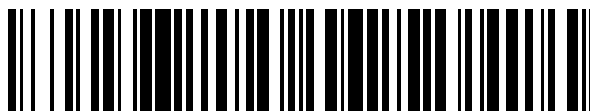


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 434**

51 Int. Cl.:

C07D 319/06 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2010** **PCT/US2010/023087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010** **WO10091109**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2010** **E 10739076 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2393798**

54 Título: **Materiales calibradores de tipo dendrímeros sintéticos ajustados para espectrometría de masas**

30 Prioridad:

03.02.2009 US 149506 P

10.06.2009 US 185665 P

08.04.2009 US 167708 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

**THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND (100.0%)**

**1430 Tulane Avenue, TB-32
New Orleans, LA 70112-2632, US**

72 Inventor/es:

GRAYSON, SCOTT, M.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 656 434 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

Materiales calibradores de tipo dendrímeros sintéticos ajustados para espectrometría de masas.

5 **Antecedentes**1. Campo

La presente descripción se refiere a moléculas dendríticas que tienen una estructura ramificada en serie en la que por lo menos una de las ramas posee una segunda estructura de ramificación. La presente descripción también comprende métodos para la preparación de dichas moléculas dendríticas, su uso como materiales calibradores ("calibrants") para espectrometría de masas (MS) de desorción/ionización por láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), para ionización por electropulverización (ESI-MS), para ionización química a presión atmosférica (APCI-MS), para bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS), y otras técnicas de MS para el análisis de compuestos con pesos moleculares mayores que 1000 Daltons.

2. Descripción de la técnica relacionada

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica para determinar la composición elemental de muestras (por ejemplo, proteínas, compuestos químicos, etc.). También se puede usar para determinar las estructuras químicas de tales muestras. En general, la MS comprende ionizar una muestra para generar moléculas cargadas (y sus fragmentos), y medir sus relaciones de masa a carga.

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS) es un método en el cual los iones son acelerados por un campo eléctrico en una región libre de campo con una energía cinética de qV , en la que q es la carga del ion y V es el voltaje aplicado. Puesto que la energía cinética de cada ion es $\frac{1}{2}mv^2$, en la que m es la masa y v es la velocidad, los iones más ligeros tienen una velocidad mayor que los iones más pesados. De este modo, los iones más ligeros alcanzan el detector al final de la región de deriva más pronto que los iones más pesados. La desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) es una técnica de ionización usada en espectrometría de masas, que facilita el análisis de biomoléculas (por ejemplo, proteínas, péptidos, y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (por ejemplo, polímeros y otras macromoléculas). La ionización por electropulverización (ESI) es una técnica de ionización a presión atmosférica mediante la cual un analito, disuelto en un disolvente volátil (por ejemplo, acetonitrilo, CH_3OH , CH_3Cl , agua, etc.), es forzado a través de un capilar pequeño cargado (habitualmente metálico). El analito sale como un ion en disolución, y a medida que la muestra es forzada a salir del capilar forma un aerosol. Esto aumenta la distancia entre las partículas del analito cargadas de forma similar. A menudo se usa un portador gaseoso inerte (por ejemplo, nitrógeno) para evaporar el disolvente de las gotitas. A medida que el disolvente se evapora, las moléculas del analito cargadas se aproximan más entre sí. Al mismo tiempo, sin embargo, la carga similar en las moléculas del analito las fuerza a separarse. Este proceso de contracción y expansión se repite hasta que la muestra está libre de disolvente y es un ion solitario. El ion solitario continúa entonces hacia el analizador de masas.

La ionización química a presión atmosférica (APCI) es también una técnica de ionización a presión atmosférica, mediante la cual una disolución de la muestra que pasa a través de un tubo caliente (por ejemplo, mayor que 400°C) se volatiliza y se somete a una descarga de corona con la ayuda de una nebulización de nitrógeno. La APCI es una variante de la ESI, y se puede llevar a cabo en una fuente de ESI modificada. Los iones, producidos por la descarga, son extraídos en el espectrómetro de masas. Esta técnica es la mejor para disolventes semivolátiles, relativamente polares, y se puede usar como una interfaz de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS), debido a que puede alojar caudales muy elevados de líquidos (por ejemplo, 1 ml/min.). Los espectros de APCI-MS contienen habitualmente el ion cuasimolecular $[\text{M} + \text{H}]^+$.

El bombardeo con átomos rápidos (FAB) emplea un haz de alta energía de átomos neutros, típicamente xenón o argón, que chocan contra una muestra sólida (analito mezclado con matriz) a vacío para provocar la desorción e ionización. Las matrices habituales incluyen glicerol, tioglicerol, alcohol 3-nitrobencílico (3-NBA), éter 18-corona-6, éter 2-nitrofeniloctílico, sulfolano, dietanolamina, y trietanolamina. El FAB se usa para moléculas biológicas grandes que son difíciles de introducir en la fase gaseosa. El haz de alta energía es producido acelerando iones a partir de una fuente iónica a través de una celda de intercambio de cargas. Esos iones acumulan un electrón a través de colisiones con átomos neutros, para formar un haz de átomos de alta energía. Debido a que los espectros de FAB contienen a menudo solamente unos pocos fragmentos, y una señal para el pseudo ion molecular (por ejemplo, $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), es útil para determinar pesos moleculares. La región de pequeña m/z , sin embargo, está poblada habitualmente de señales de la matriz.

A fin de calibrar espectrómetros de masas para un intervalo de trabajo analítico, incluyendo la caracterización y determinación estructural de proteínas, péptidos, oligonucleótidos, y polímeros sintéticos, se requieren materiales calibradores conocidos de un conjunto diverso de pesos moleculares.

Se puede hacer también mención del trabajo de Chikh L. *et al* (Macromolecules, 2008, 41, 23, 9044-9050), que sin embargo se refiere a polímeros hiperramificados, que difieren significativamente de los dendrímeros: no son un conjunto de especies bien definidas, no son simétricos, y no son monodispersos.

Típicamente, se han usado proteínas y péptidos debido a su monodispersidad (solo está presente un peso molecular único y exacto en una muestra pura) y a su disponibilidad a partir de fuentes biológicas. Los ejemplos incluyen: bradiquinina, hormona adrenocorticotrópica, cadena B de la insulina, citocromo c, apomioglobina, albúmina, aldolasa, y angiotensina II. Sin embargo, la producción - y particularmente la purificación - de tales patrones consume tiempo y es técnicamente complicada, conduciendo a un gasto bastante elevado para cantidades de gramos. Además, tales patrones tienen un tiempo de vida inherentemente pobre debido a la inestabilidad enzimática y la sensibilidad a ácidos.

A partir de la solicitud de patente US 2005/112635, se conoce un ejemplo de la fabricación de un único patrón de cuantificación, que describe patrones de cuantificación internos para espectroscopía de masas que comprenden un dendrímero PAMAM de un único peso molecular. Tales dendrímeros de un único peso molecular son también conocidos desde Annby U *et al.* (Tetrahedron Lett. 1998, 39, 20, 3217-3220).

Los polímeros sintéticos ofrecen una alternativa mucho más barata, pero existen como una distribución amplia de pesos moleculares debido a que se preparan usando una reacción relativamente no mediada entre unidades monoméricas individuales (en comparación con las síntesis biológicas) que inevitablemente da como resultado una distribución estadística de pesos moleculares. Esta distribución amplia de pesos moleculares se observa típicamente en espectros de masas como una serie gaussiana de picos, separados uniformemente como múltiplos de la masa monomérica. Sin embargo, el desarrollo de síntesis eficientes de dendrímeros ofrece la unión del coste aumentable en escala barato de los materiales sintéticos con el tradicional peso molecular exacto asociado con materiales biosintetizados.

Se conocen dos rutas sintéticas opuestas para la preparación de dendrímeros "verdaderos" (moléculas muy ramificadas con un grado elevado de regularidad estructural).

El primer enfoque - el enfoque divergente - implica primeramente el acoplamiento de un monómero ramificado a una molécula central, produciendo un intermedio, y después la "activación" del intermedio para producir una nueva molécula más grande, con un número mayor de funcionalidades superficiales. La repetición de estas dos etapas conduce al crecimiento hacia fuera, capa a capa, de moléculas dendríticas que tienen un tamaño exponencialmente creciente.

El segundo enfoque - el enfoque convergente - implica grupos periféricos que se juntan vía una unidad monomérica, produciendo "cuñas" o "dendrones". Dos de estos dendrones se pueden acoplar con una molécula monomérica adicional para obtener un dendrón más grande, y el crecimiento continúa hacia dentro, capa a capa, hasta el acoplamiento a un núcleo.

Típicamente, las técnicas divergentes son técnicamente simples: un gran exceso de una molécula pequeña reacciona con la molécula que crece, y entonces se elimina (por ejemplo, mediante destilación), proporcionando una síntesis relativamente eficiente desde el punto de vista del coste y aumentable en escala. Sin embargo, con las técnicas divergentes, el número de reacciones de acoplamiento aumenta exponencialmente con cada generación. En consecuencia, los dendrímeros con impurezas estructurales menores son casi inevitables y no se pueden eliminar fácilmente (por ejemplo, cuando n es un número grande, el producto de n reacciones de acoplamiento tiene propiedades físicas casi idénticas al producto de $n - 1$ acoplamientos). El resultado son materiales muy poco definidos para aplicaciones tales como la calibración de los MS.

Las técnicas convergentes tienen la ventaja clara de que cada acoplamiento implica un número pequeño y constante de reacciones (habitualmente 2 o 3 reacciones). De este modo, con las técnicas convergentes, las reacciones se pueden llevar hasta su terminación, y cualesquiera impurezas generadas mediante reacciones secundarias son detectadas (puesto que n es pequeño) y eliminadas fácilmente. Pero mientras los materiales producidos con las técnicas convergentes están bien definidos, su síntesis es exigente. Esto previene su uso comercial para prácticamente las aplicaciones de especialidad.

El problema técnico que subyace a la presente descripción fue por lo tanto superar estas dificultades de la técnica anterior proporcionando materiales calibradores monodispersos con un tiempo de vida mejorado, a un coste menor, y a lo largo de un intervalo amplio de pesos moleculares. La solución a este problema técnico se proporciona mediante las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

Breve resumen

La presente descripción se refiere a moléculas dendríticas - dendrímeros - útiles para la calibración de instrumentos de espectrometría de masas, y particularmente útiles en técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF, ESI, APCI, y FAB, y cualquier técnica adicional usada para el análisis de masas de materiales con

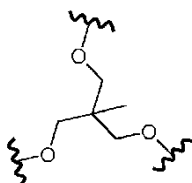
pesos moleculares por encima de 1000 daltons. La presente descripción también se refiere a métodos para sintetizar tales dendrímeros, así como métodos para usarlos.

En un aspecto, la descripción se refiere a materiales calibradores sintéticos. Los materiales calibradores sintéticos de la presente descripción son moléculas dendríticas - dendrímeros - sintetizadas ("generadas") vía "dendronización" de una molécula central terminada en hidroxilo, y, opcionalmente, una etapa de "desprotección" subsiguiente. También opcionalmente, las etapas de dendronización y desprotección se pueden llevar a cabo múltiples veces (en las que cada etapa de desprotección sigue a una etapa de dendronización, y en las que cada etapa de dendronización después de la primera etapa de dendronización sigue a una etapa de desprotección) para producir dendrímeros de tamaños conocidos y útiles. Los productos dendriméricos de cada ronda de dendronización/desprotección son parte de la misma "generación". Por ejemplo, la primera etapa de dendronización llevada a cabo con una molécula central produce una primera generación, o dendrímero "G-1". Igualmente, la siguiente etapa de desprotección llevada a cabo sobre el dendrímero G-1 resultante también produce un dendrímero de primera generación. Sin embargo, la etapa de dendronización después de la etapa de desprotección G-1 conduce a una segunda generación, o dendrímero "G-2". De este modo, cada ronda de dendronización y desprotección produce productos dendriméricos de la misma "generación". En la presente invención, la descripción se refiere a una mezcla de dendrímeros de diferentes pesos moleculares, y especialmente a una mezcla con una proporción específica (por ejemplo, una mezcla equimolar) de dichos dendrímeros. En particular, la presente descripción se refiere a una mezcla de dendrímeros sintetizados en paralelo, en la que cantidades equimolares de moléculas centrales que poseen números diferentes de funcionalidades alcohólicas se mezclan juntas y se someten a por lo menos una ronda de dendronización. Opcionalmente, la mezcla resultante se puede someter a varias rondas de dendronización y desprotección para producir mezclas dendriméricas de tamaños conocidos y útiles, a lo largo de un amplio espectro de pesos moleculares. En cada una de estas mezclas, los dendrímeros son de la misma generación, y todos ellos son útiles en espectrometría de masas. Adicionalmente, debido a que los grupos terminales se pueden modificar mediante dendronización y desprotección, los dendrímeros de la presente descripción poseen una elevada solubilidad en casi todo el espectro completo de disolventes, matrices y analitos útiles para MS. En consecuencia, los dendrímeros de la presente descripción son útiles como materiales calibradores internos (es decir, se pueden mezclar directamente con el analito y matriz durante la preparación de la muestra).

En una forma de realización, se proporciona una composición de dendrímeros que comprende una mezcla de dendrímeros de diferentes pesos moleculares de fórmula (Núcleo_x) (D₂M)_x, o una forma tautomérica de la misma, o una sal de la misma, o un solvato de la misma, en la que x es un número entero de 3 a 6, y en la que:

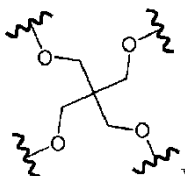
A) El Núcleo_x representa cualesquiera combinaciones de:

A.1)



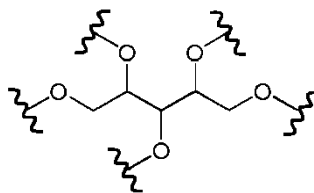
cuando $x = 3$;

A.2)



cuando $x = 4$;

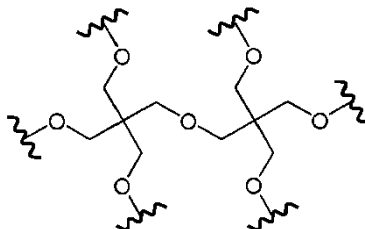
A.3)



cuando $x = 5$;

5

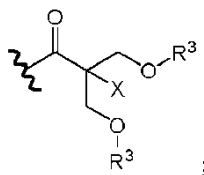
A.4)



cuando $x = 6$; y

10

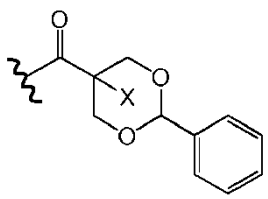
B) D representa



15

C) M representa R_p^1 o R_p^2 , en el que:

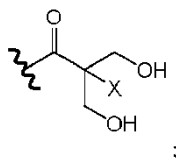
C.1) R^1 es:



20

y

C.2) R^2 es



25

y

D) R^3 es D o M;

30

E) r es $p-1$;

F) p es 2^{n-1} ;

35

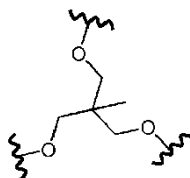
G) n es un número entero de 1 a 10; y

H) X se selecciona del grupo que consiste en $(CQ_2)_aCQ_3$ y CH_2-O-CH_2-Ph , en el que Q representa, independientemente, H o halógeno, Ph representa fenilo, y a es un número entero de 0 a 16.

5 En una forma de realización, se proporciona una composición de dendrímeros que comprende una mezcla de dendrímeros de diferentes pesos moleculares de fórmula $(Núcleo_x)(D_rM)_x$, o una forma tautomérica de la misma, o una sal de la misma, o un solvato de la misma, en la que x es un número entero de 3 a 6, y en la que:

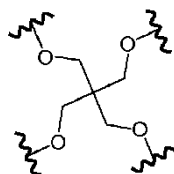
A) El Núcleo_x representa cualesquiera combinaciones de:

10 A.1)



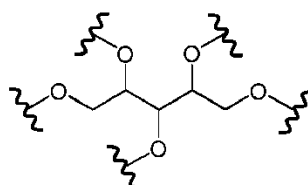
cuando x = 3;

15 A.2)



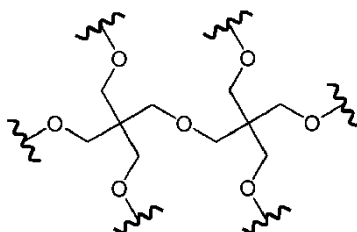
20 cuando x = 4;

A.3)



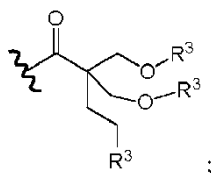
25 cuando x = 5; y

A.4)



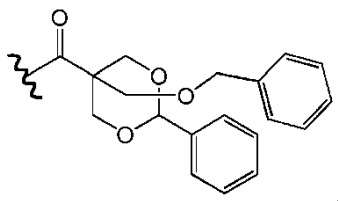
30 cuando x = 6;

35 B) D representa



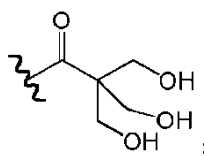
C) M representa R_p^1 o R_p^2 , en el que:

C.1) R^1 es:



y

C.2) R^2 es



y

D) R^3 es D o M;

E) r es p-1;

F) p es 3^{n-1} ; y

G) n es un número entero de 1 a 10.

En una forma de realización, A.1, A.2, A.3, y A.4 de las composiciones dendríméricas están presentes en cantidades equimolares. En cualquier forma de realización, A.1, A.2, A.3, y A.4 están enriquecidos isotópicamente. En otra forma de realización, A.1, A.2, A.3, A.4, B.1, B.2, y R^2 están enriquecidos isotópicamente. En otra forma de realización, el enriquecimiento isotópico es enriquecimiento isotópico con ^{12}C .

En una forma de realización, se proporciona un método para fabricar una composición de dendrímeros, que comprende las etapas de: a) proporcionar una combinación de núcleos seleccionados del grupo que consiste en 1,1,1-trishidroxietilmetano, pentaeritritol, xilitol, y dipentaeritritol; b) someter la combinación de núcleos a una ronda de dendronización; c) opcionalmente, y subsiguientemente, someter la combinación de núcleos a una ronda de desprotección; d) opcionalmente, y subsiguientemente, repetir las etapas b) y c); y opcionalmente, y subsiguientemente, repetir la etapa d), para lograr de ese modo la composición de dendrímeros deseada. En un aspecto de esta forma de realización, la combinación de núcleos es la combinación de 1,1,1-trishidroxietilmetano, pentaeritritol, xilitol, y dipentaeritritol. En otro aspecto de esta forma de realización, la combinación de 1,1,1-trishidroxietilmetano, pentaeritritol, xilitol, y dipentaeritritol es equimolar. En un aspecto de esta forma de realización, la etapa b) de dendronización comprende usar monómero de anhídrido de ácido bis(5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico). En otro aspecto de esta forma de realización, la etapa b) comprende usar el compuesto de Fórmula 1 (más abajo).

En una forma de realización, se proporciona un método para calibrar un espectrómetro de masas, usando por lo menos una mezcla de dendrímeros de la presente descripción, comprendiendo el método: proporcionar por lo menos una mezcla de dendrímeros de la presente descripción, en la que dichos dendrímeros tienen ciertas propiedades físicas; ionizar dicha mezcla de dendrímeros para proporcionar uno o más iones de dicha combinación de dendrímeros; recoger datos de dichos iones; y relacionar dichos datos con dichas ciertas propiedades físicas.

En una forma de realización, se proporciona un método para determinar las propiedades físicas de una muestra, comprendiendo el método: proporcionar por lo menos una mezcla de dendrímeros de la presente descripción, en la que dichos dendrímeros tienen ciertas propiedades físicas de los dendrímeros; proporcionar una muestra; combinar por lo menos una porción de la muestra con por lo menos una porción de dicha mezcla; ionizar la muestra y la mezcla de dendrímeros en tándem para proporcionar uno o más iones de dichos dendrímeros, y uno o más iones de dicha muestra; recoger datos de dichos iones de dicha mezcla de dendrímeros y uno o más iones de dicha muestra; y relacionar dichos datos con dichas ciertas propiedades físicas de dicha mezcla de dendrímeros, determinando de ese modo dichas propiedades físicas de la muestra.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un método para fabricar materiales calibradores sintéticos - dendrímeros - vía dendronización de la mezcla de moléculas centrales terminadas en hidroxilo, y, opcionalmente, una etapa de desprotección subsiguiente. En una forma de realización preferida, las etapas de dendronización y desprotección se pueden llevar a cabo múltiples veces (en las que cada etapa de desprotección sigue a una etapa de dendronización, y en las que cada etapa de dendronización después de la primera etapa de dendronización sigue a una etapa de desprotección) para producir dendrímeros de tamaños conocidos y útiles. Cada etapa de dendronización y desprotección que sigue a la primera etapa de dendronización es opcional. Cada etapa de dendronización y cada etapa de desprotección produce un dendrímero nuevo y útil de la presente descripción. En particular, la presente descripción se refiere a un método para fabricar una mezcla de materiales calibradores sintéticos - dendrímeros - en paralelo, en la que cantidades equimolares de moléculas centrales que poseen números diferentes de funcionalidades alcohólicas se mezclan juntas y se someten a por lo menos una ronda de dendronización. Opcionalmente, la mezcla resultante se puede someter a varias rondas de dendronización y desprotección para producir mezclas de dendrímeros de tamaños conocidos y útiles, a lo largo de un amplio espectro de pesos moleculares. En cada mezcla resultante, los dendrímeros son de la misma generación, y todos ellos son útiles en espectrometría de masas.

En todavía otro aspecto, la descripción se refiere a un método para calibrar un espectrómetro de masas usando una mezcla de dendrímeros de la presente descripción, comprendiendo el método: 1) proporcionar una mezcla de dendrímeros de la presente descripción, en la que dichos dendrímeros tienen ciertas propiedades físicas; 2) ionizar dichos dendrímeros para proporcionar uno o más iones de dichos dendrímeros; 3) recoger datos de dichos uno o más iones; y 4) relacionar dichos datos con dichas ciertas propiedades físicas. En una forma de realización preferida, la descripción se refiere a un método para determinar ciertas propiedades físicas de una muestra, comprendiendo el método: 1) proporcionar una mezcla de dendrímeros de la presente descripción, en la que dichos dendrímeros tienen ciertas propiedades físicas de los dendrímeros; 2) proporcionar una muestra, en la que dicha muestra tiene ciertas propiedades físicas de la muestra; 3) combinar por lo menos una porción de la muestra con por lo menos una porción de los dendrímeros; 4) ionizar la muestra y la mezcla de dendrímeros en tándem para proporcionar uno o más iones de dichos dendrímeros, y uno o más iones de dicha muestra; 5) recoger datos de dichos uno o más iones de dichos dendrímeros y uno o más iones de dicha muestra; y 6) relacionar dichos datos relacionados con las ciertas propiedades físicas de la mezcla de dendrímeros.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión adicional de la naturaleza, objetos, y ventajas de la presente descripción, se debería hacer referencia a la siguiente descripción detallada, conjuntamente con los siguientes dibujos, en los que números de referencia similares representan elementos similares.

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra la síntesis de materiales calibradores "C-3" trifuncionales de la presente descripción.

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra la síntesis de materiales calibradores "C-4" tetrafuncionales de la presente descripción.

La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra la síntesis de materiales calibradores "C-5" pentafuncionales de la presente descripción.

La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra la síntesis de materiales calibradores "C-6" hexafuncionales de la presente descripción.

La figura 5 es un diagrama esquemático que muestra la síntesis paralela de materiales calibradores tri-, tetra-, penta- y hexafuncionales de la presente descripción.

La figura 6 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de una mezcla equimolar de dendrímeros 1, 11, 21, y 31 de la presente descripción.

La figura 7 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de una mezcla equimolar de dendrímeros 3, 13, 23, y 33 de la presente descripción.

La figura 8 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de una mezcla equimolar de dendrímeros 4, 14, 24, y 34 de la presente descripción.

La figura 9 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de una mezcla equimolar de dendrímeros 5, 15, 25, y 35 de la presente descripción.

La figura 10 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de una mezcla equimolar de dendrímeros 6, 16, 26, y 36 de la presente descripción.

La figura 11 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de una mezcla equimolar de dendrímeros 7, 17, 27, y 37 de la presente descripción.

5 La figura 12 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de una mezcla equimolar de dendrímeros 8, 18, 28, y 38 de la presente descripción.

10 La figura 13 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de un cavitando dendronizado (Cav-([G1]-Ph)₈, que tiene la fórmula molecular C₁₉₂H₁₇₆O₄₈. El espectro de MALDI-TOF se muestra en la figura 13A, y la estructura del cavitando dendronizado se muestra en la figura 13B).

La figura 14 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF del PEG 1970 33-mero, que tiene la fórmula molecular C₆₆H₁₃₄O₃₄.

15 La figura 15 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF del PEG 1970 43-mero, que tiene la fórmula molecular C₈₆H₁₇₄O₄₄.

20 La figura 16 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF del PEG 1970 53-mero, que tiene la fórmula molecular C₁₀₆H₂₁₄O₅₄.

La figura 17 muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF del péptido patentado JF-1485, que tiene la fórmula molecular C₈₈H₁₁₈N₁₆O₂₂S₅⁺.

25 La figura 18 muestra un espectro de masas de tipo ESI de la mezcla G1 de los dendrímeros 1 (C3-([G-1]Ph)₃), 11 (C4-([G-1]Ph)₄), 21 (C5-([G-1]Ph)₅), y 31 (C6-([G-1]Ph)₆). Las muestras se prepararon disolviéndolas en acetonitrilo e inyectándolas directamente sin adición de contraión. El sodio residual produjo los espectros de masas observados con un único catión de sodio.

30 La figura 19 muestra un espectro de masas de tipo ESI de la mezcla G1 de los dendrímeros 3 (C3-([G-2]Ph₂)₃), 13 (C4-([G-2]Ph₂)₄), 23 (C5-([G-2]Ph₂)₅), y 33 (C6-([G-2]Ph₂)₆). Las muestras se prepararon disolviéndolas en acetonitrilo e inyectándolas directamente sin adición de contraión. El sodio residual produjo los espectros de masas observados con un único catión de sodio para el dendrímero 3, así como complejos doblemente cargados (dos cationes de sodio) para los dendrímeros 13, 23, y 33.

35 Descripción detallada

En la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen la referencia plural, excepto que el contexto dicte claramente otra cosa. Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado como lo entendería normalmente

40 alguien de pericia normal en la técnica a la que pertenece esta descripción.

Como se usa aquí, el término “[M + Ag]⁺” indica que un catión de plata está unido por molécula, durante la ionización de las muestras, como el contraión. Otros contraiones pueden incluir, por ejemplo, y sin limitación, “H”, “Na”, y “K”, como se apreciará fácilmente por aquellas personas que tienen pericia normal en la técnica

45 pertinente. Como se usa aquí, el término “m/z” representa la relación de masa a carga. Como se usa aquí, “MW” significa peso molecular.

La síntesis divergente recientemente desarrollada de poli(ésteres) alifáticos parece ofrecer las ventajas de ambas técnicas, a la vez que minimiza las deficiencias de ambas. Una síntesis dendrítica divergente es un proceso iterativo que implica un incremento de masa bien definido (aunque exponencial) con cada repetición de dos etapas sintéticas: la “etapa de acoplamiento” y la “etapa de desprotección”. En la figura 1, por ejemplo, la “etapa de acoplamiento” (por ejemplo, etapa “i” en la figura 1) implica la reacción de un número específico de funcionalidades alcoholílicas (grupos -OH) de la estructura central con el anhídrido del ácido bis-MPA protegido con bencilideno (nombre IUPAC: monómero de anhídrido de ácido bis(5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico) (“monómero” en la figura 1). Al hacerlo así, un número exacto de unidades monoméricas se conectan a las moléculas centrales, produciendo una nueva molécula dendrítica con un peso molecular discreto. En la “etapa de desprotección” (por ejemplo, etapa “ii” de la figura 1), un catalizador de paladio (hidróxido de paladio(II) soportado en grafito, también conocido como catalizador de Pearlman) se usa para eliminar los grupos protectores bencilidénicos vía una reacción de hidrogenólisis para generar un nuevo núcleo. Se debería observar que, al hacer esto, el número de funcionalidades alcoholílicas se duplica después de llevar a cabo cada iteración de acoplamiento y desprotección, permitiendo así que el proceso se repita y que las estructuras crezcan exponencialmente - pero de una manera bien controlada -, y produciendo así productos monodispersos. Debido a que la etapa de acoplamiento implica la reacción de esterificación limpia, muy activada, de grupos funcionales alcoholílicos con anhídridos de ácido, la reacción se puede llevar a cabo con rendimientos “cuantitativos” (mayores que 99,9%), sin subproducto. Además, se puede llevar a cabo un número de etapas de desprotección (por ejemplo hidrogenólisis catalizada por paladio (“Pd”) e hidrólisis catalizada por ácido para el monómero

protegido con bencilideno y acetal correspondiente) de una manera igualmente limpia y cuantitativa, proporcionando compuestos monodispersos suficientemente puros para actuar como materiales calibradores para espectrometría de masas. Al mismo tiempo, este enfoque divergente ofrece una ruta rápida que es técnicamente simple sin la purificación cromatográfica, permitiendo la producción aumentable en escala y eficiente desde el punto de vista del coste.

Los materiales calibradores de dendrímeros sintéticos de la presente descripción ofrecen un número de claras ventajas con respecto a otros materiales calibradores. Los péptidos y proteínas se han usado como patrones comerciales para la calibración debido a que, tradicionalmente, éstos fueron los únicos polímeros monodispersos que se pudieron preparar y purificar con un peso molecular suficientemente elevado. Aunque los materiales calibradores peptídicos y proteicos proporcionan un patrón viable, sufren de un tiempo de vida corto (debido al predominio de peptidasas) y de un coste elevado (debido a que su síntesis y purificación se lleva a cabo típicamente a escala de miligramos). En la TABLA 1 se proporciona un ejemplo representativo de estos materiales calibradores.

TABLA 1		
Materiales calibradores peptídicos y proteicos de la técnica anterior		
Calibrador	Peso molecular	Precio por gramo (USD)
Fragmento 1-7 de bradiquinina	756	38300
Angiotensina II	1046	6580
P ₁₄ R	1533	8733300
Fragmento 18-39 de ACTH	2464	220500
Cadena B de insulina	3496	8160
Insulina	5730	2652900
Citocromo c	12362	1181000
Apomiglobina	16952	861200
Aldolasa	39211	372300
Albúmina	66429	219800
Fuente: Sigma-Aldrich, Inc.		

Los materiales calibradores sintéticos ofrecen un número de ventajas potenciales, incluyendo un mayor tiempo de vida, pero, hasta hace poco, los únicos productos que se pudieron producir a un precio competitivo fueron los polímeros polidispersos (es decir, que exhiben un intervalo amplio de características másicas). La presencia de múltiples especies (y el predominio de diferentes contraiones en MS, incluyendo MALDI-TOF, ESI, APCI, y FAB) ha evitado que éstos se conviertan en una alternativa atractiva a péptidos y proteínas. Los materiales calibradores sintéticos monodispersos, tales como P₁₄R, son por lo menos 3 veces tan caros como el material calibrador peptídico más barato siguiente (Insulina), y más de 1000 veces más caros que el material calibrador peptídico más barato (Cadena B de Insulina).

Los materiales calibradores de dendrímeros sintéticos de la presente descripción, por el contrario, son más baratos de producir. Debido a este acceso sintético rápido a compuestos dendríticos costosamente eficientes aunque muy puros, los materiales calibradores dendriméricos de la presente descripción ofrecen una solución competitiva a la calibración de espectrómetros de masas, particularmente cuando se usan métodos de MALDI-TOF, ESI, APCI, o FAB. Además, se pueden sintetizar como mezclas, reduciendo así los costes de preparación, purificación y empaquetamiento. Aunque los materiales calibradores peptídicos y proteicos actualmente disponibles se usan y están ampliamente aceptados, el coste reducido de los materiales calibradores dendriméricos de la presente descripción, así como su tiempo de vida mejorado y su compatibilidad con disolventes, deberían dar como resultado su rápida aceptación.

A los dendrímeros se les da una nomenclatura estándar para representar su arquitectura. Por ejemplo, en los nombres "CX-([G-*n*]Ph)_z" y "CX-([G-*n*]OH)_z", el término "CX" se refiere al número de funcionalidades alcohólicas en el núcleo - el "número del núcleo" -, en el que "X" es un número entero. De este modo, "C3" se refiere a 1,1,1-trishidroxiethylmetano (un triol) como el núcleo, "C4" se refiere a pentaeritritol (un tetraol) como el núcleo, "C5" se refiere a xilitol (un pentaol) como el núcleo, y C6 se refiere a dipentaeritritol (un hexaol) como el núcleo. El término "G-*n*" se refiere al número de generación, que representa el número de capas de puntos de ramificación que se han añadido, y que también se refiere al número de iteraciones de acoplamiento y desprotección que han tenido lugar. Por ejemplo, "[G-1]" representa la "generación uno", e indica que se ha producido una ronda de acoplamiento (véase, por ejemplo, el dendrímero 1 de la figura 1: "C3-([G-1]Ph)₃"), o que se ha producido una ronda de acoplamiento y desprotección (véase, por ejemplo, el dendrímero 2 de la figura 1: "C3-([G-1]OH)₃"). En otras palabras, los dendrímeros 1 y 2 son de la misma generación: la generación uno, o "G-1". Cada uno de los alcoholes iniciadores posee un resto dendrítico con forma de cuña, denominado como un "dendrón". Los grupos terminales (por dendrón) se representan mediante Ph_p, para estructuras protegidas con bencilideno (en los que

"p" tiene un valor de 2^{n-1} , u OH_q , para las estructuras hidroxiladas (en los que "q" tiene un valor de 2^n), y en los que "p" y "q" representan el número de los grupos terminales por dendrón (por resto dendrítico con forma de cuña). Finalmente, el número de dendrones por núcleo, que corresponde al número de núcleos, se representa mediante "z".

5

Ejemplo 1 de Referencia

Procedimiento sintético general

El procedimiento general para la preparación de los materiales calibradores dendríticos sigue generalmente los publicados por Grayson *et al.* (Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules*, 2001; 34:6542-6544) y por Ihre *et al.* (Ihre, H.; Padilla de Jesus, O. L.; Fréchet, J. M. J. *Am. Chem. Soc.* 2001; 123:5908-5917). Como se muestra en la figura 1, la síntesis dendrítica implica la repetición de dos etapas críticas: i) la etapa de crecimiento dendrítico o "dendronización", en el que un monómero "protegido" se une a cada funcionalidad periférica activa; y ii) la etapa de activación o "desprotección", en la que cada monómero se altera para exponer una multiplicidad incrementada de funcionalidades activas en la superficie. Las repeticiones en serie de estas dos etapas conducen al incremento exponencial tanto en los grupos funcionales periféricos como en el peso molecular.

Ejemplo 2 de Referencia

20

Preparación de monómero de anhídrido de bis-MPA protegido con bencilideno

El monómero de anhídrido de bis-MPA protegido con bencilideno se preparó según la síntesis dada a conocer previamente por Ihre, H.; Padilla de Jesus, O. L.; Fréchet, J. M. J. *Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 5908-5917, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

25

Ejemplo 3 de Referencia

Procedimiento de dendronización general para la preparación de $\text{CX}-([\text{G}-n]\text{Ph})_z$

30

El procedimiento de este EJEMPLO se muestra esquemáticamente como la etapa "i" de la figura 1 (por ejemplo, las síntesis de: dendrímero 1 a partir del núcleo terminado en hidroxilo; de dendrímero 3 a partir de dendrímero 2; etc.). A un matraz de fondo redondo se añadieron: una cantidad conocida de núcleo terminado en hidroxilo (por ejemplo, 1,1,1-tris(hidroximetil)etano, pentaeritritol, xilitol, o dipentaeritritol) o de dendrímero (por ejemplo, aquel que tenga la fórmula general $\text{CX}-([\text{G}-(n-1)]\text{OH})_z$, en la que "r" tiene un valor de $2^{(n-1)}$, según sea apropiado; 1,1 equivalentes (por -OH de núcleo terminado en hidroxilo o de dendrímero) del monómero de anhídrido de bis-MPA protegido con bencilideno (monómero de anhídrido del ácido (bis(5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico)); y 0,1 equivalentes molares (por -OH de núcleo terminado en hidroxilo o de dendrímero) de 4-dimetilaminopiridina (DMPA). La mezcla de reacción se disolvió en la cantidad mínima de piridina, se diluyó en dos veces esa cantidad (con respecto a piridina) de diclorometano, y la mezcla de reacción se dejó agitar entonces vigorosamente durante 4 horas a temperatura y presión estándar. La reacción se monitorizó periódicamente mediante MS de MALDI-TOF para determinar el grado de acoplamiento. Después de que se observó la esterificación total mediante MS de MALDI-TOF, los contenidos del matraz se transfirieron a un embudo de separación, se diluyeron con diclorometano, se extrajeron tres veces con NaHSO_4 acuoso 1M (bisulfato sódico) y tres extracciones con NaHCO_3 acuoso 1M (bicarbonato sódico). Las capas orgánicas se redujeron a vacío para concentrar la muestra, se precipitaron en hexanos, y se filtraron para producir los dendrímeros protegidos con bencilideno, $\text{CX}-([\text{G}-n]\text{Ph})_z$, como un precipitado pulverulento blanco. El precipitado resultante se puede preparar entonces para análisis espectrométrico vía protocolos estándar.

Ejemplo 4 de Referencia

50

Procedimiento de desprotección general para la preparación de $\text{CX}-([\text{G}-n]\text{OH})_z$

El procedimiento de este EJEMPLO se muestra esquemáticamente como la etapa "ii" de la figura 1 (por ejemplo, las síntesis de: dendrímero 2 a partir de dendrímero 1; de dendrímero 4 a partir de dendrímero 3; etc.). A un matraz de fondo redondo, se añadió una cantidad medida de $\text{CX}-([\text{G}-n]\text{Ph})_z$, en el que "r" tiene un valor de $2^{(n-1)}$, y se disolvió en una cantidad suficiente de una disolución 2:1 de diclorometano:metanol. Se añadió catalizador de Pearlman ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$) a la mezcla de reacción, y los contenidos del matraz se colocaron a 8 atmósferas (atm) de gas hidrógeno. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 24 horas a temperatura ambiente. La desprotección total se verificó mediante datos brutos de MS de MALDI, tras lo cual se eliminó el $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ vía filtración sobre Celite®. El filtrado se redujo entonces a vacío para producir un sólido vítreo transparente que tiene la fórmula $\text{CX}-([\text{G}-n]\text{OH})_z$. El filtrado resultante se puede preparar entonces mediante análisis espectrométrico vía protocolos estándar.

60

Ejemplo 5 de Referencia

Síntesis de materiales calibradores "C-3" trifuncionales

5 En la figura 1 se muestran las especies de dendrímeros trifuncionales de este EJEMPLO 5.

Síntesis de C3-([G-1]Ph)₃, dendrímero 1 de la figura 1: 1,1,1-tris(hidroximetil)etano (nombre IUPAC: 2-(hidroximetil)-2-metilpropano-1,3-diol), que está comercialmente disponible, se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C3-([G-1]Ph)₃. Fórmula molecular: C₄₁H₄₈O₁₂. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 839,220. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 839,20

15 Síntesis de C3-([G-1]OH)₃, dendrímero 2 de la figura 1: El dendrímero 1 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C3-([G-1]OH)₃. Fórmula molecular: C₂₀H₃₆O₁₂. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 491,210. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 491,22

20 Síntesis de C3-([G-2]Ph)₃, dendrímero 3 de la figura 1: El dendrímero 2 hidroxilado se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C3-([G-2]Ph)₃. Fórmula molecular: C₉₂H₁₀₈O₃₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 1799,598. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 1799,59

25 Síntesis de C3-([G-2]OH)₃, dendrímero 4 de la figura 1: El dendrímero 3 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C3-([G-2]OH)₃. Fórmula molecular: C₅₀H₈₄O₃₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 1187,495. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 1187,46

30 Síntesis de C3-([G-3]Ph)₃, dendrímero 5 de la figura 1: El dendrímero 4 hidroxilado se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C3-([G-3]Ph)₃. Fórmula molecular: C₁₉₄H₂₂₈O₆₆. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 3720,354. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 3720,42

35 Síntesis de C3-([G-3]OH)₃, dendrímero 6 de la figura 1: El dendrímero 5 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C3-([G-3]OH)₃. Fórmula molecular: C₁₁₀H₁₈₀O₆₆. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 2580,063. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 2580,10

40 Síntesis de C3-([G-4]Ph)₃, dendrímero 7 de la figura 1: El dendrímero 6 hidroxilado, se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C3-([G-4]Ph)₃. Fórmula molecular: C₃₉₈H₄₆₈O₁₃₈. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 7561,865. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 7559,9.

45 Síntesis de C3-([G-4]OH)₃, dendrímero 8 de la figura 1: El dendrímero 7 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C3-([G-4]OH)₃. Fórmula molecular: C₂₃₀H₃₇₂O₁₃₈. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 5365,256. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 5366,6.

50 Síntesis de C3-([G-5]Ph)₃, dendrímero 9 de la figura 1: El dendrímero 8 hidroxilado, se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C3-([G-5]Ph)₃. Fórmula molecular: C₈₀₆H₉₄₈O₂₈₂. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 15256,1. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = a *determinar*.

55 Síntesis de C3-([G-5]OH)₃, dendrímero 10 de la figura 1: El dendrímero 9 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C3-([G-5]OH)₃. Fórmula molecular: C₄₇₀H₇₅₆O₂₈₂. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 10942,0. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = a *determinar*.

Ejemplo 6 de Referencia

Síntesis de materiales calibradores "C-4" tetrafuncionales

65 En la figura 2 se muestran las especies de dendrímeros tetrafuncionales de este EJEMPLO 6.

Síntesis de C4-([G-1]Ph)₄, dendrímero 11 de la figura 2: Se esterificó pentaeritritol (nombre IUPAC: 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol), que está comercialmente disponible, siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C4-([G-1]Ph)₄. Fórmula molecular: C₅₃H₆₀O₁₆. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 1059,292. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 1059,28

Síntesis de C4-([G-1]OH)₄, dendrímero 12 de la figura 2: El dendrímero 11 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C4-([G-1]OH)₄. Fórmula molecular: C₂₅H₄₄O₁₆. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 623,252. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 623,05

Síntesis de C4-([G-2]Ph)₂, dendrímero 13 de la figura 2: El dendrímero 12 hidroxilado, se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C4-([G-2]Ph)₂. Fórmula molecular: C₁₂₁H₁₄₀O₄₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 2339,797. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 2339,85

Síntesis de C4-([G-2]OH)₄, dendrímero 14 de la figura 2: El dendrímero 13 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia para dar C4-([G-2]OH)₄. Fórmula molecular: C₆₅H₁₀₈O₄₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 1551,631. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 1551,62

Síntesis de C4-([G-3]Ph)₄, dendrímero 15 de la figura 2: El dendrímero 14 hidroxilado se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C4-([G-3]Ph)₄. Fórmula molecular: C₂₅₇H₃₀₀O₈₈. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 4900,805. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 4900,98

Síntesis de C4-([G-3]OH)₈, dendrímero 16 de la figura 2: El dendrímero 15 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C4-([G-3]OH)₈. Fórmula molecular: C₁₄₅H₂₃₆O₈₈. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 3408,389 MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 3408,41

Síntesis de C4-([G-4]Ph)₈, dendrímero 17 de la figura 2: El dendrímero 16 hidroxilado se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C3-([G-4]Ph)₈. Fórmula molecular: C₅₂₉H₆₂₀O₁₈₄. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 10030,5. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 10018,1.

Síntesis de C4-([G-4]OH)₁₆, dendrímero 18 de la figura 2: El dendrímero 17 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C4-([G-4]OH)₁₆. Fórmula molecular: C₃₀₅H₄₉₂O₁₈₄. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 7126,1. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 7123,5.

Síntesis de C4-([G-5]Ph)₁₆, dendrímero 19 de la figura 2: El dendrímero 18 hidroxilado se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C4-([G-5]Ph)₁₆. Fórmula molecular: C₁₀₇₃H₁₂₆₀O₃₇₆. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 20281,4. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = *a determinar*.

Síntesis de C4-([G-5]OH)₃₂, dendrímero 20 de la figura 2: El dendrímero 19 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C4-([G-5]OH)₃₂. Fórmula molecular: C₆₂₅H₁₀₀₄O₃₇₆. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 14557,6. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = *a determinar*.

Ejemplo 7 de Referencia

Síntesis de materiales calibradores "C-5" pentafuncionales

En la figura 3 se muestran las especies de dendrímeros pentafuncionales de este EJEMPLO 7.

Síntesis de C5-([G-1]Ph)₅, dendrímero 21 de la figura 3: Se esterificó xilitol (nombre IUPAC: pentano-1,2,3,4,5-pentol), que está comercialmente disponible, siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de

Referencia y DMAP para dar C5-([G-1]Ph)₅. Fórmula molecular: C₆₅H₇₂O₂₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 1279,366. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 1279,39

Síntesis de C5-([G-1]OH₂)₅, dendrímero 22 de la figura 3: El dendrímero 21 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C5-([G-1]OH₂)₅. Fórmula molecular: C₃₀H₅₂O₂₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 755,295. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 755,17

Síntesis de C5-([G-2]Ph₂)₅, dendrímero 23 de la figura 3: El dendrímero 22 hidroxilado, se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C5-([G-2]Ph₂)₅. Fórmula molecular: C₁₅₀H₁₇₂O₅₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 2879,997. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 2880,01

Síntesis de C5-([G-2]OH₄)₅, dendrímero 24 de la figura 3: El dendrímero 23 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C5-([G-2]OH₄)₅. Fórmula molecular: C₈₀H₁₃₂O₅₀. Fórmula molecular: C₁₅₀H₁₇₂O₅₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 1915,768. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 1915,78

Síntesis de C5-([G-3]Ph₄)₅, dendrímero 25 de la figura 3: El dendrímero 24 hidroxilado, se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C5-([G-3]Ph₄)₅. Fórmula molecular: C₃₂₀H₃₇₂O₁₁₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 6081,257. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 6081,51

Síntesis de C5-([G-3]OH₈)₅, dendrímero 26 de la figura 3: El dendrímero 25 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C5-([G-3]OH₈)₅. Fórmula molecular: C₁₈₀H₂₉₂O₁₁₀. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 4236,715. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 4236,80

Síntesis de C5-([G-4]Ph₈)₅, dendrímero 27 de la figura 3: El dendrímero 26 hidroxilado, se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C5-([G-4]Ph₈)₅. Fórmula molecular: C₆₆₀H₇₇₂O₂₃₀. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 12493,1. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 12476,0.

Síntesis de C5-([G-4]OH₁₆)₅, dendrímero 28 de la figura 3: El dendrímero 27 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C5-([G-4]OH₁₆)₅. Fórmula molecular: C₃₈₀H₆₁₂O₂₃₀. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 8883,9. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 8880,1.

Síntesis de C5-([G-5]Ph₁₆)₅, dendrímero 29 de la figura 3: El dendrímero 28 hidroxilado, se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C5-([G-5]Ph₁₆)₅. Fórmula molecular: C₁₃₄₀H₁₅₇₂O₄₇₀. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 25306,7. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = a determinar.

Síntesis de C5-([G-5]OH₃₂)₅, dendrímero 30 de la figura 3: El dendrímero 29 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C5-([G-5]OH₃₂)₅. Fórmula molecular: C₇₈₀H₁₂₅₂O₄₇₀. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 18173,2. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = a determinar.

Ejemplo 8 de Referencia

Síntesis de materiales calibradores "C-6" hexafuncionales

En la figura 4 se muestran las especies de dendrímeros hexafuncionales de este EJEMPLO 8.

Síntesis de C6-([G-1]Ph)₆, dendrímero 31 de la figura 4: Se esterificó dipentaeritritol (nombre IUPAC: 2-[[3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propoxi]metil]-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), que está comercialmente disponible, siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C6-([G-1]Ph)₆. Fórmula molecular: C₈₂H₉₄O₂₅. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 1585,514. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 1585,53

Síntesis de C6-([G-1]OH₂)₆, dendrímero 32 de la figura 4: El dendrímero 31 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C6-([G-1]OH₂)₆. Fórmula molecular: C₄₀H₇₀O₂₅. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 973,410. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 973,34

Síntesis de C6-([G-2]Ph₂)₆, dendrímero 33 de la figura 4: El dendrímero 32 hidroxilado, se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C6-([G-2]Ph₂)₆. Fórmula molecular: C₁₈₄H₂₁₄O₆₁. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 3506,269. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 3506,25

Síntesis de C6-([G-2]OH₄)₆, dendrímero 34 de la figura 4: El dendrímero 33 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C6-([G-2]OH₄)₆. Fórmula molecular: C₁₀₀H₁₆₆O₆₁. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 2365,979. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 2365,98

Síntesis de C6-([G-3]Ph₄)₆, dendrímero 35 de la figura 4: El dendrímero 34 hidroxilado, se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C6-([G-3]Ph₄)₆. Fórmula molecular: C₃₈₈H₄₅₄O₁₃₃. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 7347,781. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 7347,0

Síntesis de C6-([G-3]OH₈)₆, dendrímero 36 de la figura 4: El dendrímero 35 protegido con bencilideno se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C6-([G-3]OH₈)₆. Fórmula molecular: C₂₂₀H₃₅₈O₁₃₃. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 5151,115. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 5151,28

Síntesis de C6-([G-4]Ph₈)₆, dendrímero 37 de la figura 4: El dendrímero 36 hidroxilado, se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C6-([G-4]Ph₈)₆. Fórmula molecular: C₇₉₆H₉₃₄O₂₇₇. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 14969,7. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 15020,1.

Síntesis de C6-([G-4]OH₁₆)₆, dendrímero 38 de la figura 4: El dendrímero 37 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C6-([G-4]OH₁₆)₆. Fórmula molecular: C₄₆₀H₇₄₂O₂₇₇. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 10655,6. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 10722,6.

Síntesis de C6-([G-5]Ph₁₆)₆, dendrímero 39 de la figura 4: El dendrímero 38 hidroxilado, se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar C6-([G-5]Ph₁₆)₆. Fórmula molecular: C₁₆₁₂H₁₈₉₄O₅₆₅. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 30346,1. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = *a determinar*.

Síntesis de C6-([G-5]OH₁₂)₆, dendrímero 40 de la figura 4: El dendrímero 39 protegido con bencilideno se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar C6-([G-5]OH₃₂)₆. Fórmula molecular: C₉₄₀H₁₅₁₀O₅₆₅. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 21802,8. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = *a determinar*.

Ejemplo 9

Síntesis en paralelo de dendrímeros 1, 11, 21, y 31

En la técnica anterior, un material calibrador de amplio espectro se obtiene mezclando cantidades apropiadas de péptidos individuales, que se han preparado y purificado por separado, para producir un cóctel de materiales calibradores. La metodología sintética descrita aquí y mostrada esquemáticamente en la figura 5, sin embargo, proporciona una manera única para preparar conjuntos de materiales calibradores partiendo de una mezcla de materiales de partida comercialmente disponibles bien definidos, y dendronizándolos en paralelo.

Mediante repeticiones en serie de las etapas "i" y "ii" como se detalla en los EJEMPLOS 3 y 4 de Referencia (y como se muestra, por ejemplo, en la figura 1), se pueden preparar dendrímeros con pesos moleculares (aproximadamente) exponencialmente crecientes. Por ejemplo, partiendo con solamente el núcleo terminado en hidroxilo C-3, la repetición en serie de las etapas "i" y "ii" puede producir materiales calibradores de dendrímeros monodispersos (por ejemplo, dendrímeros 1, 3, 5, 7, 9, etc., de la figura 1) que tienen pesos moleculares aproximados de 730, 1690, 3610, 7450, 15100, y 30500. Partiendo de un núcleo diferente, que posee un número

diferente de funcionalidades alcohólicas (por ejemplo, el núcleo terminado en hidroxilo C-4, C-5 o C-6) se puede preparar un amplio intervalo de materiales calibradores con una distribución amplia.

Según la presente invención, la manera de obtener una mezcla de materiales calibradores es llevar a cabo el procedimiento de dendronización usando una mezcla de núcleos en un solo lote (por ejemplo, mezclas equimolares de los núcleos C-3, C-4, C-5, y/o C-6). Por ejemplo, y como se muestra en la figura 5, después de una única etapa de dendronización, la mezcla de cuatro núcleos producirá un conjunto de dendrímeros de "primera generación" 1, 11, 21, y 31, que tienen pesos moleculares (con contraíón de plata) de 839, 1059, 1279, y 1585 (como se demuestra en la figura 6). Tras una repetición adicional de las etapas "ii" y "i", también mostrada en la figura 5, el conjunto de materiales calibradores de "segunda generación" (3, 13, 23, 33) tiene pesos moleculares de 1800, 2340, 2880, y 3506 (como se demuestra en la figura 7). De esta manera, las repeticiones en serie de las etapas "i" y "ii" permite el acceso rápido a una serie de conjuntos de 4 puntos (véanse, por ejemplo, las FIGS. 6-12).

Debido a que el material calibrador más deseable sería una mezcla de numerosos compuestos monodispersos bien definidos (por ejemplo, como se muestra en el esquema de reacción de la figura 5 y los espectros de las FIGS. 6-12), esta técnica sintética descrita tiene la ventaja adicional de que los diferentes materiales calibradores se pueden preparar juntos en un lote (dendronizando una mezcla selecta de núcleos), en lugar de preparar cada especie por separado y mezclarlas después de aislar cada producto. Debido a que los intentos previos para preparar dendrímeros buscaron un producto singular bien definido, este enfoque en paralelo es tanto inédito como valioso a la hora de reducir el coste y el esfuerzo de preparar conjuntos de materiales calibradores.

Síntesis de CX-([G-1]Ph)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 1, 11, 21, y 31 (véase, por ejemplo, el esquema de reacción de la figura 5): Una mezcla equimolar de (trishidroximetil)etano (C3-OH₃), pentaeritritol (C4-OH₄), xilitol (C5-OH₅), y dipentaeritritol (C6-OH₆) se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para dar la mezcla CX-([G-1]Ph)_z de dendrímeros 1, 11, 21, y 31. Como se muestra en la figura 6, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 839,220; 1059,293; 1279,367; 1585,514. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 839,20; 1059,28; 1279,39; 1585,53. Como se puede apreciar a partir de la figura 6, la mezcla de dendrímeros 1, 11, 21, y 31 proporciona una calibración eficaz de cuatro puntos que cubre el intervalo de masas de 800-1600.

Ejemplo 10

Síntesis en paralelo de dendrímeros 2, 12, 22, y 32

Síntesis de CX-([G-1]OH₂)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 2, 12, 22, y 32 (véase, por ejemplo, el esquema de reacción de la figura 5): La mezcla de dendrímeros protegidos con bencilideno 1, 11, 21, y 31 del EJEMPLO 9 se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para dar la mezcla CX-([G-1]OH₂)_z de dendrímeros 2, 12, 22, y 32. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 491,210; 623,253; 755,295; 973,410. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 491,22; 623,05; 755,17; y 973,34 (no mostrado).

Ejemplo 11

Síntesis en paralelo de dendrímeros 3, 13, 23, y 33

Síntesis de CX-([G-2]Ph₂)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 3, 13, 23, y 33 (véase, por ejemplo, el esquema de reacción de la figura 5): La mezcla de dendrímeros funcionalizados con hidroxilo 2, 12, 22, y 32 del EJEMPLO 10 de Referencia se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para producir la mezcla CX-([G-2]Ph₂)_z de dendrímeros 3, 13, 23, y 33. Como se muestra en la figura 7, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Ag]⁺ m/z = 1799,598; 2339,797; 2879,997; 3506,269. MW observado: [M + Ag]⁺ m/z = 1799,59; 2339,85; 2880,01; 3506,25. Como se puede apreciar a partir de la figura 7, la mezcla de dendrímeros 3, 13, 23, y 33 proporciona una calibración eficaz de cuatro puntos que cubre el intervalo de masas de 1800-3600.

Ejemplo 12

Síntesis en paralelo de dendrímeros 4, 14, 24, y 34

Síntesis de CX-([G-2]OH₄)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 4, 14, 24, y 34 (véase, por ejemplo, el esquema de reacción de la figura 5): La mezcla de dendrímeros protegidos con bencilideno 3, 13, 23, y 33 del EJEMPLO 11 se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para producir la mezcla CX-([G-2]OH₄)_z de dendrímeros 4, 14, 24, y 34. Como se muestra en la figura 8, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 1187,495;

1551,631; 1915,768; 2365,979. MW observado: $[M + Na]^+$ $m/z = 1187,46$; 1551,62; 1915,78; 2365,98. Como se puede apreciar a partir de la figura 7, la mezcla de dendrímeros 4, 14, 24, y 34 proporciona una calibración eficaz de cuatro puntos que cubre el intervalo de masas de 1200-2400.

5 Ejemplo 13

Síntesis en paralelo de dendrímeros 5, 15, 25, y 35

10 Síntesis de CX-([G-3]Ph₄)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 5, 15, 25, y 35 (véase, por ejemplo, el esquema de reacción de la figura 5): La mezcla de dendrímeros funcionalizados con hidroxilo 4, 14, 24, y 34 del EJEMPLO 12 se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando anhídrido Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 2 de Referencia y DMAP para producir la mezcla CX-([G-3]Ph₄)_z de dendrímeros 5, 15, 25, y 35. Como se muestra en la figura 9, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: $[M + Ag]^+$ $m/z = 3720,354$; 4900,805; 6081,257; 7347,781. MW observado: $[M + Ag]^+$ $m/z = 3720,42$; 4900,98; 6081,51; y 7348,00. Como se puede apreciar a partir de la figura 9, la mezcla de dendrímeros 5, 15, 25, y 35 proporciona una calibración eficaz de cuatro puntos que cubre el intervalo de masas de 3600-7200.

20 Ejemplo 14

Síntesis en paralelo de dendrímeros 6, 16, 26, y 36

25 Síntesis de CX-([G-3]OH₈)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 6, 16, 26, 36 (véase, por ejemplo, el esquema de reacción de la figura 5): La mezcla de dendrímeros protegidos con bencilideno 5, 15, 25, y 35 del EJEMPLO 13 se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para producir la mezcla CX-([G-3]OH₈)_z de dendrímeros 6, 16, 26, 36. Como se muestra en la figura 10, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: $[M + Na]^+$ $m/z = 2580,063$; 3408,389; 4236,715; 5151,115. MW observado: $[M + Na]^+$ $m/z = 2580,10$; 3408,41; 4236,80; 5151,28. Como se puede apreciar a partir de la figura 10, la mezcla de dendrímeros 6, 16, 26, y 36 proporciona una calibración eficaz de cuatro puntos que cubre el intervalo de masas de 2500-5100.

30 Ejemplo 15

Síntesis en paralelo de dendrímeros 7, 17, 27, y 37

35 Síntesis de CX-([G-4]Ph₈)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 7, 17, 27, y 37 (véase, por ejemplo, el esquema de reacción de la figura 5): La mezcla de dendrímeros funcionalizados con hidroxilo 6, 16, 26, y 36 del EJEMPLO 14 se esterificó siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando anhídrido Bis-MPA protegido con bencilideno, y DMAP para producir la mezcla CX-([G-4]Ph₈)_z de dendrímeros 7, 17, 27, y 37. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: $[M + Ag]^+$ $m/z = 7561,9$; 10022,8; 12483,8; 15030,8. MW observado: $[M + Ag]^+$ $m/z = 7562$; 10023; 12484; 15031. Como se puede apreciar a partir de la figura 11, la mezcla de dendrímeros 7, 17, 27, y 37 proporciona una calibración eficaz de cuatro puntos que cubre el intervalo de masas de 7500-15000.

45 Ejemplo 16

Síntesis en paralelo de dendrímeros 8, 18, 28, y 38

50 Síntesis de CX-([G-4]OH₁₆)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 8, 18, 28, y 38: La mezcla de dendrímeros protegidos con bencilideno 7, 17, 27, y 37 del EJEMPLO 15 se desprotegió usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para producir la mezcla CX-([G-4]OH₁₆)_z de dendrímeros 8, 18, 28, y 38. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: $[M + Na]^+$ $m/z = 5365,2$; 7121,9; 8878,6; 10721,4. MW observado: $[M + Na]^+$ $m/z = 5366,619$; 7123,504; 8880,111; 10722,572. Como se puede apreciar a partir de la figura 12, la mezcla de dendrímeros 8, 18, 28, y 38 proporciona una calibración eficaz de cuatro puntos que cubre el intervalo de masas de 5500-10500.

55 Ejemplo 17

Síntesis en paralelo de dendrímeros 9, 19, 29, y 39

60 Síntesis de CX-([G-5]Ph₁₆)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 9, 19, 29, y 39: La mezcla de dendrímeros funcionalizados con hidroxilo 8, 18, 28, y 38 del EJEMPLO 16 se esterificaría siguiendo el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, usando el anhídrido de Bis-MPA protegido con bencilideno del EJEMPLO 3 y DMAP para producir la mezcla CX-([G-5]Ph₁₆)_z de dendrímeros 9, 19, 29, y 39. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: $[M + Ag]^+$ $m/z = 15244,9$; 20266,9; 25288,8; 30396,9. MW observado: $[M + Ag]^+$ $m/z = a \text{ determinar}$.

Ejemplo 18

Síntesis en paralelo de dendrímeros 10, 20, 30, y 40

Síntesis de CX-([G-5]OH₃₂)_z, una mezcla equimolar de dendrímeros 10, 20, 30, y 40: La mezcla de dendrímeros protegidos con bencilideno, 9, 19, 29, y 39 del EJEMPLO 17 se desprotegería usando 5% de Pd(OH)₂/C y gas hidrógeno siguiendo el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para producir la mezcla CX-([G-5]OH₃₂)_z de dendrímeros 10, 20, 30, y 40. MALDI-TOF MS: MW promedio teórico: [M + Na]⁺ m/z = 10935,5; 14548,9; 18162,4; 21861,9. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = a *determinar*

Ejemplo 19

Ensayos de materiales calibradores - cavitando dendronizado

Para verificar la utilidad de los materiales calibradores de la presente descripción en la adquisición de datos exactos de MALDI-TOF con una resolución elevada de masas, se examinó un cavitando dendronizado (una molécula sintética monodispersa), y los resultados se muestran en la figura 13A. El cavitando dendronizado (Cav-([G1]-F)₈, como se muestra en la figura 13B) tiene la fórmula molecular C₁₉₂H₁₇₆O₄₈. MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 3272,122. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 3272,06. Exactitud en la masa: 18,9 ppm.

Ejemplo 20

Ensayo de materiales calibradores - Poli(etilen)glicol, PEG 1970

Para verificar adicionalmente la utilidad de los materiales calibradores de la presente descripción en la adquisición de datos exactos de MALDI-TOF con una resolución elevada de masas, se examinó un polímero sintético PEG 1970 (un polímero polidisperso de tres oligómeros diferentes: un 33-mero, un 43-mero, y un 53-mero). El peso molecular promedio numérico (M_n) de PEG 1970 es 1970, y su índice de polidispersidad (PDI) es 1,05. En las FIGS. 14-16 se muestran los resultados espectrométricos.

El 33-mero del PEG 1970 tiene la fórmula molecular C₆₆H₁₃₄O₃₄. Como se muestra en la figura 14, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 1493,865. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 1493,96. Exactitud de la masa: 63,6 ppm.

El 43-mero del PEG 1970 tiene la fórmula molecular C₈₆H₁₇₄O₄₄. Como se muestra en la figura 15, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 1934,127. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 1934,20. Exactitud de la masa: 37,7 ppm.

El 53-mero del PEG 1970 tiene la fórmula molecular C₁₀₆H₂₁₄O₅₄. Como se muestra en la figura 16, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico: [M + Na]⁺ m/z = 2374,389. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 2374,44. Exactitud de la masa: 21,5 ppm.

Ejemplo 21

Ensayo de materiales calibradores - péptido patentado JF-1485

Para verificar adicionalmente la utilidad de los materiales calibradores de la presente descripción en la adquisición de datos exactos de MALDI-TOF con una resolución elevada de masas, se examinó el péptido JF-1485 que tiene la fórmula C₈₈H₁₁₈N₁₆O₂₂S₅⁺ (y que tiene una estructura patentada). Como se muestra en la figura 17, MALDI-TOF MS: MW exacto teórico del aducto de H⁺: [M + H]⁺ m/z = 1911,728. MW observado: [M + H]⁺ m/z = 1911,68. MW exacto teórico del aducto de Na⁺: [M + Na]⁺ m/z = 1933,7102. MW observado: [M + Na]⁺ m/z = 1933,69. MW exacto teórico del aducto de K⁺: [M + K]⁺ m/z = 1949,6842. MW observado: [M + K]⁺ m/z = 1949,60. Exactitud de la masa: 25,1 ppm.

Núcleos terminados en hidroxilo alternativos

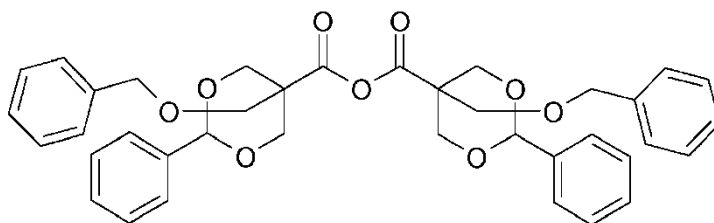
Como se apreciará por aquellos de pericia normal en la técnica, los dendrímeros de diversas funcionalidades distintos de los descritos anteriormente se pueden sintetizar vía el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, seguido (opcionalmente) del Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia. Esto se pudo lograr, por ejemplo, y sin pretender estar limitados, simplemente eligiendo un núcleo terminado en hidroxilo diferente de los descritos anteriormente (por ejemplo, un núcleo distinto de 1,1,1-tris(hidroximetil)etano, pentaeritritol, xilitol, o dipentaeritritol) para el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia. Los núcleos terminados en hidroxilo alternativos ejemplares incluyen, sin pretender estar limitados: tripentaeritritol (ocho términos hidroxilo) y tetrapentaeritritol (diez términos hidroxilo).

Aquellos que tienen pericia normal en la técnica también entenderán a partir de la descripción anterior que cada dendrímero creado vía el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia también puede funcionar como un núcleo terminado en hidroxilo alternativo. Por ejemplo, el dendrímero representado por $C_3-([G-2]OH_4)_3$ - dendrímero 4 de la figura 1 - posee doce términos -OH, cada uno de los cuales puede sufrir una ronda de dendronización (vía el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia). El dendrímero resultante puede sufrir entonces el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia para producir aún otro dendrímero, y las etapas se pueden repetir para crear incluso dendrímeros más grandes. De este modo, los alcoholes que contienen de alrededor de 1 a muchos centenares de términos hidroxilo (-OH) se pueden usar en el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia (preferiblemente polialcoholes, e incluyendo polioles lineales tales como poli(alcohol vinílico) y polioles hiperramificados tales como poli(glicerol)), y seguido (opcionalmente) por el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, para producir materiales calibradores útiles para espectrometría de masas, especialmente para técnicas de MALDI-TOF, ESI, APCI, y FAB. Además, las combinaciones de tales alcoholes (y preferentemente polialcoholes) se usan en síntesis en paralelo (por ejemplo, como se describe en los EJEMPLOS 9-18) para crear un panel de materiales calibradores útiles a lo largo de un amplio intervalo de relaciones m/z.

Además, la química de acilación de acoplamiento usada para convertir alcoholes en los ésteres correspondientes durante la etapa de "acoplamiento" o "dendronización" como se describe en el EJEMPLO 3 de Referencia es igualmente susceptible a la reacción de acilación, usando los mismos reactivos, que convierte aminas en amidas. Como resultado, también se pueden usar moléculas de núcleos de poliamina (como moléculas centrales), incluyendo familias comercialmente disponibles de poliaminas dendríticas, tales como los dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) y de poli(propilenamina) (PPI).

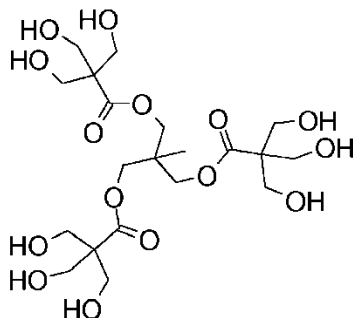
Trismonómero

El monómero de bis-MPA protegido con bencilideno descrito anteriormente se puede modificar sustituyendo el grupo metilo colgante por un grupo hidroximetilo, para producir un trismonómero protegido, como se muestra en la Fórmula 1 a continuación:



Fórmula 1

Sustituyendo el grupo metilo colgante por un grupo hidroximetilo del monómero del anhídrido de bis-MPA protegido con bencilideno (monómero del anhídrido del ácido bis(5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico)), cada capa de dendrímero podría contener tres ramas, en lugar de las dos ramas mostradas en las FIGS. 1-5. En otras palabras, usando el monómero de Fórmula 1 en el Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 de Referencia, y subsiguientemente en el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4 de Referencia, cada punto de ramificación produciría tres ramas, en lugar de las dos ramas mostradas en las FIGS. 1-5. Por ejemplo, partiendo de 1,1,1-tris(hidroximetil)etano y usando el trismonómero de Fórmula 1 para una ronda de dendronización y desprotección según los EJEMPLOS 3 y 4 de Referencia, respectivamente, se produciría un material calibrador $C_3 - C_3-([G-1]OH_3)_3$ - según la Fórmula 2 (y similar al dendrímero 2):



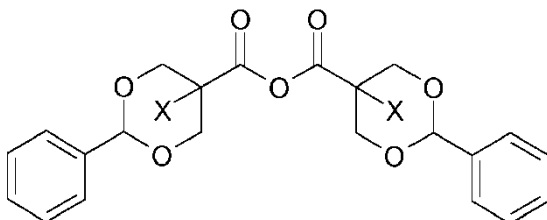
Fórmula 2

Los grupos -OH de la Fórmula 2 se pueden proteger usando ortoésteres de metilideno para llevar a cabo las etapas de dendronización y desprotección subsiguientes.

Ajuste de los dendrímeros

Debido a que los dendrímeros descritos se originan casi exclusivamente a partir del monómero del ácido bis(hidroximetil)propanoico, la composición de la estructura global se puede ajustar fácilmente mediante cambios sutiles en la estructura monomérica. Tal ajuste podría incluir la modificación de un grupo metilo colgante y/o la síntesis de dendrímeros usando monómero enriquecido isotópicamente en ^{12}C .

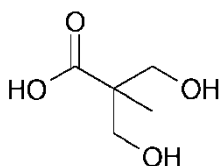
Las masas atómicas exactas de todos los átomos están próximas a, pero no exactamente, números enteros. Debido a que los compuestos de peso molecular (MW) más grande comprenden múltiples átomos, tienen un defecto de masa significativo - una compensación de la masa nominal (el valor de la aproximación entera más próxima del isótopo más abundante para cada masa atómica). Explicado de forma simple, el defecto másico es la diferencia entre la "masa nominal" aproximada en número entero y la masa monoisotópica observada realmente. El defecto másico se puede usar para identificar clases de compuestos, y se puede usar para distinguir biomoléculas naturales de las modificadas de forma no natural. Ajustando la composición elemental de la cadena principal dendrímica, el defecto másico se puede ajustar para asegurarse de que no solapen con - y que se puedan diferenciar fácilmente de - compuestos naturales. Tal ajuste también puede facilitar el análisis automatizado de datos simplificando la distinción entre el analito y el calibrador. Debido a que los dendrímeros descritos están hechos predominantemente de múltiples capas del mismo monómero, el ajuste de la composición elemental de ese monómero permite que se ajuste el defecto másico de todos los dendrímeros descritos. Por ejemplo, un péptido promedio exhibirá el defecto másico de "avergina" de +0,506 daltons (Da) por 1000 Da de peso molecular. "Avergina" es el aminoácido "promedio" teórico con respecto a su composición elemental (con la fórmula molecular no entera: $\text{C}_{4,9384}\text{H}_{7,7583}\text{N}_{1,3577}\text{O}_{1,4773}\text{S}_{0,0417}$), y que se puede usar para calcular la composición elemental esperada y el defecto másico de péptidos y proteínas a lo largo de un intervalo de pesos moleculares. Los dendrones funcionalizados con hidroxilo (véanse, por ejemplo, los dendrímeros 2, 4, 6, 8, etc.) exhiben un defecto másico de $+0,42 \pm 0,02$ Da por 1000 Da de peso molecular, mientras que los dendrones funcionalizados con bencilideno (véanse, por ejemplo, los dendrímeros 1, 3, 5, 7, 9, etc.) exhiben un defecto másico de $0,39 \pm 0,02$ Da por 1000 Da de peso molecular. A fin de diferenciar adicionalmente este defecto de masa, el metilo colgante de los dendrones funcionalizados con hidroxilo se puede modificar o funcionalizar con una variedad de cadenas alquílicas más largas o con cadenas alquílicas halogenadas, sin ningún efecto significativo sobre el procedimiento sintético. Esto se puede lograr modificando el monómero del anhídrido de bis-MPA protegido con bencilideno (monómero del anhídrido del ácido bis(5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico)) en la posición 5-metilo como se muestra en la Fórmula 3 a continuación:



Fórmula 3

En la Fórmula 3, X puede ser: alquilo (por ejemplo, CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, o $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, en el que n es un número entero de 0 a 16); $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-Ph}$, en el que Ph representa fenilo; CQ_3 , en el que "Q" representa halógeno, preferentemente flúor (F) o cloro (Cl) (por ejemplo, CF_3 , CCl_3 , etc.); o $(\text{CQ}_2)_n\text{CQ}_3$, en el que "Q" representa halógeno, preferentemente flúor (F) o cloro (Cl), y en el que n es un número entero de 1 a 16. Por ejemplo, se puede demostrar un desplazamiento bastante significativo en el MW sustituyendo el grupo metilo por un grupo trifluorometilo, que da como resultado un desplazamiento en el defecto másico hasta $+0,11 \pm 0,02$ Da por 1000 Da de MW. El defecto de la masa molecular también se puede modificar mediante una funcionalización simple de la periferia con un sustituyente con el defecto másico deseado. A pesar de la modificación en "X", la síntesis de dendrímeros usando el monómero protegido con bencilideno de Fórmula 3 puede transcurrir vía iteraciones en serie del Procedimiento de Dendronización General del EJEMPLO 3 y el Procedimiento de Desprotección General del EJEMPLO 4.

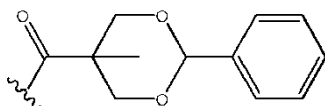
A medida que aumenta el peso molecular de las moléculas que contienen carbono, el predominio natural de ^{13}C (abundancia natural = 1,109%) en las moléculas conduce a un ensanchamiento de la distribución isotópica molecular en sus espectros de masas. Por encima de alrededor de 8000 Da, la señal que corresponde a la especie monoisotópica (que solamente tiene ^{12}C) es tan pequeña, con respecto a la especie poliisotópica, que la determinación exacta de la masa es difícil debido a que el pico de la especie monoisotópica es difícil de identificar entre los picos de la especie poliisotópica. En consecuencia, la presencia de especie poliisotópica reduce enormemente la resolución de los cálculos del peso molecular. Tómese, por ejemplo, la Fórmula 4:



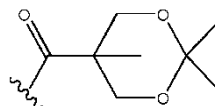
Fórmula 4,

que se puede representar mediante la fórmula $C_5H_{12}O_4$. Debido a que más del 1% de C es ^{13}C , el MS de cualquier compuesto que contenga carbono exhibirá mayores señales de peso molecular, que corresponden a estos isótopos de ^{13}C . A medida que aumenta el número de carbonos en un compuesto, aumenta la probabilidad de que ^{13}C esté presente en el compuesto. Esto se observa en la distribución isotópica del monómero de Fórmula 4, que tiene una masa exacta de 136,07356, exhibe una señal monoisotópica a 136,07356 (m/z; intensidad de señal relativa de 100,0%), y una especie de mayor peso molecular a 137,07691 (m/z; intensidad de señal relativa de 5,4%). Al aumentar el contenido de carbono (por ejemplo, sin pretender estar limitados, 500 átomos de carbono por molécula), la distribución estadística de pesos moleculares de las diferentes especies poliisotópicas se hace tan ancha que el pico monoisotópico individual se puede hacer difícil de resolver. La abundancia nativa de ^{12}C es 98,89%, de ^{13}C es 1,109%, de 1H es 99,99%, de 2H es 0,01%, de ^{16}O es 99,76%, de ^{18}O es 0,20%, y de ^{17}O es 0,04%. El isótopo de ^{13}C es el mayor isótopo más común en la mayoría de los compuestos orgánicos. De este modo, la manera más simple de estrechar la distribución isotópica a pesos moleculares elevados es comenzar con materiales de construcción en los que se ha agotado el ^{13}C - por ejemplo, materiales de partida en los que todo el carbono es ^{12}C . Debido a que los dendrímeros descritos se originan casi exclusivamente a partir del monómero de ácido bis(hidroximetil)propanoico, si la síntesis se lleva a cabo con monómero enriquecido isotópicamente en ^{12}C , entonces el ensanchamiento de los picos espectrales de masas se reducirá sustancialmente, y se puede lograr fácilmente una calibración de elevada exactitud por encima de 10000 Da. Aunque el ensanchamiento isotópico debido a ^{18}O es mucho menos pronunciado (debido a que ^{18}O representa solamente 0,201% de todas las especies de O), también se puede llevar a cabo el enriquecimiento isotópico en ^{16}O para mejorar la exactitud incluso más. No se espera que estos enriquecimientos isotópicos contemplados aquí tengan ningún efecto sobre los parámetros sintéticos, más allá de alterar sutilmente los pesos moleculares de los agentes reaccionantes y los productos dendríméricos.

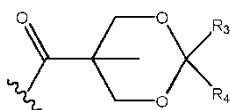
Como se muestra en el Procedimiento de Dendronización General para la Preparación de $CX-([G-n]Ph)_2$ descrito en el EJEMPLO 3 de Referencia, las funcionalidades alcoholicas del monómero se deben "proteger" a fin de controlar el crecimiento iterativo del dendrímero que produce estructuras monodispersas exactas. Dos alcoholes se pueden proteger simultáneamente con bencilideno (descrito en el EJEMPLO 3 de Referencia y mostrado más abajo en la Fórmula 5), y aquellos de pericia normal en la técnica también reconocerán que se pueden proteger con acetónido (Fórmula 6), u otro grupo protector acetálico o cetálico (véanse, por ejemplo, las Fórmulas 7 y 8, en las que R^3 es H o CH_3 , R^4 es F, CH_3 , $C_6H_4OCH_3$, o $C_6H_4NO_2$, R^5 es CH_2F , $Si(CH_3)_3$, $C_6H_5NO_2$, CH_2OCH_3 , C_5H_9O (éter tetrahidropiranílico), o SiF_2t-Bu , y en las que Ph es fenilo).



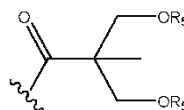
Fórmula 5



Fórmula 6



Fórmula 7



Fórmula 8

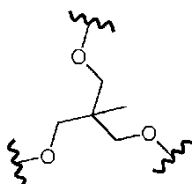
En "Protective Groups in Organic Synthesis" por P. G. M. Wuts y T. W. Greene (4ª edición, 2007, John Wiley and Sons Inc. Hoboken, NJ) se pueden encontrar ejemplos adicionales de grupos protectores. Además, también se puede usar un número de enlaces de éter lábiles, incluyendo éteres bencilícos, éteres bencilícos sustituidos, y éteres silílicos, en lugar de, o además de, permitir la síntesis de dendrímeros estructuralmente puros.

REIVINDICACIONES

1. Composición de dendrímeros que comprende una mezcla de dendrímeros de diferentes pesos moleculares de fórmula (Núcleo_x)(D_iM)_x, o una forma tautomérica de la misma, o una sal de la misma, o un solvato de la misma, en la que x es un número entero de 3 a 6, y en la que:

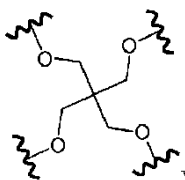
A) El núcleo_x representa cualquiera de las combinaciones de:

A.1)



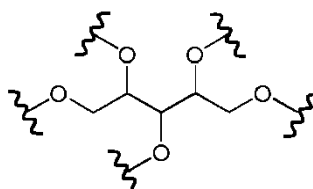
cuando x = 3;

A.2)



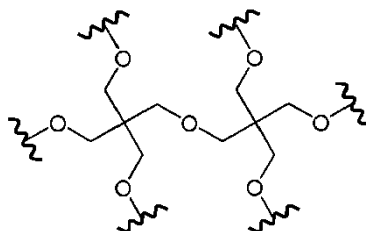
cuando x = 4;

A.3)



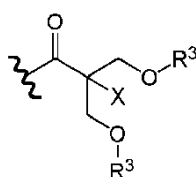
cuando x = 5;

A.4)



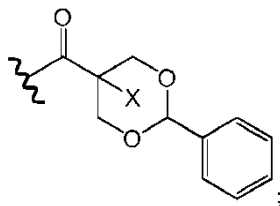
cuando x = 6; y

B) D representa



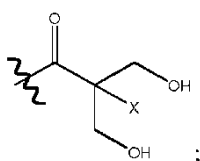
C) M representa R_p^1 o R_p^2 , en la que:

C.1) R^1 es:



y

C.2) R^2 es



y

D) R^3 es D o M;

E) r es p-1;

F) p es 2^{n-1} ;

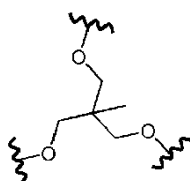
G) n es un número entero de 1 a 10; y

H) X se selecciona de entre el grupo que consiste en $(CQ_2)_aCQ_3$ y CH_2-O-CH_2-Ph , en la que Q representa, independientemente, H o halógeno, Ph representa fenilo, y a es un número entero de 0 a 16.

2. Composición de dendrímeros que comprende una mezcla de dendrímeros de diferentes pesos moleculares de fórmula $(Núcleo_x)(D_rM)_x$, o una forma tautomérica de la misma, o una sal de la misma, o un solvato de la misma, en la que x es un número entero de 3 a 6, y en la que:

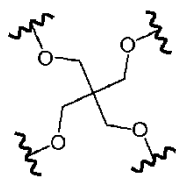
A) El núcleo_x representa cualquiera de las combinaciones de:

A.1)



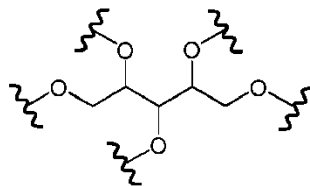
cuando x = 3;

A.2)



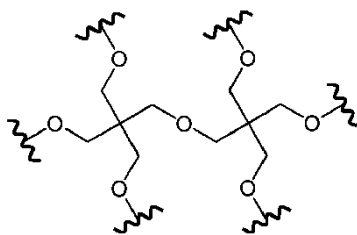
cuando x = 4;

A.3)



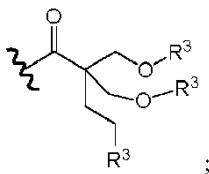
cuando $x = 5$; y

A.4)



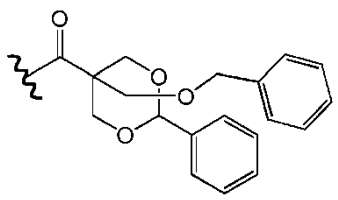
cuando $x = 6$;

B) D representa



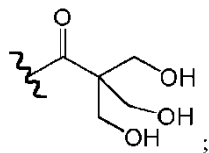
C) M representa R^1_p o R^2_p , en la que:

C.1) R^1 es:



y

C.2) R^2 es



y

D) R^3 es D o M;

E) r es p-1;

F) p es 3^{n-1} ; y

G) n es un número entero de 1 a 10.

3. Composición según la reivindicación 1 o 2, en la que A.1, A.2, A.3, y A.4 están presentes en cantidades equimolares.

4. Composición según la reivindicación 1, 2, o 3, en la que A.1, A.2, A.3, A.4, B, C, o cualquier combinación de los mismos están enriquecidos isotópicamente.

5. Composición según la reivindicación 1, 2, 3, o 4, en la que B y C están enriquecidos isotópicamente.

6. Composición según la reivindicación 4 o 5, en la que dicho enriquecimiento isotópico es enriquecimiento isotópico en ^{12}C , enriquecimiento isotópico en ^{16}O , o enriquecimiento isotópico en ^{12}C y ^{16}O .

7. Procedimiento de fabricación de una composición de dendrímeros, que comprende las etapas de:

A) proporcionar una combinación de núcleos seleccionados de entre el grupo que consiste en 1,1,1-trishidroxietilmetano, pentaeritritol, xilitol y dipentaeritritol;

B) someter la combinación de núcleos a un ciclo de dendronización;

C) opcional y subsiguientemente, someter la combinación de núcleos a un ciclo de desprotección;

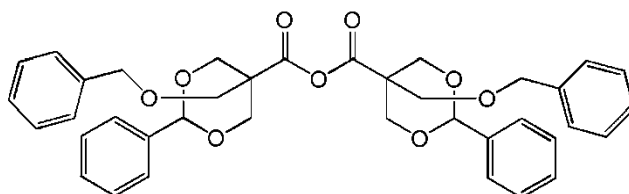
D) opcional y subsiguientemente, repetir las etapas B) y C); y

E) opcional y subsiguientemente, repetir la etapa D), como se desee, para lograr así dicha composición de dendrímeros.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha combinación de núcleos es la combinación de 1,1,1-trishidroxietilmetano, pentaeritritol, xilitol, y dipentaeritritol.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que la etapa B) comprende utilizar monómero del anhídrido del ácido bis(5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico).

10. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que la etapa B) comprende utilizar el compuesto de Fórmula 1:



(Fórmula 1).

11. Procedimiento de calibración de un espectrómetro de masas, comprendiendo el procedimiento:

A) proporcionar por lo menos una mezcla de dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos dendrímeros presentan unas determinadas propiedades físicas;

B) ionizar dicha mezcla de dendrímeros para proporcionar unos iones de dichos dendrímeros;

C) recoger los datos de dichos iones; y

D) relacionar dichos datos con dichas determinadas propiedades físicas.

12. Procedimiento de determinación de las propiedades físicas de una muestra, comprendiendo el procedimiento:

A) proporcionar por lo menos una mezcla de dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos dendrímeros presentan unas determinadas propiedades físicas;

B) proporcionar una muestra;

C) combinar por lo menos una parte de la muestra con por lo menos una parte de dicha mezcla;

D) ionizar la muestra y la mezcla de dendrímeros en tándem para proporcionar iones de dichos dendrímeros, y uno o más iones de dicha muestra;

E) recoger los datos de dichos iones de dicha mezcla de dendrímeros y uno o más iones de dicha muestra; y

5 F) relacionar dichos datos con dichas determinadas propiedades físicas de dicha mezcla de dendrímeros, determinando así dichas propiedades físicas de la muestra.

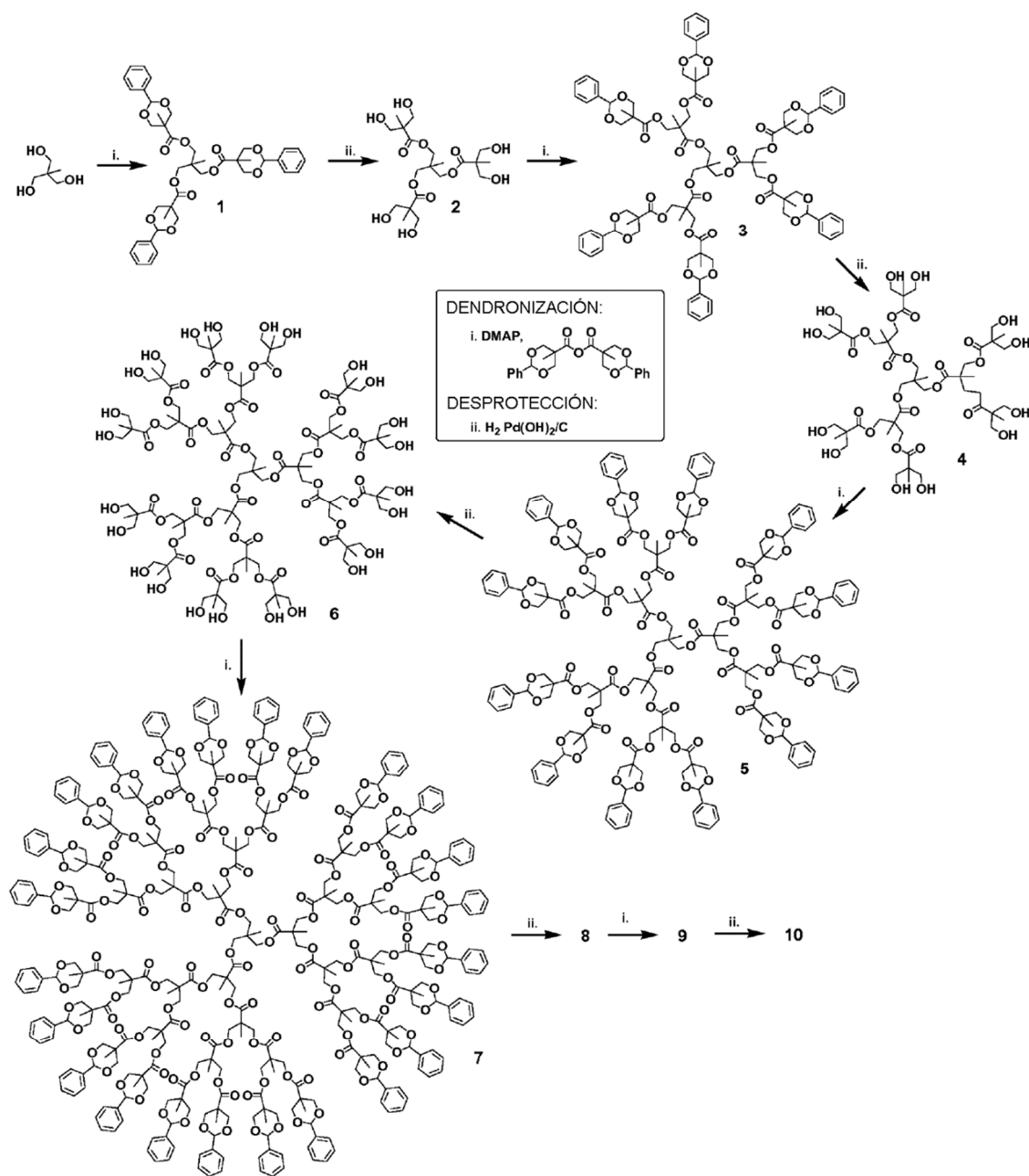


FIG. 1

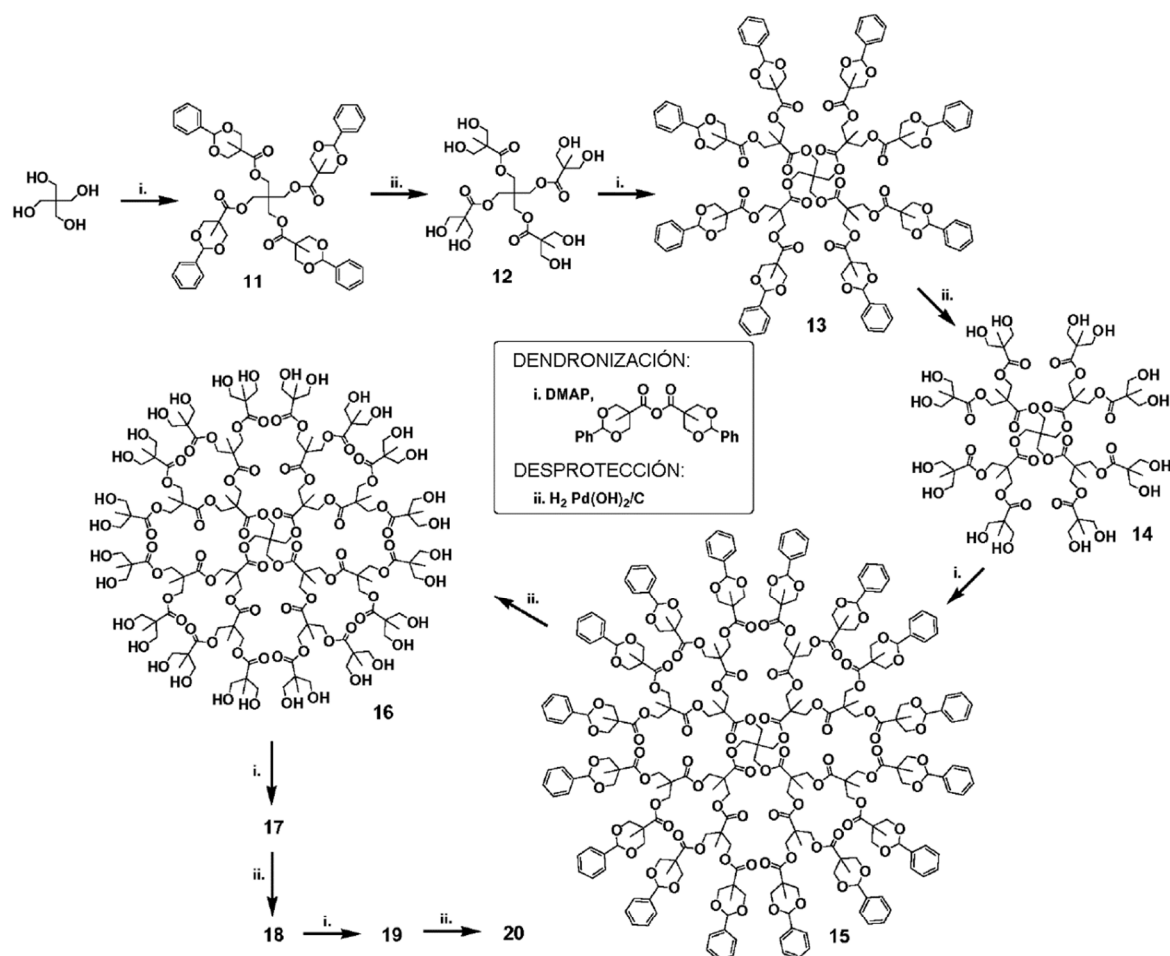


FIG. 2

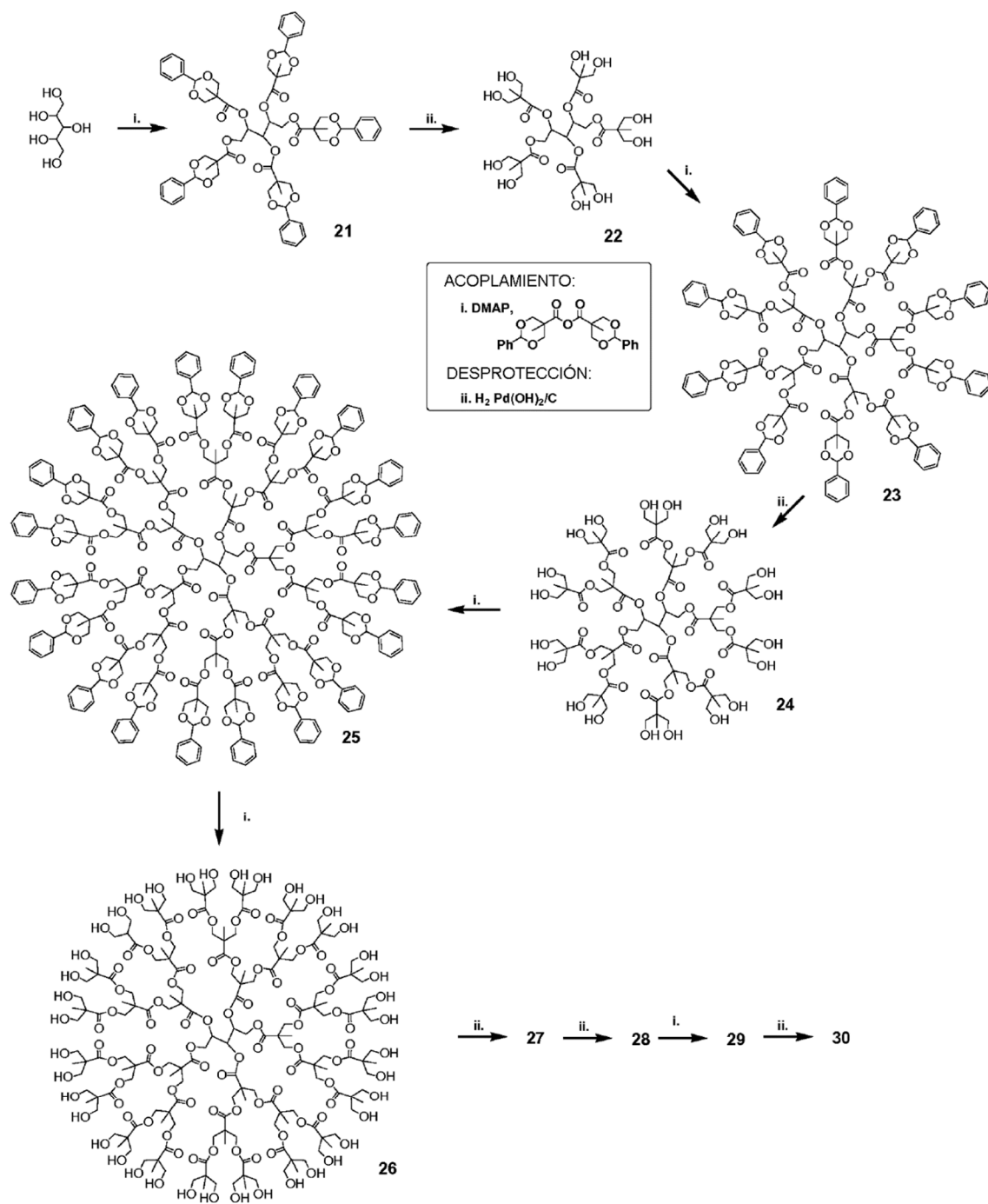


FIG. 3

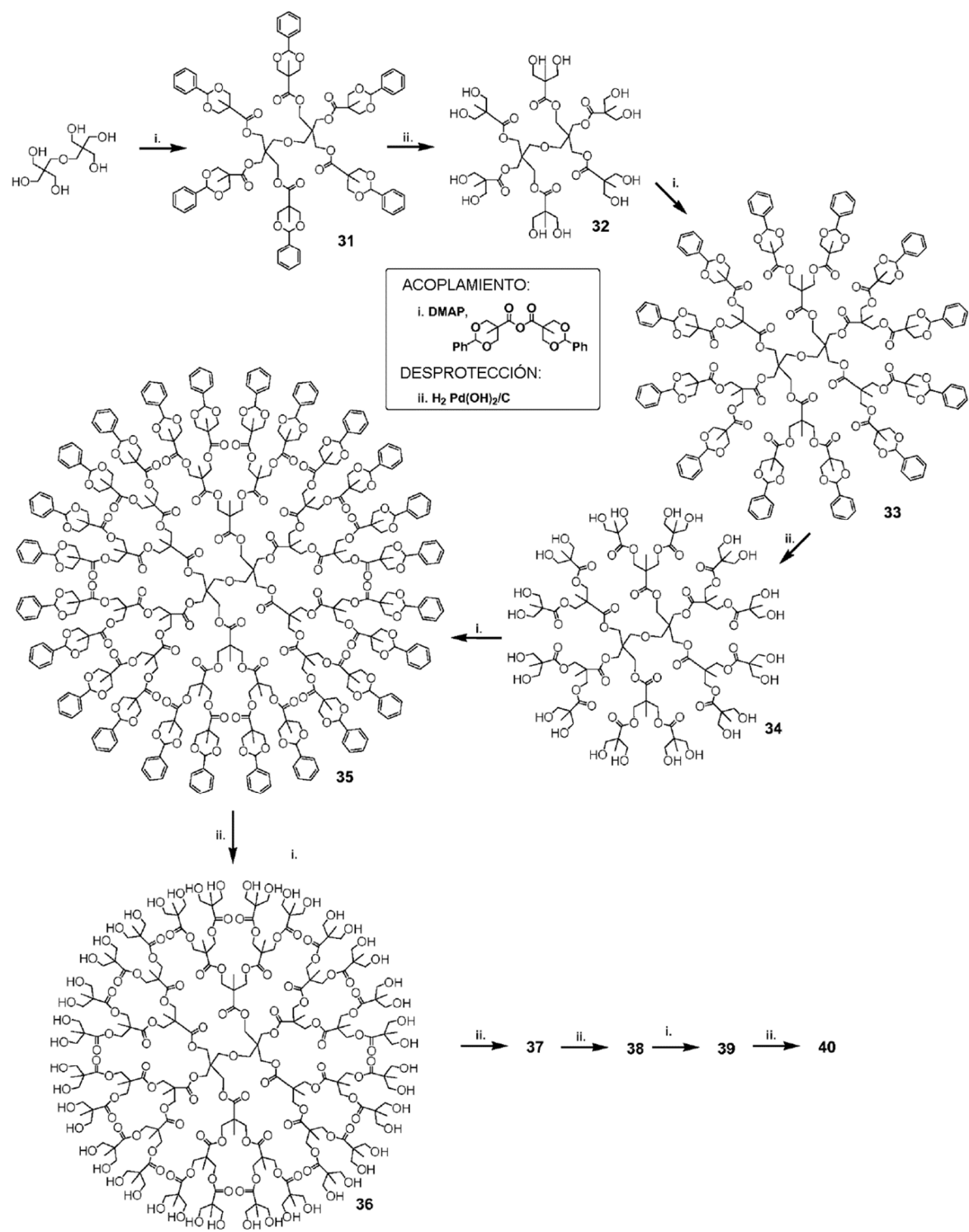


FIG. 4

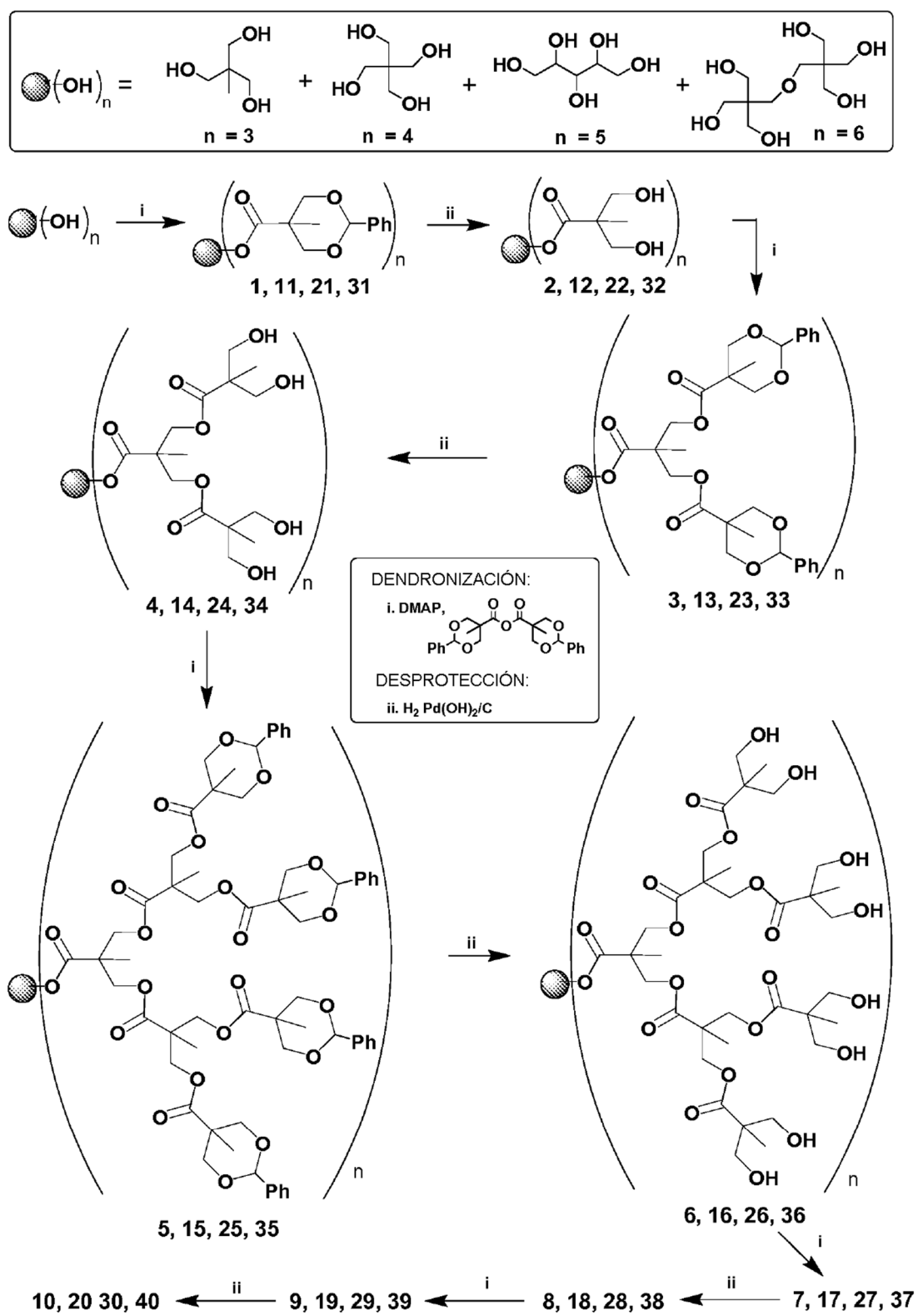


FIG. 5

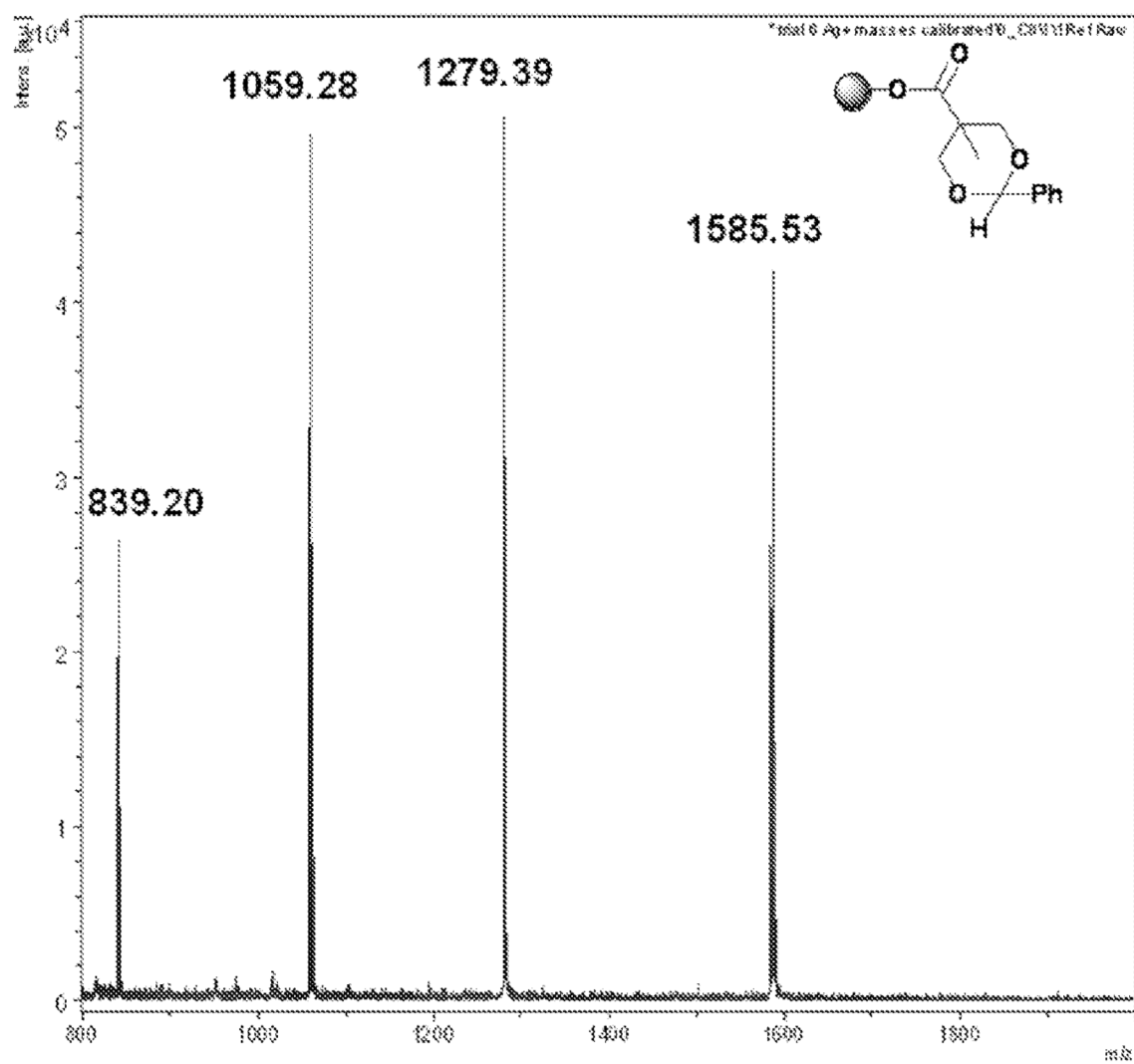


FIG. 6

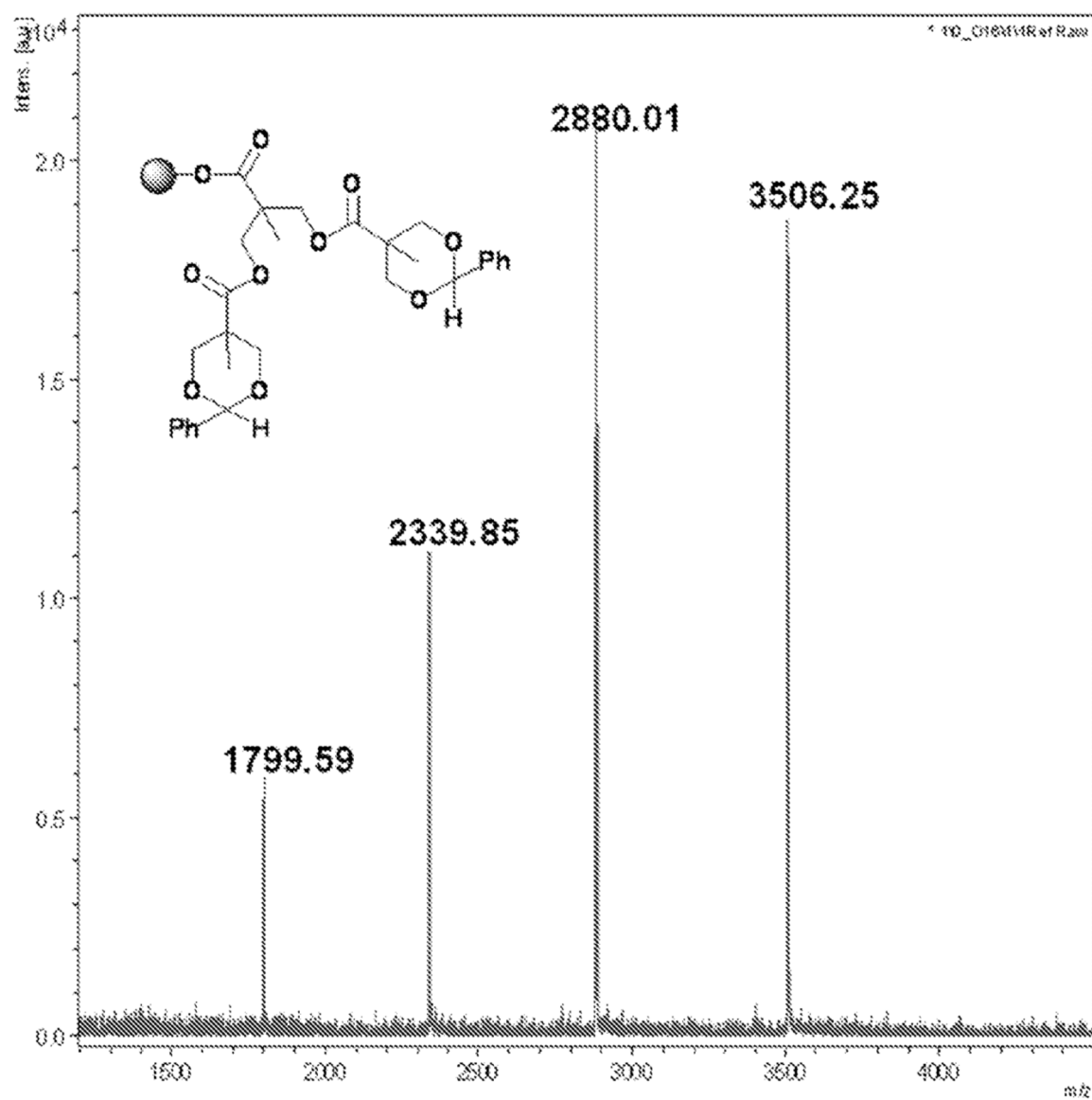


FIG. 7

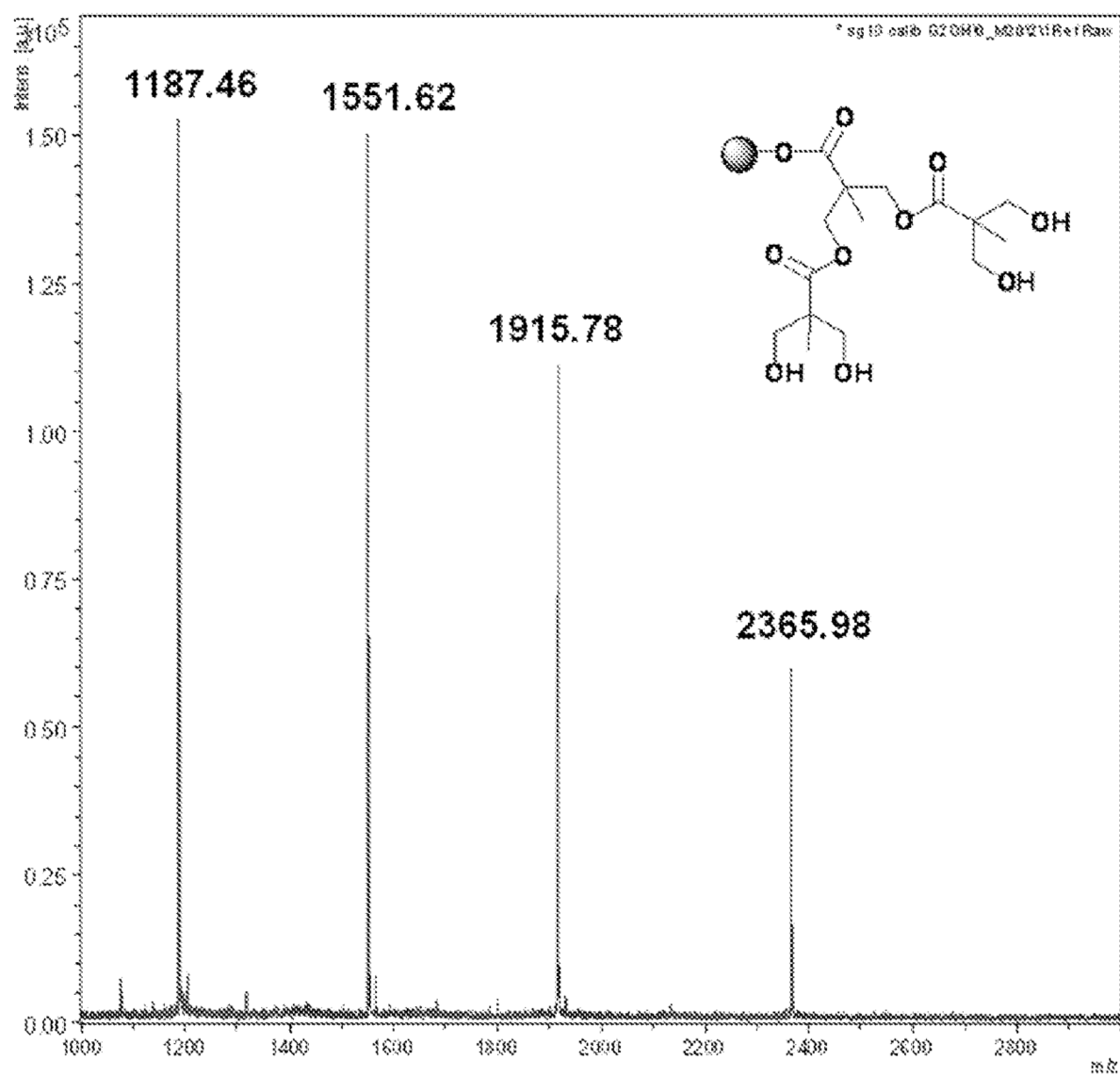


FIG. 8

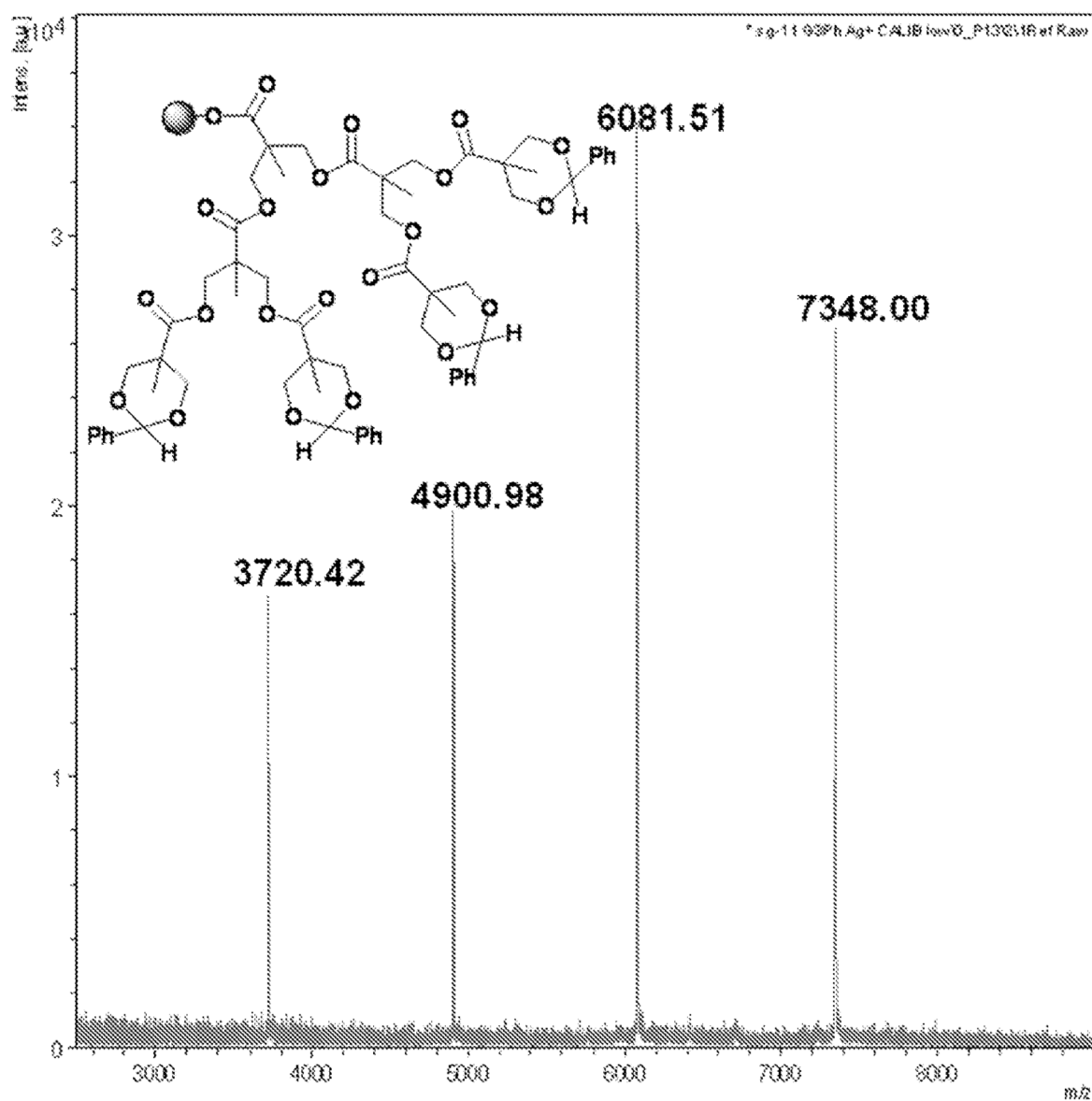


FIG. 9

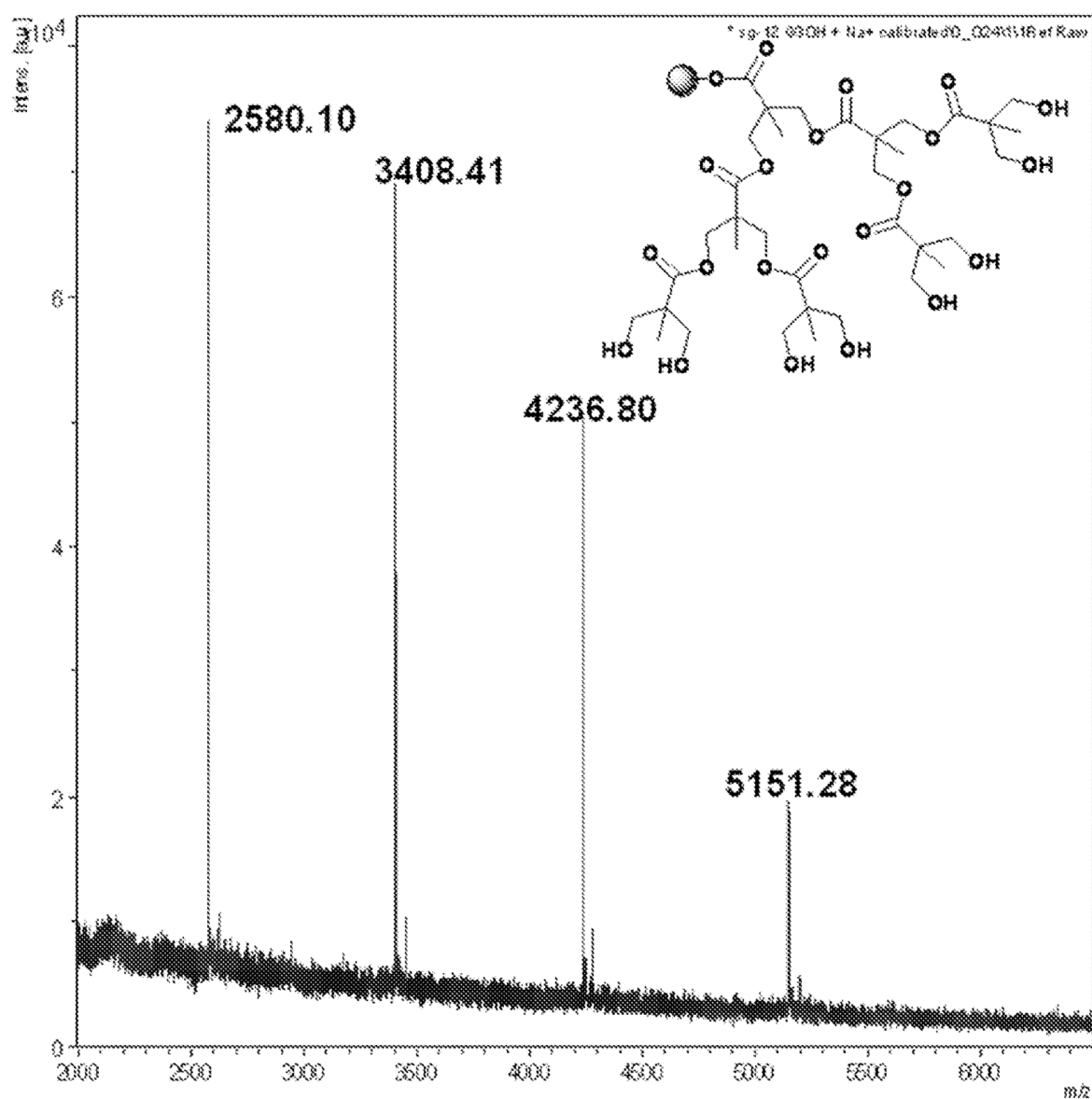


FIG. 10

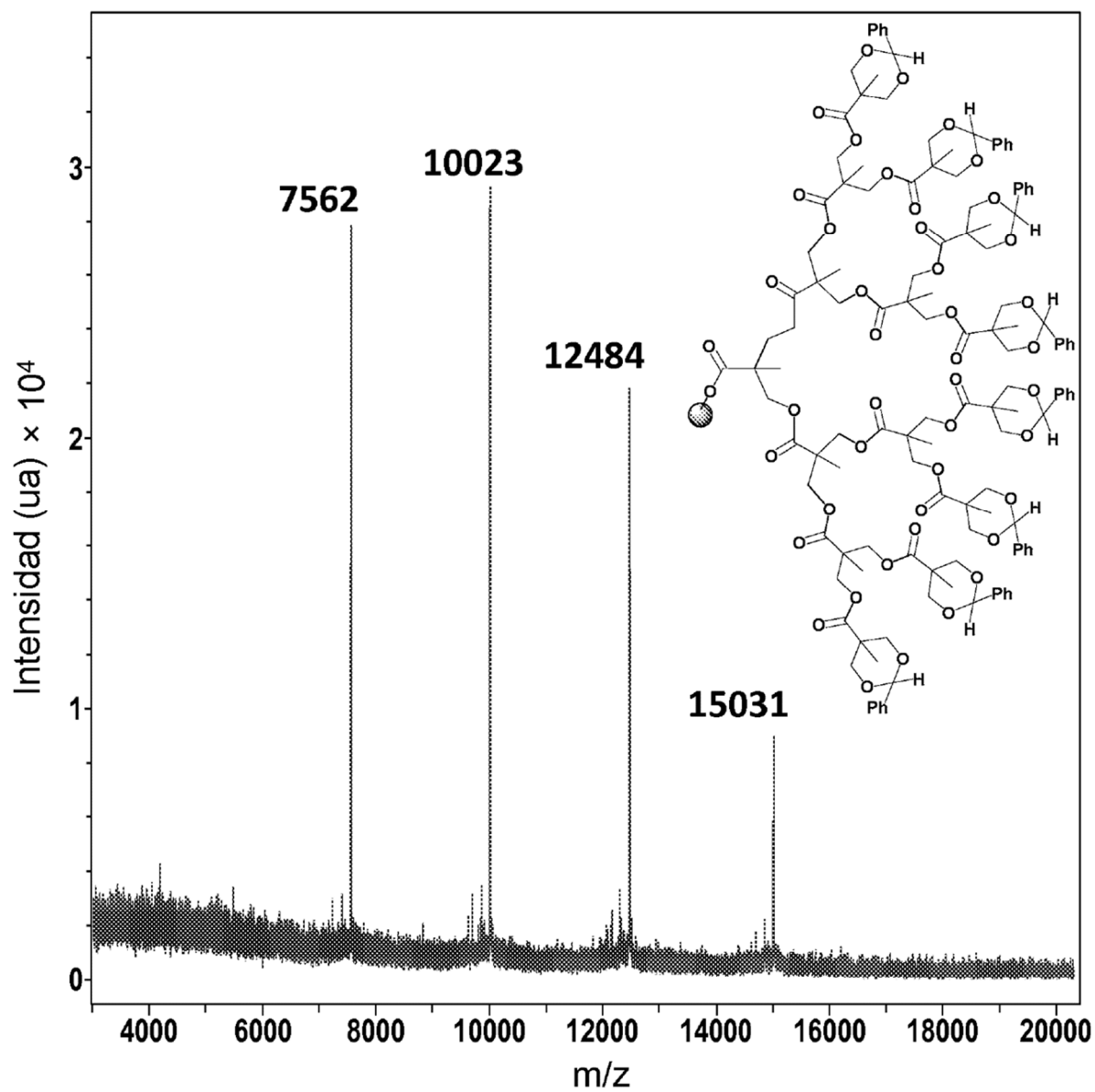


FIG. 11

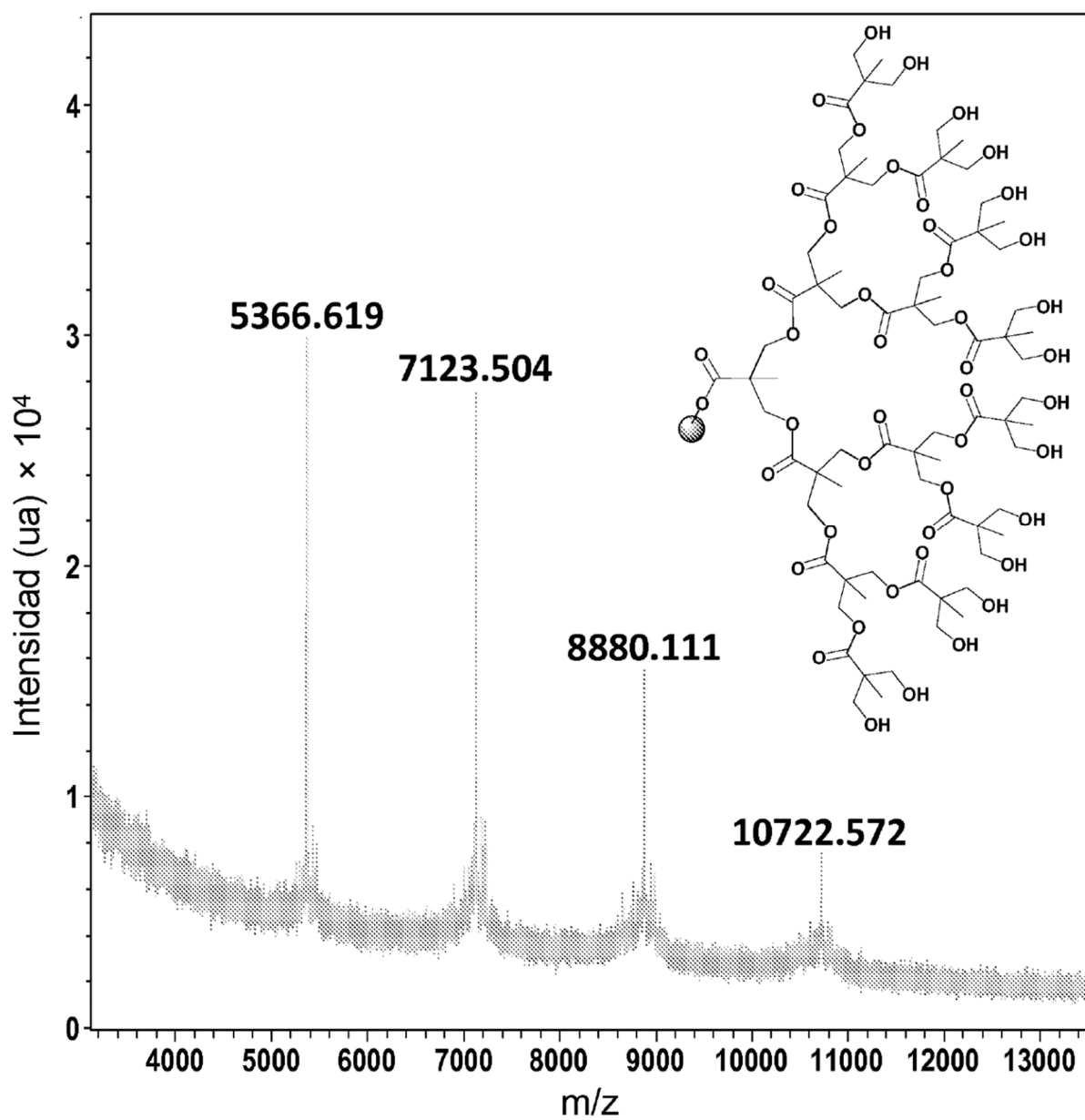


FIG. 12

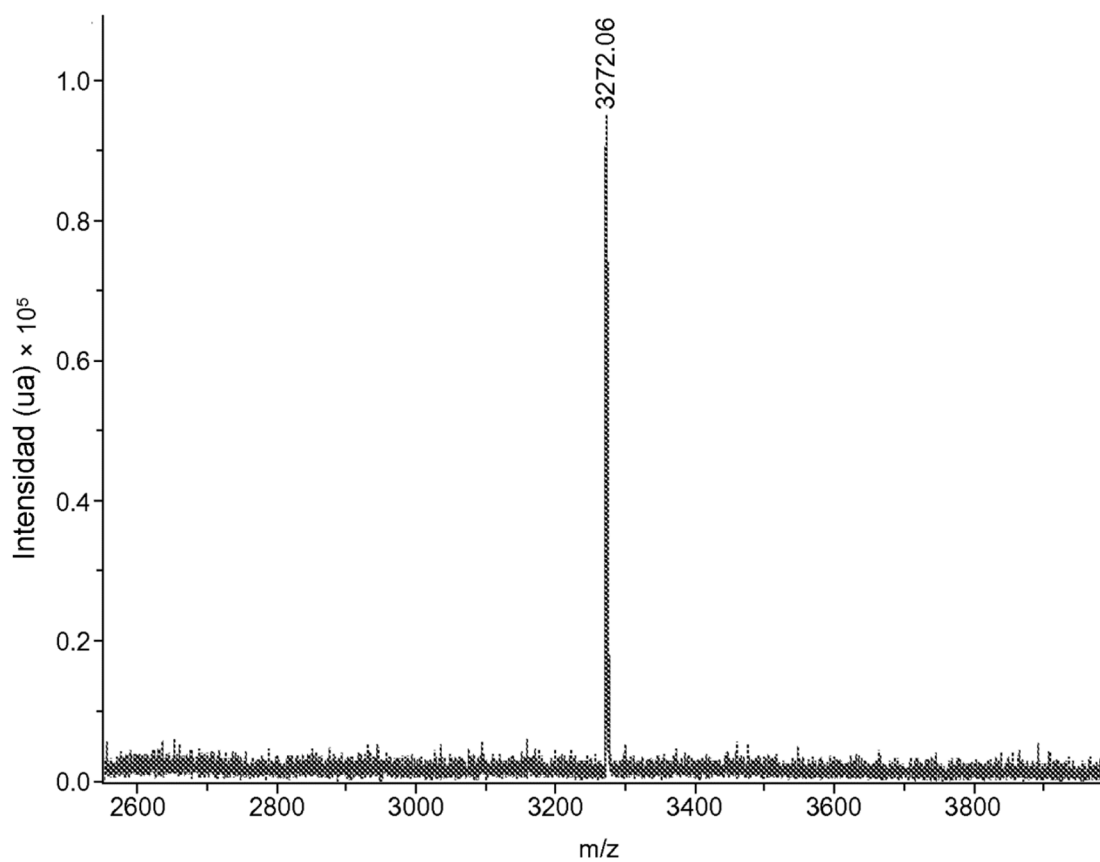


FIG. 13A

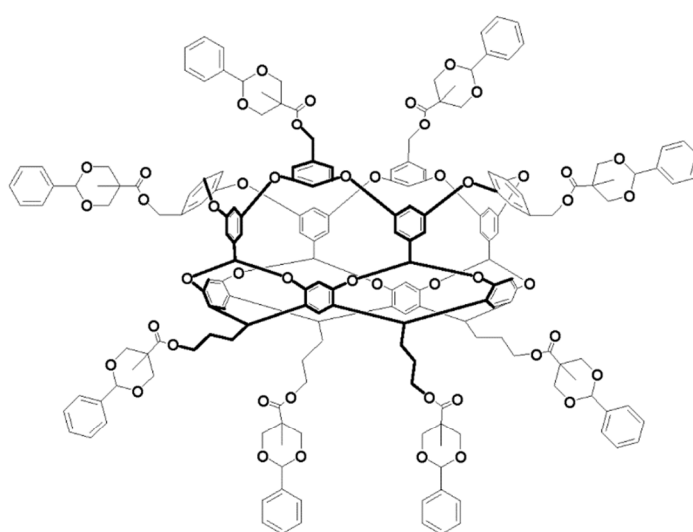


FIG. 13B

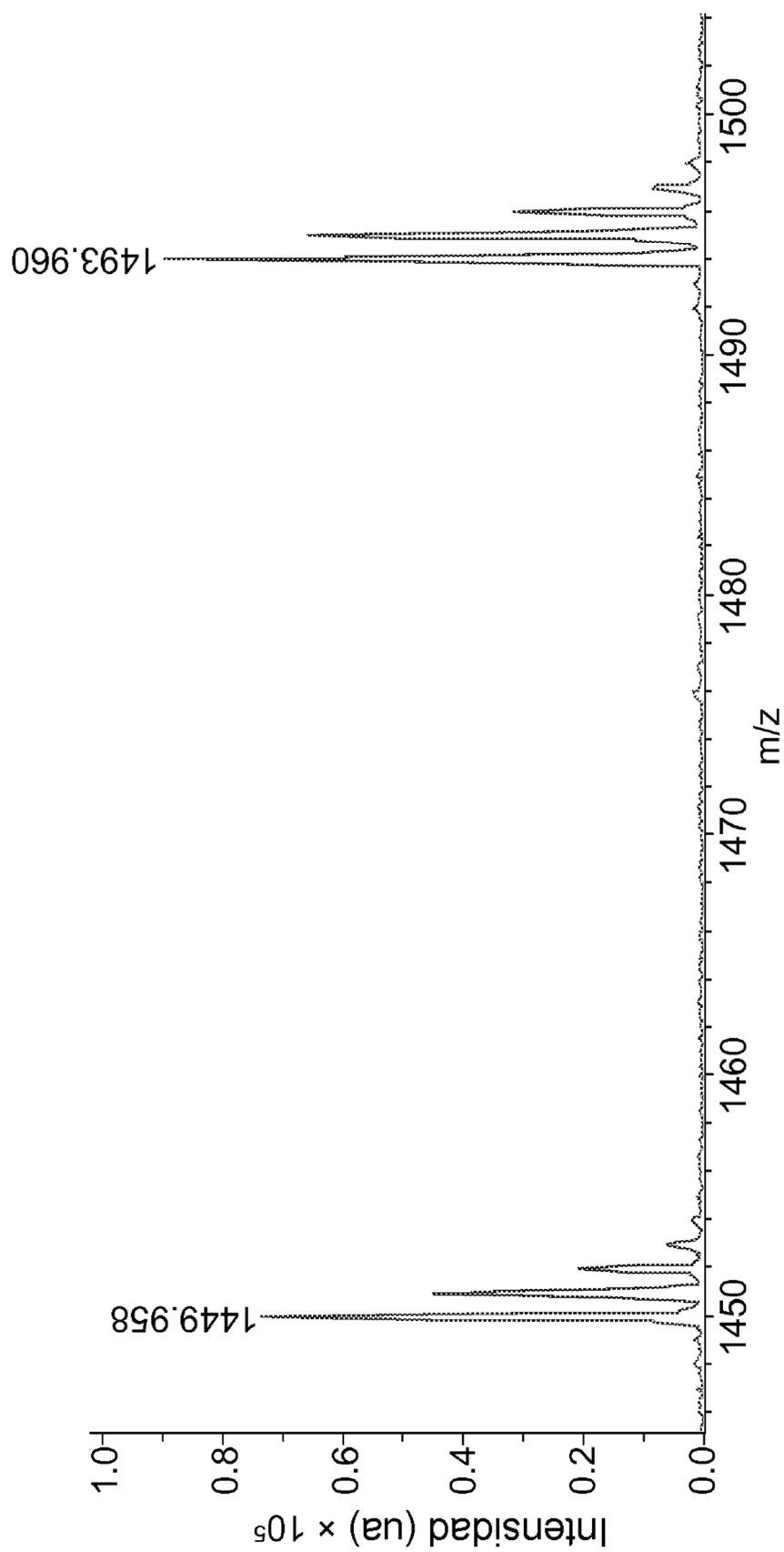


FIG. 14

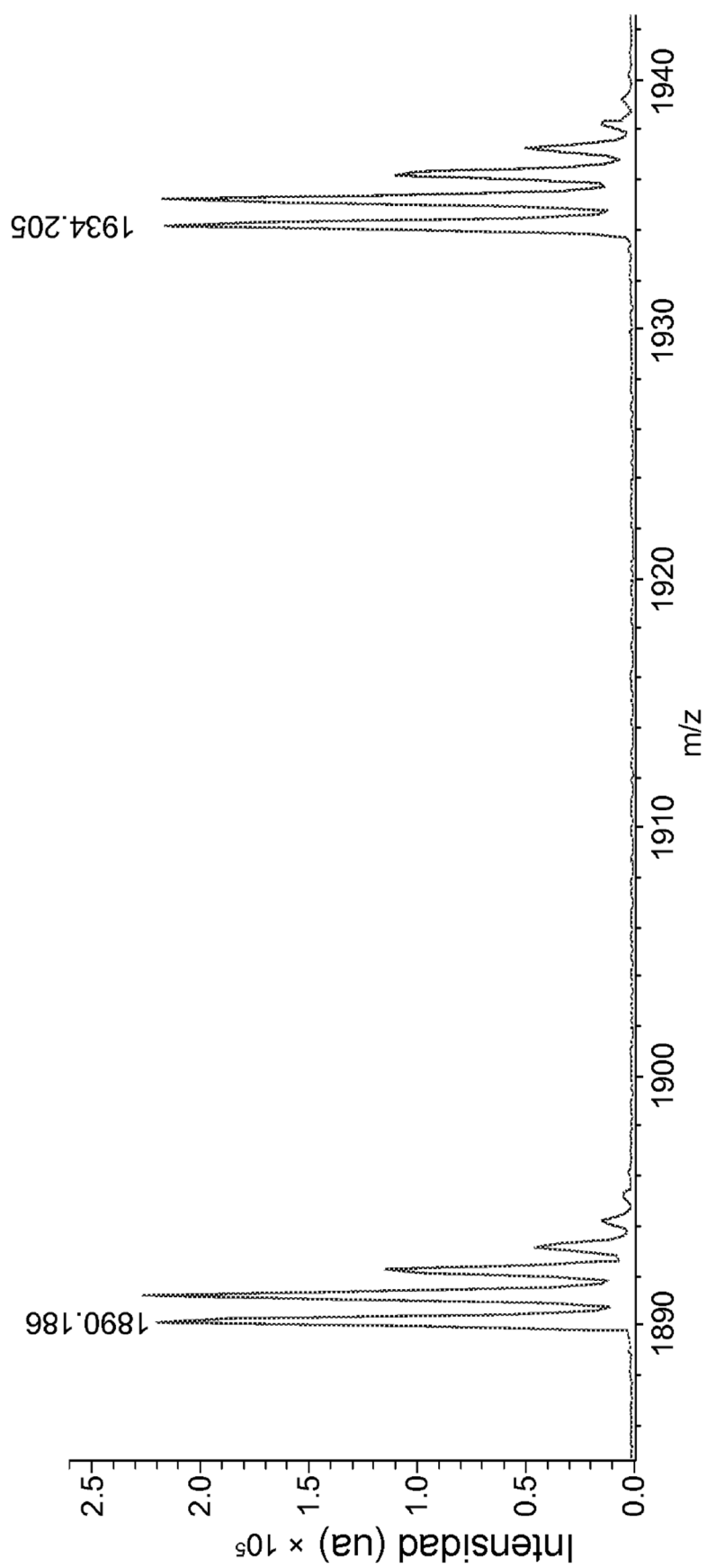


FIG. 15

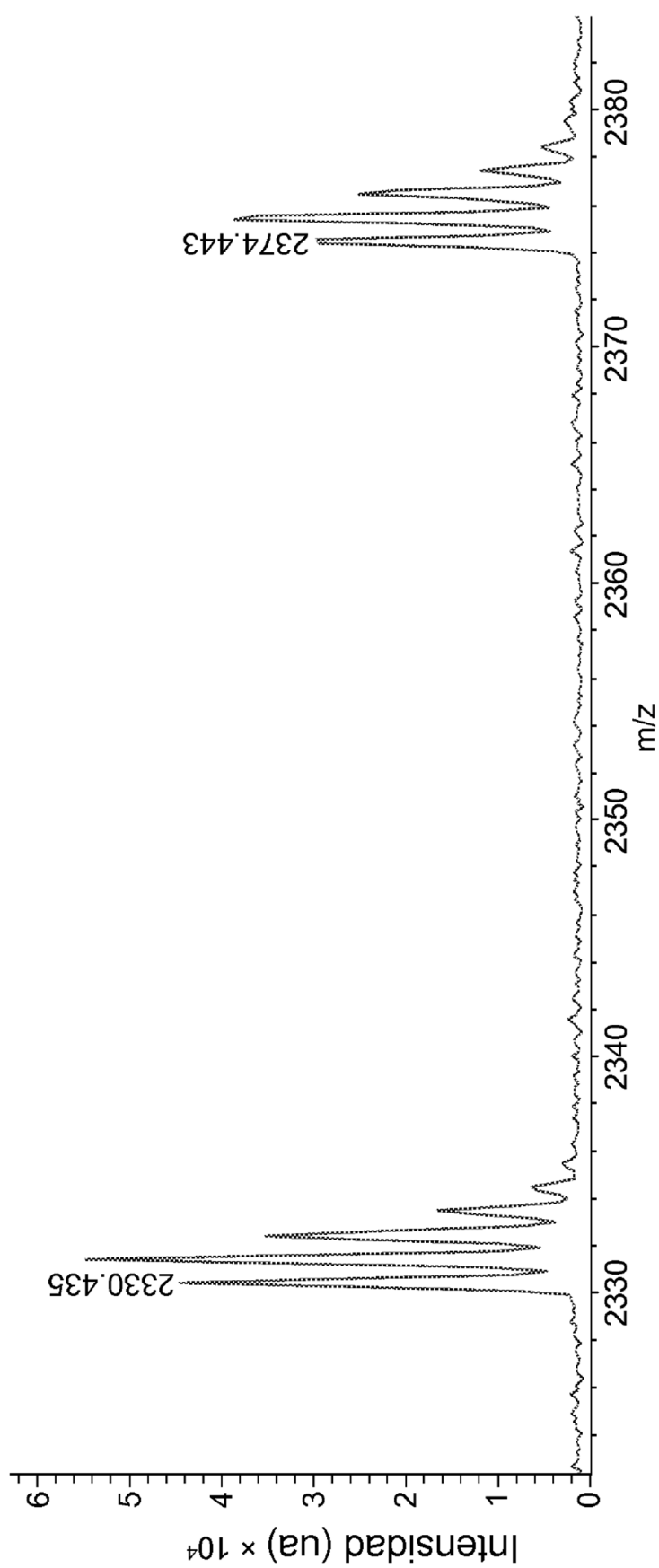


FIG. 16

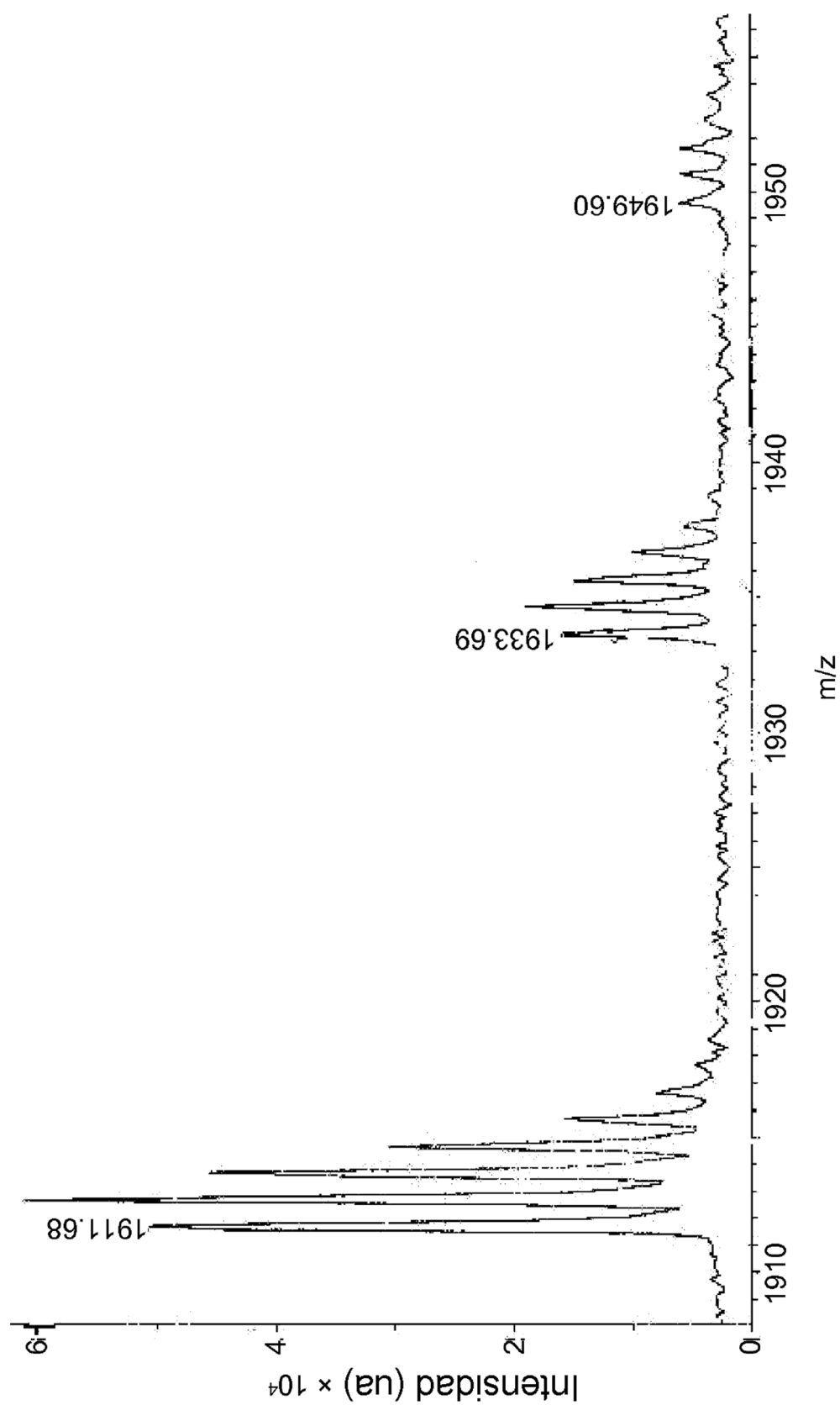


FIG. 17

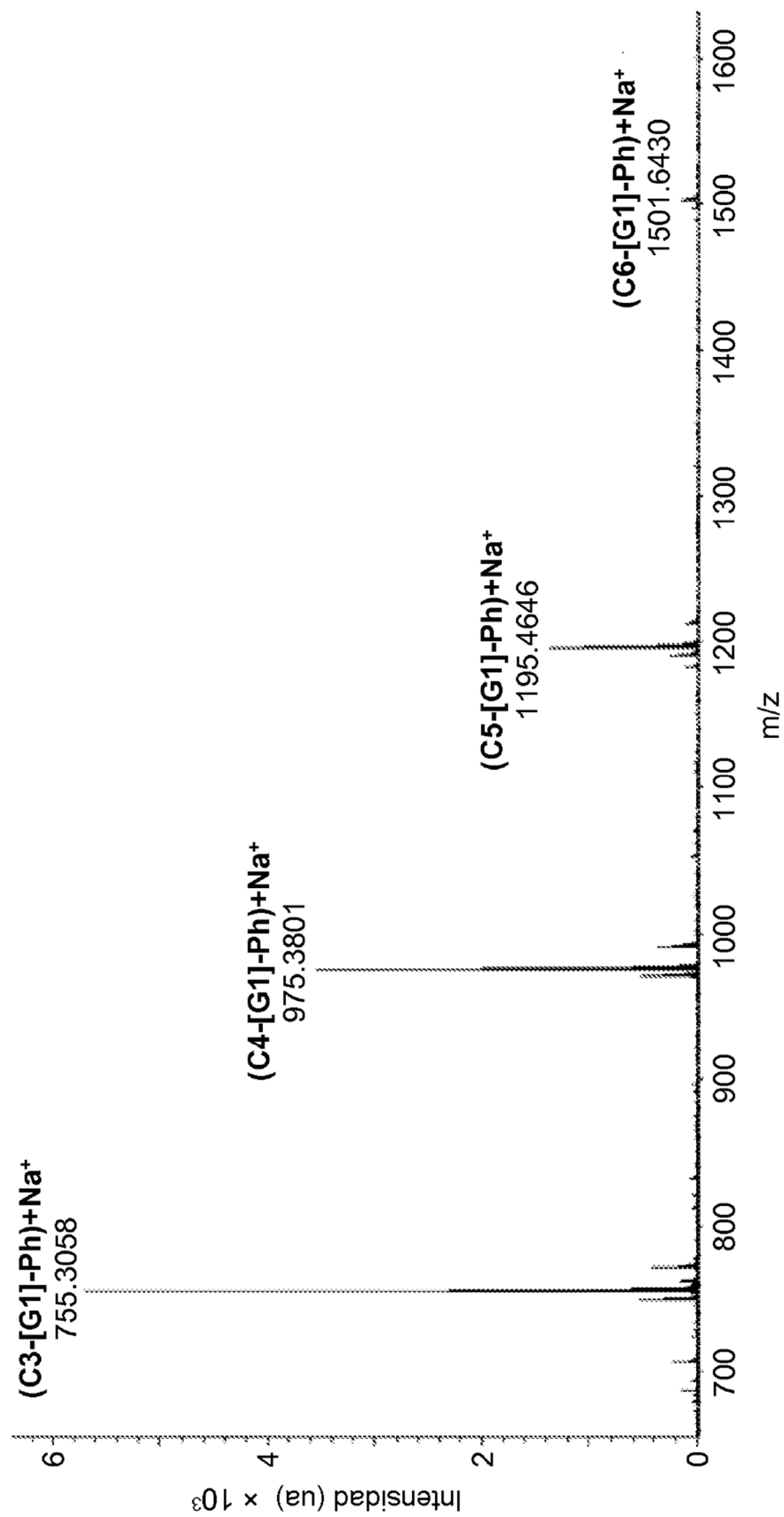


FIG. 18

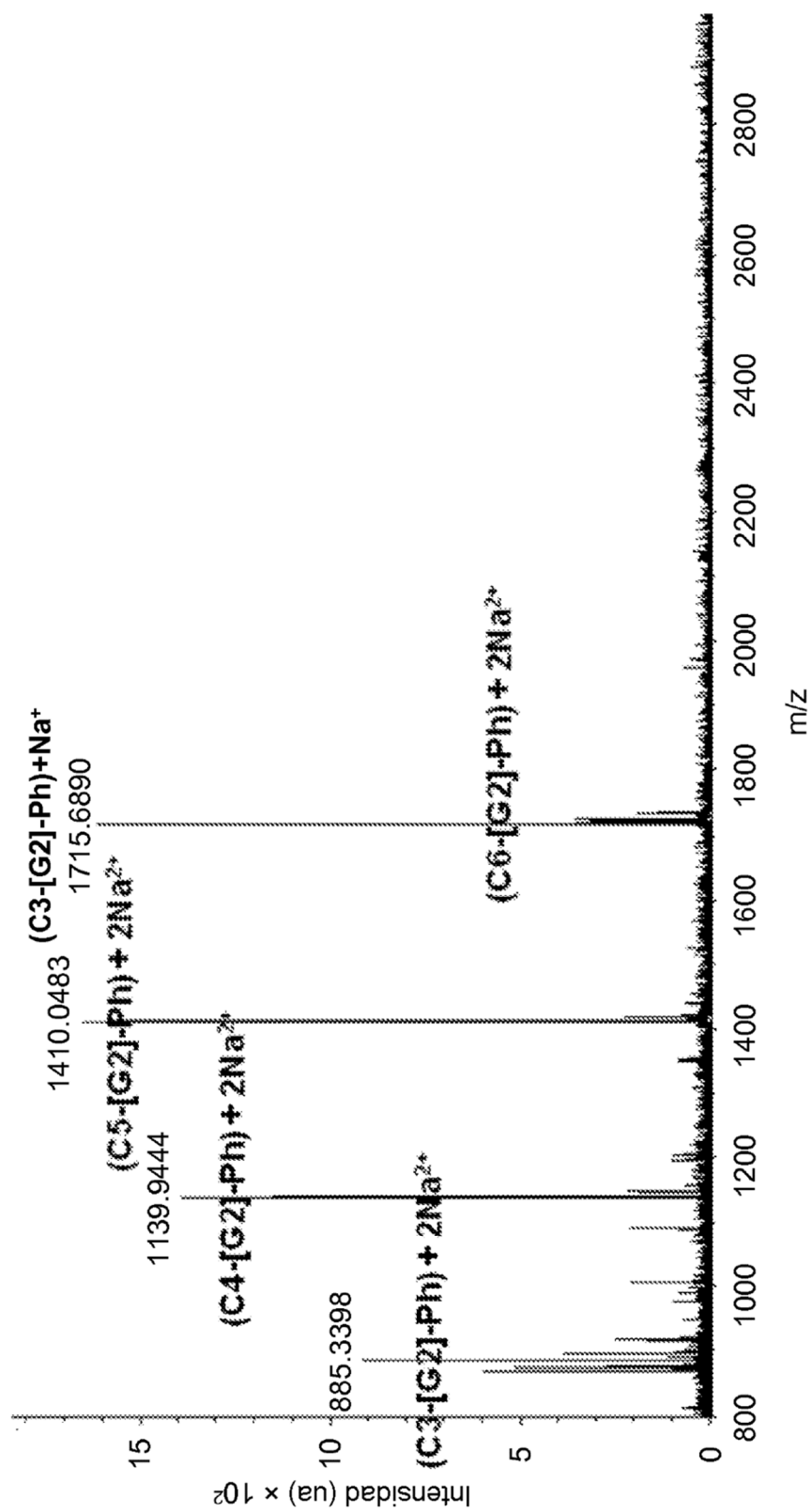


FIG. 19