relación de las absorciones a 554 y 280 nm y la ausencia de pico significativo a 380 nm indican que la proteína está en su forma nativa y no ha liberado su cofactor. (La absorbancia ligeramente más elevada a 280 nm de la muestra capturada con el lote SS174 se debe a una ligera turbidez).

15 En resumen, los ensayos bioquímicos efectuados permiten afirmar que los homotelómeros anfífilos no iónicos según la invención a) capturan eficazmente las proteínas membranaarias y las mantienen en solución en ausencia de detergente; b) forman con ellas pequeños complejos de un tamaño y de una dispersibilidad comparables a los complejos formados con los amphipols aniónicos tales como A8-35; y c) estabilizan las proteínas membranaarias con respecto a las soluciones detergentes. En otras palabras, estos polímeros poseen todas las características que hacen de ellos unos amphipols, y son susceptibles de prestarse a todas las aplicaciones de estos últimos, con la ventaja suplementaria de que les confiere su carácter no iónico, la reproductibilidad elevada de su síntesis, y la facilidad con la cual es posible o bien injertarlos uno y sólo un grupo funcional determinado por cadena telomérica, o bien funcionalizarlos de manera estocástica, como se ha realizado anteriormente para A8-35.

25

#### Referencias

30 Prata, C., Giusti, F., Gohon, Y., Pucci, B., Popot, J.-L. & Tribet, C. (2001). Non-ionic amphiphilic polymers derived from Tris(hidroximetil)-acrylamidomethane keep membrane proteins soluble y native in the absence of detergent. *Biopolymers* 56, 77-84.

35 Sharma, K. S., Durand, G., Giusti, F., Olivier, B., Fabiano, A.-S., Bazzacco, P., Dahmane, T., Ebel, C., Popot, J.-L. & Pucci, B. (2008). Glucose-based amphiphilic telomers designed to keep membrane proteins soluble in aqueous solutions: synthesis y physical-chemical characterization. *Langmuir*- 24, 13581-13590.

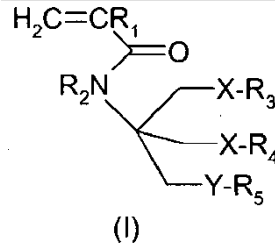
Tribet, C., Audebert, R. & Popot, J.-L. (1996). Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15047-15050.

40 WO 1998/027434

WO 2008/058963

## REIVINDICACIONES

1. Polímero anfífilo que comprende por lo menos 75% de monómeros anfífilos de fórmula (I):



5

en la que

10

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de entre H o un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

10

X e Y se seleccionan independientemente de entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo carbonilo (-COO-) u oxicarbonilo (-O(CO)-), un grupo uretano (-OCONH-), y un grupo amida de fórmula (-CONR<sub>6</sub>-) o (-NR<sub>6</sub>CO-) en las que R<sub>6</sub> es un átomo de hidrógeno o un alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

15

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre:

20

- a) los grupos glicosídicos,
- b) los residuos zwitteriónicos,
- c) los grupos poli(oxialquileno) de fórmula -(O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>)<sub>y</sub>-OH, en la que x está comprendido entre 1 y 6, ventajosamente x vale 2, e y está comprendido entre 4 y 30,
- d) los grupos alquilamidas de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONR<sub>7</sub>R<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NR<sub>7</sub>COR<sub>8</sub> en las que n está comprendido entre 1 y 4, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente de entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo glicosídico, un residuo zwitteriónico o un grupo poli(oxialquileno) de fórmula -(O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>)<sub>y</sub>-OH, en la que x e y son tales como se han definido anteriormente,

25

30

R<sub>5</sub> es una cadena hidrocarbonada cíclica (R<sub>5</sub> puede contener uno o dos ciclos saturados o no, en particular de tipo ciclohexano, ciclopentano o aromático) o acíclica (lineal o ramificada), saturada o insaturada (una o varias insaturaciones) que comprende de 5 a 16 átomos de carbono, o una cadena semifluorocarbonada de fórmula C<sub>t</sub>F<sub>2t+1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> estando t comprendido entre 2 y 10 y m comprendido entre 2 y 10;

35

estando la masa molar media en peso del polímero comprendida entre 800 y 100000.

35

2. Polímero anfífilo según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> son un átomo de hidrógeno.

3. Polímero anfífilo según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que X es un átomo de oxígeno.

40

4. Polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que Y es un grupo uretano (-OCONH-).

45

5. Polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que R<sub>3</sub> y/o R<sub>4</sub> son unos grupos glicosídicos seleccionados de entre:

45

- los mono- o di-sacáridos, en particular las mono- o di-hexosas de tipo glucosa, manosa, galactosa, lactosa, alosa, altrosa, idosa, lactosa, maltosa y celobiosa, o
- los mono- o di-sacáridos aminados, tales como la glucosamina, la galactosamina, la fructosamina, la manosamina, y el aminolactitol.

50

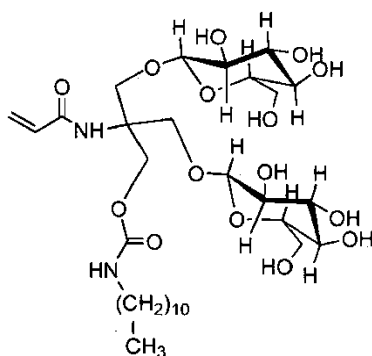
6. Polímero anfífilo según la reivindicación 5, caracterizado por que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son unas glucosas.

55

7. Polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que R<sub>5</sub> es un grupo alquilo de C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub>, ventajosamente un grupo alquilo lineal de C<sub>11</sub>.

8. Polímero anfífilo según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende por lo menos 75% de monómeros de fórmula (III):



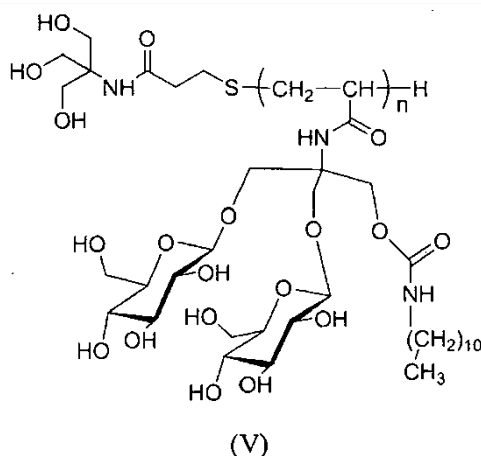


5 9. Polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que comprende el 100% de monómeros anfífilos de fórmula (I) o (III).

10. Polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que comprende además en la cabeza de la cadena un grupo que comprende una función tiol de fórmula  $R_9-S-$ , siendo  $R_9$  seleccionado de entre:

- 10 -  $(CH_2)_m$  COOH siendo  $m = 1$  a  $11$ ,
- $(CH_2)_m-NH_2$  siendo  $m = 2$  a  $11$ ,
- 15 -  $(CH_2)_m-OR_{10}$  siendo  $m = 1$  a  $11$ ;  $X = O, NH, COO, CONH, S$ , fosfonato  $P(O)(O-R_{10})_2$ ; y  $R_{10}$  se selecciona de entre  $H, CH_3$ , un grupo benzoilo o bencilo, un agente fluorescente, una biotina, un polisacárido lineal o ramificado que comprende unas hexosas, un agente de captura de radicales libres,
- 20 -  $(CH_2)_m-CONH(CH_2)_p-S-R_{11}$  estando  $m$  comprendido entre  $1$  y  $10$ ,  $p$  comprendido entre  $2$  y  $11$ , y  $R_{11}$  se selecciona de entre  $H$  y  $-C(C_6H_5)_3$ , un agente fluorescente, un agente de captura de radicales libres, un oligómero derivado de un monómero acrílico o vinílico.
- $(CH_2)_m-CO(OCH_2CH_2)_x-OCO(CH_2)_p-S-R_{11}$  estando  $m$  comprendido entre  $1$  y  $10$ ,  $x$  comprendido entre  $3$  y  $100$ ,  $p$  comprendido entre  $2$  y  $11$ , y  $R_{11}$  se selecciona de entre  $H$  y  $-C(C_6H_5)_3$ ,
- 25 -  $(CH_2)_2-(OCH_2CH_2)_q-O-R_{10}$  siendo  $q = 1$  a  $100$ , y  $R_{10}$  se selecciona de entre  $H, CH_3$ , un grupo benzoilo o bencilo, un agente fluorescente, una biotina, un monosacárido o un polisacárido lineal o ramificado, eventualmente aminado,
- 30 -  $(CH_2)_r-CONHC(CH_2OR_{12})_3, -CH_2CONHC(CH_3)(CH_2OR_{12})_2$ , o  $CH_2CONHCH(CH_2OR_{12})_2$  estando  $r$  comprendido entre  $1$  y  $11$ , y  $R_{12}$  se selecciona de entre  $H$ , un grupo bencilo o un grupo benzoilo, un agente fluorescente, una biotina, un monosacárido o un polisacárido lineal o ramificado, eventualmente aminado,
- $(CH_2)_m P(O)(OR_{13})_2$  estando  $m$  comprendido entre  $2$  y  $11$ , y  $R_{13}$  representa un grupo alquilo de  $C_1$  a  $C_{16}$  lineal, eventualmente sustituido,
- 35 - una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de  $3$  a  $20$  átomos de carbono, saturada o insaturada, eventualmente sustituida, o
- 40 - una cadena perfluorada de fórmula  $C_tF_{2t+1} (CH_2)_m$  estando  $t$  comprendido entre  $2$  y  $10$  y  $m$  comprendido entre  $2$  y  $10$ .

11. Polímero anfífilo según la reivindicación 10, de fórmula (V):



en la que n es tal que el polímero posee una masa molar media comprendida entre 8000 y 100000, preferentemente entre 8000 y 50000.

- 5
12. Procedimiento de preparación de un polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende la reacción de un monómero de fórmula (I) o (III) con un agente de transferencia de cadena en presencia de un iniciador radicalario en un disolvente anhidro a por lo menos 60°C.
- 10
13. Complejo hidrosoluble de un compuesto hidrófobo o anfífilo, ventajosamente una proteína membranaria, y de un polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 15
14. Complejo según la reivindicación 13, caracterizado por que la proteína membranaria se selecciona de entre el grupo constituido por las enzimas membranarias, los receptores membranarios, los canales iónicos membranarios, los antígenos membranarios de microorganismos o de tumores, y las proteínas medicamentosas tales como los anticuerpos.
15. Complejo según la reivindicación 13 o 14, en forma congelada o liofilizada.
- 20
16. Solución acuosa que posee una concentración superior a 1 g/l, ventajosamente entre 10 y 500 g/l, de uno o varios complejos según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.
- 25
17. Producto que comprende un soporte y por lo menos un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, estando dicho complejo fijado sobre dicho soporte por medio del polímero anfífilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 30
18. Utilización de un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, de una solución acuosa según la reivindicación 16, o de un producto según la reivindicación 17, para detectar la presencia o la ausencia en una muestra biológica de un ligando de dicho compuesto hidrófobo o anfífilo.

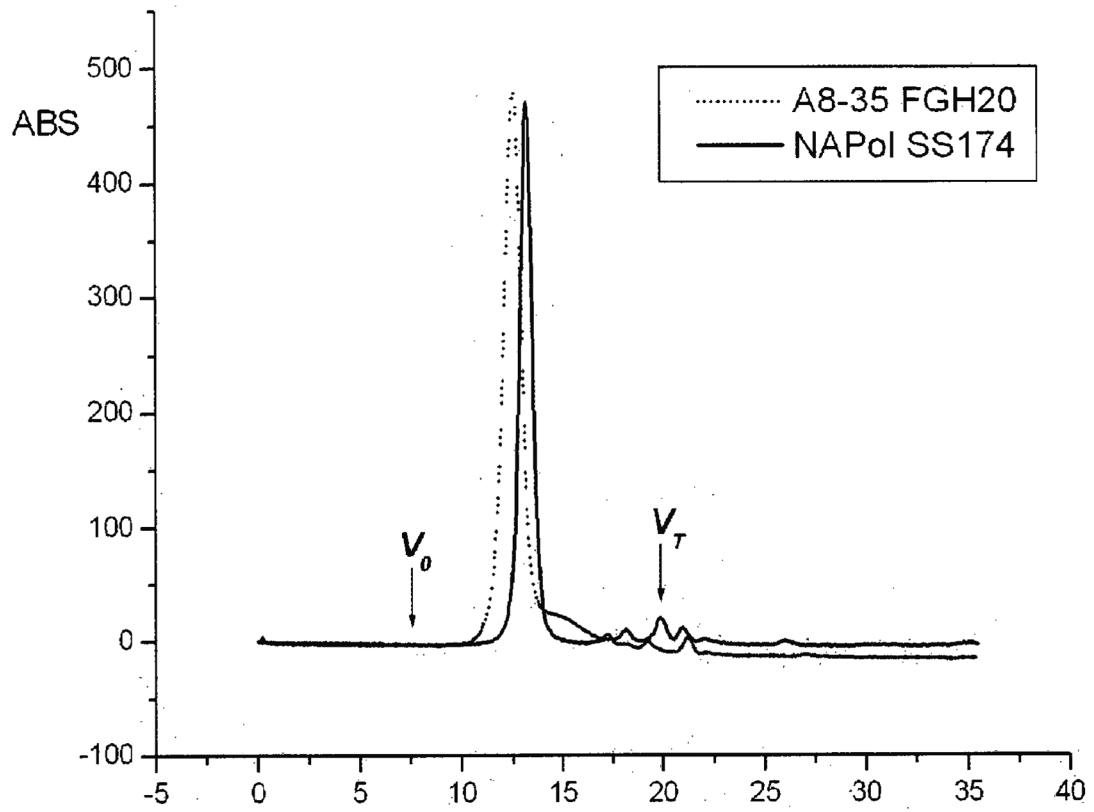
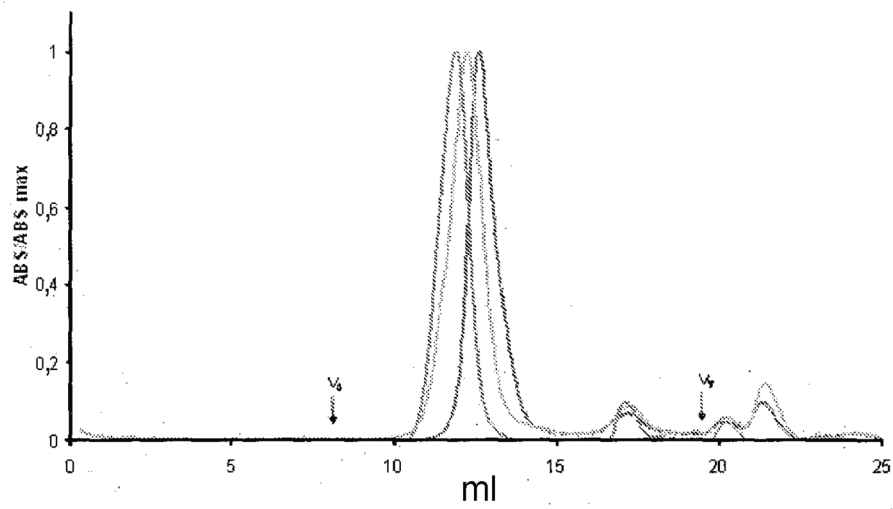


Figura 1



Complejos	Relación tOmpA/APol	$V_e$ (ml)	HHW (ml)	Pico
tOmpA/SS174	1:10	12,6	0,89	derecho
tOmpA/SS174	1:4	12,2	1,13	central
tOmpA/A8-35	1:4	11,9	1,00	izquierdo

Figura 2

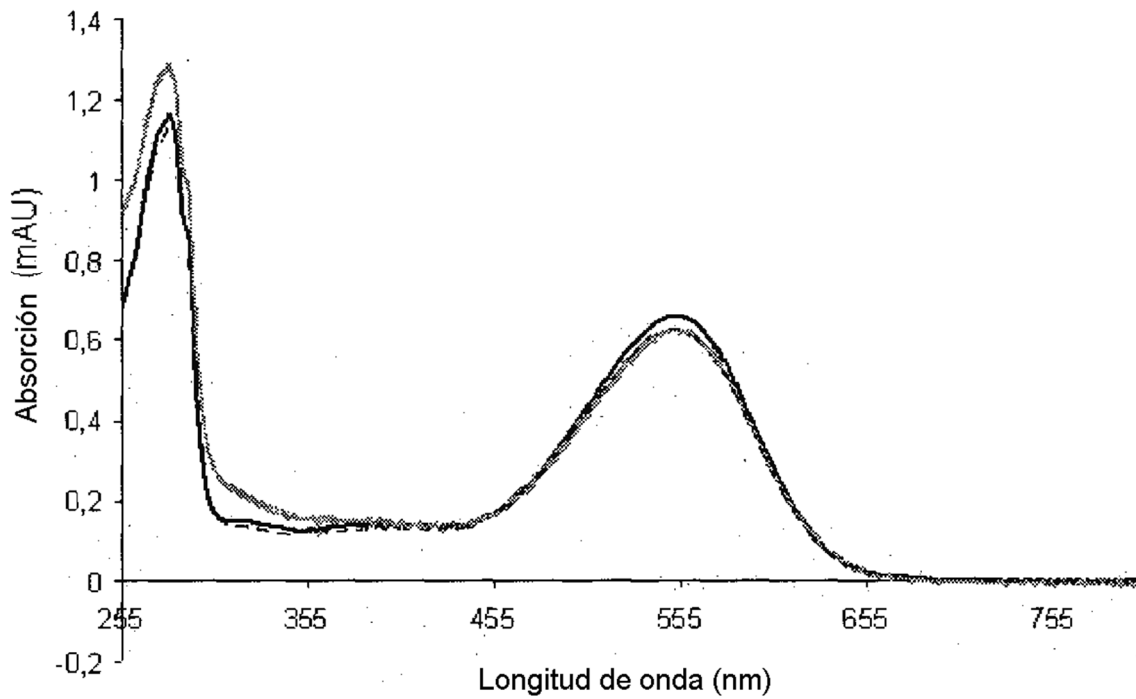


Figura 3