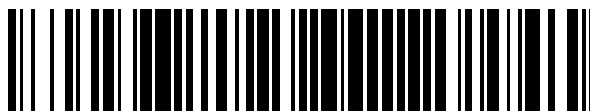


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 897**

51 Int. Cl.:

**C07C 245/00** (2006.01)

**C07C 291/02** (2006.01)

**A61K 31/655** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012 PCT/US2012/052350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13029009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12825927 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2748141**

54 Título: **Macromoléculas de liberación de óxido nítrico ajustables que tienen múltiples estructuras donantes de óxido nítrico**

30 Prioridad:

**24.08.2011 US 201161526918 P**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**NOVAN, INC. (50.0%)**

**P.O. Box 110023**

**Research Triangle Park, North Carolina 27713, US**

**y**

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT**

**CHAPEL HILL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHOENFISCH, MARK;**

**LU, YUAN;**

**STASKO, NATHAN y**

**BAO, JIAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 658 897 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

Macromoléculas de liberación de óxido nítrico ajustables que tienen múltiples estructuras donantes de óxido nítrico

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos que liberan óxido nítrico. Más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones macromoleculares para ajustar la cinética de liberación de óxido nítrico con fines terapéuticos.

### Antecedentes de la invención

10 Se sabe que el óxido nítrico posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana y se puede usar como una alternativa a los antibióticos convencionales para las bacterias resistentes a los fármacos. Además, algunos estudios recientes han demostrado que el óxido nítrico también puede desempeñar un papel importante en el proceso de cicatrización promoviendo la angiogénesis a través de la estimulación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el aumento de la síntesis de colágeno de fibroblastos. Véase Schaffer MR, y col., Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: A possible pathophysiologic correlation. Surgery 1997;121(5):513-9; y Shi HP, y col., The role of iNOS in wound healing. Surgery 2001; 130 (2):225-9. Por lo tanto, el óxido nítrico presenta una adición y/o alternativa prometedoras al tratamiento antibiótico convencional para el cuidado de heridas.

15 El óxido nítrico es un gas a temperatura ambiente y presión atmosférica, y tiene una semivida corta en un medio fisiológico. Se han desarrollado varios profármacos donantes de óxido nítrico de molécula pequeña que han contribuido enormemente a la comprensión del óxido nítrico en varias patologías. Sin embargo, debido a problemas con la estabilidad, la liberación indiscriminada de NO, la cinética de liberación de óxido nítrico monotípico, y la incapacidad de dirigirse a tipos de tejidos específicos, actualmente no existen soluciones clínicamente viables para la administración de óxido nítrico fuera de su forma gaseosa. Es importante administrar de manera reproducible los niveles apropiados de óxido nítrico para una indicación terapéutica dada, ya que la liberación de grandes cantidades de óxido nítrico puede ser tóxica o crear efectos secundarios no deseados tales como disminuciones en la angiogénesis o aumento de la inflamación. Por lo tanto, ha sido un reto usar óxido nítrico en un entorno terapéutico, distinto de la aplicación exógena, particularmente en aplicaciones tópicas en las que el óxido nítrico tiene efectos dependientes de la concentración y se beneficia de una administración controlada y específica.

20 Los dendrímeros son una familia de macromoléculas hiperramificadas con superficies multivalentes que permiten el diseño de vehículos de administración de agentes terapéuticos dirigidos. Por ejemplo, se han utilizado dendrímeros de poliamidoaminas, poliaminas, polipéptidos, poliésteres y poliéteres para una amplia gama de aplicaciones biomédicas, incluyendo la administración de fármacos y genes, la obtención de imágenes biológicas, y la ingeniería de tejidos. Los dendrímeros también se han usado como donantes de óxido nítrico macromolecular.

25 Las nanopartículas de sílice híbridas inorgánicas-orgánicas también se han explorado para aplicaciones que incluyen separación, etiquetado biológico, diagnóstico, y sistemas de soporte para la administración controlada de fármacos. El potencial de suministro de fármacos de las partículas de sílice ha recibido mucha atención debido a su versatilidad física y química y su naturaleza no tóxica. Otros materiales, incluidas las nanopartículas metálicas funcionalizadas, también se han utilizado en la administración de fármacos. Dichas nanopartículas también se han usado como donantes de óxido nítrico macromolecular.

### Sumario de la invención

30 Se proporcionan de acuerdo con las realizaciones de la invención, macromoléculas de liberación de óxido nítrico que incluyen al menos dos estructuras donantes de NO diferentes de la misma clase. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen una macromolécula de liberación de óxido nítrico de acuerdo con una realización de la invención, y procedimientos para administrar dichas macromoléculas y/o composiciones a un sujeto.

### Breve descripción de las figuras

35 Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones ejemplares de la invención y los dibujos adjuntos. Los dibujos no son necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de la invención.

40 La **figura 1** es un esquema de la síntesis de conjugados de PPI funcionalizados con amina secundaria-diazeniodiolato, en la que n representa el número de aminas primarias en la periferia de los dendrímeros de PPI (n = 8, 16, 32 y 64).

Las **figuras 2A** y **2B** son gráficos que proporcionan (**2A**) un perfil de liberación de NO en tiempo real para conjugados dendrímeros G4-PPI de liberación de NO; y (**2B**) un gráfico de t[NO] frente al tiempo para los conjugados dendrímeros de PPI de liberación de NO.

45 La **figura 3** es un esquema que ilustra G5-PPI-PO/ACN modificado con diazeniodiolato (n = 32) y representa los grupos donantes de NO estructuralmente diferentes y el entorno nano circundante del sistema "multidonante"

(mostrado en una relación 1:1 como un ejemplo).

La **figura 4** proporciona un espectro de RMN <sup>1</sup>H de G5-PPI-PO (c-64) (A), G5-PPI-ACN (a-64) (E), G5-PPI-PO/ACN a relaciones molares de 7:3 (B), 5:5 (C), y 3:7 (D). Las composiciones reales de PO y ACN incorporadas en estos tres conjugados de PPI están en relaciones molares de 27:73 (B), 40:60 (C) y 60:40 (D) respectivamente, como se determina mediante la integración de dos desplazamientos químicos en 1,10 y 2,80 ppm.

Las **figuras 5A** y **5B** son gráficos que proporcionan (**5A**) una gráfica experimental del porcentaje de NO total liberado en PBS (pH = 7,4) a 37 °C en función del tiempo para los conjugados G5-PPI-PO, G5-PPI-ACN y G5-PPI-PO/ACN; (**5B**) un gráfico simulado del porcentaje total de NO liberado para los conjugados G5-PPI-PO/ACN.

La **figura 6** es un esquema que ilustra una síntesis de una red de sílice co-condensada multidonante de acuerdo con una realización de la invención.

La **figura 7** es un gráfico de liberación controlada para sílice co-condensada de un solo donante y para diversas combinaciones de múltiples donantes, con una liberación total de NO normalizada.

La **figura 8A** es un gráfico de liberación controlada para sílice co-condensada de un solo donante y para diversas combinaciones de múltiples donantes, con una concentración de NO máx. normalizada.

La **figura 8B** es un gráfico de liberación controlada para sílice co-condensada de un solo donante y para diversas combinaciones de múltiples donantes, con una concentración de NO máx. normalizada.

La **figura 9A** es un gráfico que ilustra la diferencia en el perfil de liberación de una mezcla multidonante de Nitricil™ y una mezcla Nitricil™.

La **figura 9B** es un gráfico que ilustra la diferencia en la degradación de una mezcla multidonante de Nitricil™ y una mezcla de Nitricil™ en una solución de pH 12.

La **figura 10** es un esquema que ilustra una macromolécula de quitosano funcionalizado multidonante con una porción del andamio restante acetilada.

### **Descripción detallada de algunas realizaciones de la invención**

Los aspectos anteriores y otros aspectos de la presente invención se describirán ahora con más detalle con respecto a la descripción y a las metodologías proporcionadas en el presente documento. Debería apreciarse que la invención puede realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. En su lugar, estas realizaciones se proporcionan de manera que esta descripción sea minuciosa y completa, y transmitirán completamente el ámbito de la invención a los expertos en la técnica.

La terminología usada en la descripción de la invención en el presente documento es para el fin de describir solamente realizaciones particulares y no se destina a ser limitante de la invención. Como se usa en la descripción de las realizaciones de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" se destinan a incluir asimismo las formas plurales, salvo que el contexto claramente indique lo contrario. Asimismo, como se usa en el presente documento, "y/o" se refiere a todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los artículos enumerados asociados. Además, el término "aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto, dosis, tiempo, temperatura, y similares, pretende incluir variaciones del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, o incluso del 0,1 % de la cantidad especificada. Se entenderá además que los términos "comprende" y/o "que comprende", cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes, y/o grupos de los mismos. A menos que se defina de otro modo, todos los términos, incluidos los términos técnicos y científicos utilizados en la descripción, tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

En el caso de una terminología conflictiva, la presente memoria descriptiva es determinante.

Las realizaciones descritas en un aspecto de la presente invención no se limitan al aspecto descrito. Las realizaciones también se pueden aplicar a un aspecto diferente de la invención siempre que las realizaciones no impidan que estos aspectos de la invención funcionen para su fin previsto.

### **Definiciones químicas**

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a C<sub>1-20</sub> incluido, cadenas de hidrocarburo lineal (es decir, "de cadena lineal"), ramificado o cíclico, saturado o al menos parcialmente, y en algunos casos, completamente insaturado (es decir, alqueno y alquino), incluyendo, por ejemplo, grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, octenilo, butadienilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo y anelilo. "Ramificado" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, tal como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena de alquilo lineal. Los grupos alquilo ramificado ejemplares incluyen, pero sin limitación, isopropilo, isobutilo, *terc*-butilo. "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono (es decir, un alquilo C<sub>1-8</sub>), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 átomos de carbono. "Alquilo superior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 10 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C<sub>1-5</sub> de cadena lineal. En otras realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C<sub>1-5</sub> de cadena ramificada.



pueden ser iguales o diferentes.

"Aralquileno" se refiere a un grupo bivalente que contiene tanto grupos alquilo como arilo. Por ejemplo, los grupos aralquileno pueden tener dos grupos alquilo y un grupo arilo (es decir, -alquil-aril-alquilo), un grupo alquilo y un grupo arilo (es decir, -alquil-arilo) o dos grupos arilo y un grupo alquilo (es decir, -aril-alquil-aril-).

5 El término "amino" y "amina" se refieren a grupos que contienen nitrógeno, tales como  $\text{NR}_3$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NHR}_2$ , y  $\text{NH}_2\text{R}$ , en los que R puede ser alquilo, alquilo ramificado, cicloalquilo, arilo, alquileno, arileno, aralquileno. Por lo tanto, "amino", como se usa en el presente documento, puede referirse a una amina primaria, una amina secundaria, o una amina terciaria. En algunas realizaciones, un R de un grupo amino puede ser un diazeniodiolato estabilizado con cationes (es decir,  $\text{NONO}^+\text{X}^-$ ).

10 Los términos "amina catiónica" y "amina cuaternaria" se refieren a un grupo amino que tiene un grupo adicional (es decir, un cuarto), por ejemplo, un hidrógeno o un grupo alquilo unido al nitrógeno. Por lo tanto, las aminas catiónicas y cuaternarias tienen una carga positiva.

El término "alquilamino" se refiere al grupo -alquil- $\text{NH}_2$ .

El término "carbonilo" se refiere al grupo  $-(\text{C}=\text{O})-$ .

15 El término "carboxilo" se refiere al grupo  $-\text{COOH}$  y el término "carboxilato" se refiere a un anión formado a partir de un grupo carboxilo, es decir,  $-\text{COO}^-$ .

Los términos "halo", "haluro" o "halógeno" como se usan en el presente documento, se refieren a grupos flúor, cloro, bromo, y yodo.

El término "hidroxilo" e "hidroxilo" se refiere al grupo  $-\text{OH}$ .

20 El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo  $-\text{OH}$ .

El término "mercapto" o "tio" se refiere al grupo  $-\text{SH}$ . El término "sililo" se refiere a un grupo que comprende un átomo de silicio (Si).

25 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxilano" se refiere a un compuesto que comprende uno, dos, tres, o cuatro grupos alcoxi unidos a un átomo de silicio. Por ejemplo, tetraalcoxilano se refiere a  $\text{Si}(\text{OR})_4$ , en la que R es alquilo. Cada grupo alquilo puede ser el mismo o diferente. Un "alquilsilano" se refiere a un alcoxilano en el que uno o más de los grupos alcoxi se han reemplazado por un grupo alquilo. Por lo tanto, un alquilsilano comprende al menos un enlace alquil-Si. La expresión "silano fluorado" se refiere a un alquilsilano en el que uno de los grupos alquilo está sustituido con uno o más átomos de flúor. La expresión "silano catiónico o aniónico" se refiere a un alquilsilano en el que uno de los grupos alquilo está sustituido adicionalmente con un sustituyente alquilo que tiene una carga positiva (es decir, catiónica), o una carga negativa (es decir, aniónica), o puede cargarse (es decir, es ionizable) en un entorno particular (es decir, in vivo).

30

El término "silanol" se refiere a un grupo  $\text{Si}-\text{OH}$ .

35 La expresión "grupo funcional orgánico" se refiere a cualquier grupo funcional orgánico conocido, incluyendo todos los grupos funcionales analizados anteriormente, ya sea en solitario o en combinación. El grupo funcional orgánico puede tener cualquier valencia adecuada. En algunos casos, los grupos funcionales orgánicos son divalentes,  $-\text{R}-$ , y en algunos casos, los grupos funcionales orgánicos son monovalentes,  $-\text{R}$ .

### **Compuestos multidonantes**

40 Se proporcionan de acuerdo con algunas realizaciones de la invención macromoléculas que incluyen al menos dos estructuras donantes de óxido nítrico (NO) diferentes de la misma clase. Los donantes de NO son de la misma clase si tienen el mismo mecanismo para la liberación de óxido nítrico (por ejemplo, N-diazeniodiolato, S-nitrosotiol, etc.). Los donantes de NO de la misma clase se pueden variar para proporcionar estructuras donantes de NO alterando los grupos funcionales sustituidos en los donantes de NO. Por consiguiente, una estructura donante de óxido nítrico como se usa en el presente documento incluye al menos un donante de óxido nítrico y al menos un grupo funcional sustituido en el donante de óxido nítrico ("sustituyentes") que juntos proporcionan la estructura donante de óxido nítrico completa y un comportamiento característico de liberación de NO para esa estructura donante de óxido nítrico.

45

50 El grupo funcional sustituido en el donante de NO puede afectar a la cinética de liberación de NO de la estructura donante de NO. Los inventores han descubierto que la combinación de diferentes estructuras donantes de NO en un marco macromolecular puede proporcionar la capacidad de ajustar y/o variar la velocidad de liberación del óxido nítrico de la macromolécula basándose en la combinación de las diferentes estructuras donantes de NO. En particular, en algunas realizaciones, la combinación de diferentes estructuras donantes de NO en una macromolécula puede crear un nano o microentorno que da como resultado un perfil de liberación de NO distinto, posiblemente como resultado de una interacción de los efectos de los diferentes grupos de sustituyentes funcionales

de las estructuras donantes de NO. Dichas macromoléculas también pueden denominarse en el presente documento macromoléculas "multidonantes". La hidrofobicidad/hidrofilicidad, el volumen estérico y la interacción de las diferentes estructuras donantes de NO entre sí y/u otros grupos funcionales en la macromolécula son algunos de los factores que pueden afectar a la velocidad de liberación de óxido nítrico. En algunos casos, las al menos dos estructuras donantes de NO diferentes pueden elegirse para crear un perfil de liberación de NO deseado para un uso particular.

En algunas realizaciones de la presente invención, la combinación de diferentes estructuras donantes de NO de la misma clase en una macromolécula puede dar como resultado un perfil de liberación de óxido nítrico que es la suma ponderada de los perfiles de liberación de las estructuras donantes de NO individuales. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el perfil de liberación de la macromolécula difiere de la suma ponderada de los perfiles de liberación de las estructuras donantes de NO individuales. En dichas realizaciones, pueden realizarse perfiles de liberación que de otro modo no se podrían conseguir mediante combinaciones de macromoléculas de liberación de NO con diferentes estructuras donantes de NO.

En cualquiera de los casos anteriores, la combinación de diferentes estructuras donantes de NO en una macromolécula puede aumentar la predictibilidad/probabilidad de que un determinado nivel de óxido nítrico esté presente en un lugar determinado sobre el uso de una mezcla de macromoléculas, cada una con una única estructura donante de NO. Por ejemplo, para un volumen unitario dado que contiene una mezcla de pequeñas moléculas de liberación de óxido nítrico con diferentes perfiles de liberación, para lograr un perfil de liberación deseado en un lugar determinado dentro del volumen, las moléculas pequeñas en esa ubicación no solo deben ser de suficiente cantidad, sino también deben ser de los tipos correctos y en las proporciones correctas para lograr el perfil de liberación.

Para el caso en el que el volumen contiene una mezcla de macromoléculas de liberación de óxido nítrico, la probabilidad de alcanzar los niveles locales de óxido nítrico puede aumentar ya que cada macromolécula libera más óxido nítrico y, por lo tanto, es necesario que haya menos macromoléculas en la ubicación determinada para lograr el nivel deseado de óxido nítrico. Por lo tanto, incluso si los niveles de liberación global de óxido nítrico son más bajos, la liberación de NO localizado puede ser mayor, lo que permite dosis más pequeñas para lograr resultados similares. Sin embargo, con una mezcla de macromoléculas de liberación de óxido nítrico, el problema de tener la proporción correcta para lograr el perfil deseado en una ubicación dada todavía puede estar presente.

Al combinar diferentes estructuras donantes de NO en una macromolécula, el perfil de liberación para la macromolécula puede controlarse de manera que cualquier ubicación dentro del volumen tendrá los mismos o similares perfiles de liberación. En tal caso, el único requisito para lograr el perfil de liberación deseado en la ubicación dada es si hay suficientes macromoléculas en la ubicación para alcanzar los niveles deseados. Sin embargo, como se ha analizado anteriormente, la macromolécula también aumenta esta probabilidad a niveles de dosis más bajos ya que cada macromolécula liberará niveles más altos de óxido nítrico que un donante de NO de molécula pequeña.

Además de proporcionar beneficios de rendimiento sobre las mezclas de diferentes donantes de liberación de óxido nítrico, la macromolécula multidonante también puede proporcionar beneficios de fabricación adicionales. Por ejemplo, mediante la creación de una macromolécula con diferentes donantes de NO, se puede proporcionar una única composición farmacéutica con, en algunas realizaciones, las características de los donantes de NO constituyentes y, en otras realizaciones, una nueva característica diferente de la de cualquiera de los constituyentes. Por lo tanto, los problemas de uniformidad de la mezcla, la variabilidad del lote, y similares, pueden reducirse o eliminarse en gran medida.

Además de permitir el ajuste y/o control del perfil de liberación de una macromolécula de liberación de NO, la utilización de diferentes estructuras donantes de NO de la misma clase en una macromolécula también puede mejorar la estabilidad de la estructura donante de NO independiente y/o la estabilidad de toda la macromolécula de liberación de NO.

En algunas realizaciones, el donante de NO incluye un diazeniodiolato. Los diazeniodiolatos reaccionan con los donantes de protones para liberar NO a pH fisiológico (~7,4), por lo que los grupos funcionales químicos que están sustituidos en el donante de diazenio-diolato pueden afectar a la capacidad del diazeniodiolato para reaccionar con los donantes de protones. Se proporcionan de acuerdo con algunas realizaciones de la invención macromoléculas que incluyen al menos dos estructuras donantes de NO diazeniodiolato diferentes. En algunos casos, las al menos dos estructuras donantes de NO de diazeniodiolato diferentes pueden elegirse para crear un perfil de liberación de NO deseado para un uso particular. Puede usarse cualquier estructura donante de NO de diazeniodiolato adecuada, incluyendo, por ejemplo, diazeniodiolatos basados en C y basados en N, diazeniodiolatos protegidos con O<sub>2</sub>, y similares.

En algunas realizaciones, al menos una de las estructuras donantes de diazeniodiolato incluye la fórmula -R-N(NONO·X<sup>+</sup>)-R', en la que R es un grupo funcional orgánico divalente, R' es un grupo funcional orgánico monovalente, y X<sup>+</sup> es un catión monovalente. En algunas realizaciones, R incluye alquileo o arilalquileo, R' incluye alquilo, alquilo sustituido, alquilnitrilo, arilo, arilo sustituido, alquilarilo, poliéter y/o alquilamino, y X<sup>+</sup> incluye Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

Los ejemplos de otras clases de donantes de NO incluyen nitrosotioles, nitrosaminas, hidroxil nitrosaminas, hidroxilaminas, hidroxioreas, complejos metálicos, nitritos orgánicos y nitratos orgánicos.

Como se ha descrito anteriormente, las realizaciones de la invención proporcionan una macromolécula de liberación de NO. Como se usa en el presente documento, una "macromolécula" se define con un peso molecular de 500 daltons o más. Se puede usar cualquier tamaño adecuado de macromolécula. Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, el radio hidrodinámico de la macromolécula de liberación de NO está dentro de un intervalo de 0,01 nm a 1 nm, en algunas realizaciones en un intervalo de 1 nm a 10  $\mu\text{m}$ , en algunas realizaciones en un intervalo de 101 nm a 1000 nm, y en algunas realizaciones, en un intervalo de 1000 nm a 10  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el radio hidrodinámico es mayor de 10  $\mu\text{m}$ , en algunas realizaciones, en un intervalo de 10  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ , en algunas realizaciones, mayor de 100  $\mu\text{m}$ , y en algunas realizaciones, mayor de 1000  $\mu\text{m}$ .

### **Dendrímeros**

En algunas realizaciones de la invención, la macromolécula de liberación de NO incluye un dendrímero. Se puede usar cualquier dendrímero adecuado, incluyendo, por ejemplo, dendrímero de polipropilenoimina (PPI); un dendrímero de poliamidoamina (PAMAM); dendrímero de poliariéter; dendrímero polipeptídico; dendrímero de poliamida; poliglicerol dendrítico; y dendrímero de triazina.

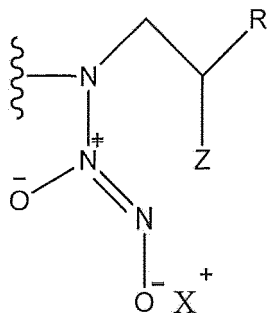
Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para sintetizar los dendrímeros. Los dendrímeros particulares y procedimientos para formar los mismos se describen en detalle en los ejemplos a continuación. Se conocen en la técnica otros procedimientos para sintetizar dendrímeros, y se pueden usar para formar dendrímeros multidonantes.

En algunas realizaciones, el dendrímero incluye al menos dos estructuras donantes de NO de diazeniodiolato diferentes. En algunos casos, el dendrímero puede incluir un diazeniodiolato de liberación de NO relativamente rápido junto con un diazeniodiolato relativamente lento. Las combinaciones moderadas/rápidas y moderadas/lentas también pueden ser deseables en algunos casos. En realizaciones particulares, al menos una de las estructuras donantes de NO de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO que está dentro de un intervalo de 30 segundos a 10 minutos, y al menos una estructura donante de NO de diazeniodiolato que tiene una vida media de liberación de NO de más de 60 minutos (por ejemplo, que está dentro de un intervalo de 60 minutos a 4 días), en una solución acuosa a pH 7,4 y 37 °C. En algunas realizaciones, al menos una de las estructuras donantes de NO de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO en un intervalo de 30 segundos y 10 minutos, y al menos una estructura donante de NO de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO de más de 10 minutos pero menor de o igual a 60 minutos, en una solución acuosa a pH 7,4 y 37 °C. En algunas realizaciones, al menos una de las estructuras donantes de NO de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO de más de 10 minutos pero menor de o igual a 60 minutos, y al menos una estructura donante de NO de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO de más de 60 minutos, en una solución acuosa a pH 7,4 y 37 °C.

El flujo máximo y el perfil de liberación de NO también pueden variarse en los dendrímeros multidonante, de tal forma que al menos una de las estructuras donantes de NO de diazeniodiolato tiene un flujo máximo de NO en un intervalo de 2000 ppb de NO/mg a 20.000 ppb de NO/mg y una vida media en un intervalo de 0,1 a 1 h, y al menos una de las estructuras donantes de NO de diazeniodiolato tiene un flujo máximo de NO en un intervalo de 100 ppb de NO/mg a 2000 ppb de NO/mg y una vida media en un intervalo de 1 h a 5 h en una solución acuosa a pH 7,4 y 37°C. La estructura, el tamaño y la hidrofobicidad del dendrímero pueden variarse para afectar a la liberación de NO.

Como se usa en el presente documento, los valores para la "vida media de liberación de NO" y el "flujo máximo" de una estructura donante de NO de diazeniodiolato son los del dendrímero correspondiente que incluye solamente ese diazeniodiolato. Se entenderá que estas propiedades se cambiarán en un dendrímero multidonante debido a la contribución de las otras estructuras donantes de NO de diazeniodiolato.

En realizaciones particulares de la invención, el dendrímero incluye al menos una estructura donante de NO de diazeniodiolato que tiene la estructura:



en la que R es -CN,  $-\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{6-12}\text{H}$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{Ph}$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{CH}=\text{CH}_2$ ; Z es -H o -OH; y X es  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ .

**Sílice co-condensada**

En algunas realizaciones de la invención, la macromolécula de liberación de NO incluye sílice co-condensada. Se puede usar cualquier sílice co-condensada adecuada que tenga al menos dos estructuras donantes de NO diferentes unidas a la misma. Los materiales y procedimientos que pueden usarse para crear partículas de sílice co-condensada de liberación de NO que contienen una estructura donante de óxido nítrico se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0214618.

Se describen a continuación ejemplos de cómo formar sílice co-condensada multidonante.

En algunas realizaciones, cada estructura donante de NO de diazeniodiolato puede formarse a partir de un aminoalcoxisilano mediante un procedimiento de precarga, y la red de siloxano condensada puede sintetizarse a partir de la condensación de una mezcla de silano que incluye un alcoxisilano y al menos dos aminoalcoxisilanos diferentes cargados con NO para formar una red de siloxano co-condensada multidonante. Como se usa en el presente documento, el "procedimiento de precarga" significa que el aminoalcoxisilano se "pretrata" o se "precarga" con óxido nítrico antes de la co-condensación con alcoxisilano. En algunas realizaciones, la pre-carga con óxido nítrico puede realizarse por procedimientos químicos. En algunas realizaciones, el procedimiento de "precarga" puede usarse para crear redes de siloxano co-condensadas y materiales funcionalizados más densamente con donantes de NO.

La red de siloxano co-condensado puede ser partículas de sílice que tienen un tamaño uniforme, una colección de partículas de sílice con una diversidad de tamaños, sílice amorfa, una sílice pirógena, una sílice nanocristalina, sílice cerámica, sílice coloidal, un revestimiento de sílice, una película de sílice, sílice modificada orgánicamente, sílice mesoporosa, gel de sílice, vidrio bioactivo, o cualquier forma o estado adecuado de sílice.

En algunas realizaciones, el alcoxisilano es un tetraalcoxisilano que tiene la fórmula  $\text{Si}(\text{OR})_4$ , en la que R es un grupo alquilo. Los grupos R pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones el tetraalcoxisilano se selecciona como ortosilicato de tetrametilo (TMOS) u ortosilicato de tetraetilo (TEOS). En algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano tiene la fórmula:  $\text{R}''\text{-(NH-R}')_n\text{-Si}(\text{OR})_3$ , en la que R es alquilo, R' es alquileo, alquileo ramificado, o aralquileo, n es 1 o 2, y R'' se selecciona del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, y alquilamina.

En algunas realizaciones, los al menos dos aminoalcoxisilanos diferentes se seleccionan cada uno independientemente de *N*-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano (AHAP3); *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilano (AEAP3); (3-trimetoxisililpropil)dietilenotriamina (DET3); (aminoetilaminometil)feniltrimetoxisilano (AEMP3); [3-(metilamino)propil]trimetoxisilano (MAP3); *N*-butilamino-propiltrimetoxisilano (n-BAP3); *t*-butilamino-propiltrimetoxisilano (t-BAP3); *N*-etilaminoisobutiltrimetoxisilano (EAI3); *N*-fenilamino-propiltrimetoxisilano (PAP3); y *N*-ciclohexilaminopropiltrimetoxisilano (cHAP3).

En algunas realizaciones, al menos uno de los dos aminoalcoxisilanos diferentes tiene la fórmula:  $\text{NH}[\text{R}'\text{-Si}(\text{OR})_3]_2$ , en la que R es alquilo y R' es alquileo. En algunas realizaciones, al menos uno de los aminoalcoxisilanos se selecciona de bis(3-trietoxisililpropil)amina, bis-[3-(trimetoxisilil)propil]amina y bis-[(3-trimetoxisilil)propil]etilendiamina.

En algunas realizaciones, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, los al menos dos aminoalcoxisilanos diferentes están precargados, juntos o por separado, para la liberación de NO, y el grupo amino está sustituido con un diazeniodiolato. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano tiene la fórmula:  $\text{R}''\text{-N}(\text{NONO-X}^+)\text{-R}'\text{-Si}(\text{OR})_3$ , en la que cada R es independientemente H, alquilo, sililo o arilo, R' es un grupo funcional orgánico divalente, R'' es un grupo funcional orgánico monovalente, y X<sup>+</sup> es un catión monovalente. En algunas realizaciones, cada R es independientemente metilo o etilo, R' es alquileo o arilalquileo, R'' es alquilo, alquilo sustituido, alquilnitrito, arilo, arilo sustituido, alquilarilo, poliéter y/o alquilamina, y X<sup>+</sup> es un catión seleccionado del grupo que consiste en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, u otro catión de amonio cuaternario.

En algunas realizaciones de la invención, uno o más de los aminoalcoxisilanos funcionales de diazeniodiolato pueden estar protegidos con O<sub>2</sub> antes de la preparación de las macromoléculas de liberación de óxido nítrico. Dichos aminoalcoxisilanos funcionales de diazeniodiolato protegidos por O<sub>2</sub> pueden tener la fórmula:  $\text{R}''\text{-N}(\text{NONO-R}''')\text{-R}'\text{-Si}(\text{OR})_3$ , en la que cada R es independientemente H, alquilo, sililo o arilo, R' es un grupo funcional orgánico divalente, R'' es un grupo funcional orgánico monovalente, y R''' es un grupo protector que imparte mecanismos de activación enzimáticos, fotolíticos o de tiolación. Dichos grupos protectores se conocen por los expertos en la técnica de la formación de diazeniodiolatos protegidos con O<sub>2</sub>.

La composición química de la red de siloxano (por ejemplo, la cantidad o la composición química del aminoalcoxisilano), la porosidad de la red de sílice dentro de la estructura macromolecular, el tamaño de las partículas de sílice co-condensadas y las condiciones de carga de óxido nítrico (por ejemplo, el disolvente y la base) pueden variarse para optimizar la cantidad y la duración de la liberación de óxido nítrico. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición de las partículas de sílice puede modificarse para regular la vida media de la liberación de NO a partir de partículas de sílice con vidas medias de liberación de óxido nítrico que van desde lentas, definidas por los valores  $t_{1/2}$  mayores de 60 minutos, a moderadas, definidas por valores  $t_{1/2}$  mayores de 10 minutos y menores de o iguales a 60 minutos, a rápidas, definidas por valores  $t_{1/2}$  que varían de 30 segundos a 10 minutos. Como se ha descrito anteriormente, la combinación de dos o más estructuras donantes de NO de diazeniodiolato diferentes



puede alterar los valores  $t_{1/2}$  y el perfil de liberación.

En algunas realizaciones, la sílice co-condensada multidonante puede estar presente como partículas. En algunas realizaciones, las partículas tienen un tamaño distribuido en torno a un tamaño medio de partícula de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , y en algunas realizaciones, tienen un tamaño de partícula distribuido en torno a un tamaño medio de partícula mayor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , en algunas realizaciones entre 10  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , en algunas realizaciones mayor de 100  $\mu\text{m}$ , y en algunas realizaciones mayor de 1000  $\mu\text{m}$ .

En algunas realizaciones de la invención, la sílice co-condensada multidonante también se forma a partir de al menos un silano adicional que modifica la carga superficial y/o hidrofiliicidad/hidrofobicidad del producto de sílice co-condensada que afecta al coeficiente de partición de octanol/agua del vehículo de administración macromolecular. Se puede usar cualquier alcoxisilano adecuado que pueda impartir carga superficial a la macromolécula de polisiloxano modificado con diazeniodiolato. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el alcoxisilano adicional puede incluir un alcoxisilano catiónico tal como (2-N-bencilaminoetil)-3-aminopropil-trimetoxisilano, clorhidrato; cloruro de bis(metoxietil)-3-trimetoxisililpropil-amonio; cloruro de N-N-didecil-N-metil-N-(3-trimetoxisilil)amónio; cloruro de N-trimetoxisililpropil-N,N,N-trimetil amonio; cloruro de octadecilbis(trietoxisililpropil)-amónio; y cloruro de octadecildimetil(3-trimetoxisililpropil)amónio. En algunas realizaciones, el alcoxisilano adicional puede incluir un alcoxisilano aniónico tal como fosfonato de 3-trihidroxisililpropilmetilo, sal sódica y sal sódica de carboxietilsilano.

Se puede usar cualquier alcoxisilano adecuado que pueda impartir propiedades hidrófilas a la sílice co-condensada multidonante. Los alcoxisilanos que contienen grupos poli(etileno)oxi repetidos se pueden usar para aumentar la humectabilidad de las partículas de liberación de NO, ayudando así a mejorar la biocompatibilidad tras la aplicación tópica y también mejorar la tasa de captción de agua en el recubrimiento de siloxano co-condensado. La hidrofiliicidad superficial se puede utilizar, por lo tanto, para potenciar la cinética de liberación de NO de los derivados de aminoalcoxisilano diazeniodiolado. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el alcoxisilano multifuncional puede incluir un silano hidrófilo tal como óxido uretano de N-trietoxisililpropil)-O-polietileno; N-3-[amino(polipropileno)oxi]aminopropiltrimetoxisilano; óxido de bis-[3-(trietoxisililpropoxi)-2-hidroxipropoxi]polietileno; óxido de bis(3-trietoxisililpropil)polietileno (25-30); [hidroxi(polietileno)oxi]propil]-trietoxisilano; y 2-[metoxi(polietileno)oxi]propil]-trietoxisilano.

Se puede usar cualquier alcoxisilano adecuado que pueda impartir propiedades hidrófobas a la sílice co-condensada multidonante. Los silanos hidrófobos son conocidos por los expertos en la técnica por aumentar la lipofilia de las superficies de las partículas. En algunas realizaciones, el alcoxisilano adicional puede incluir alquilo lineal, alquilalcoxisilanos ramificados y cíclicos que tienen al menos tres átomos de carbono, fenil alcoxisilanos sustituidos y sin sustituir, y alcoxisilanos fluorados. Los fluoroalcoxisilanos ejemplares pueden incluir heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrodecil)trietoxisilano (mostrado en la figura 21), (3,3,3-trifluoropropil)trimetoxisilano, (perfluoroalquil)etiltrimetoxisilano, nonafluorohexiltrimetoxisilano, nonafluorohexiltrimetoxisilano, (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrooctil)trietoxisilano, y (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrooctil)trimetoxisilano.

La hidrofiliicidad de la sílice co-condensada multidonante puede evaluarse mediante el uso de un coeficiente de partición de agua/octanol. Véase Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Vol. 2 de Wiley Series in Solution Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. (1997). Por ejemplo, las macromoléculas de polisiloxano funcionalizado con diazeniodiolato pueden tener un coeficiente de partición de agua/octanol en un intervalo de 0,1 a 7, y las macromoléculas de polisiloxano funcionalizadas con diazeniodiolato hidrófilas pueden tener un coeficiente de partición de agua/octanol en un intervalo de -2 a 0.

#### **Otros andamios macromoleculares**

Se puede usar cualquier otro andamiaje macromolecular de liberación de NO adecuado, tal como, por ejemplo, agrupaciones metálicas, incluyendo las descritas en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0214618. En otras realizaciones, pueden usarse andamiajes macromoleculares biodegradables que incluyen, por ejemplo, quitosano, celulosa y otros materiales polisacáridos.

#### **Composiciones farmacéuticamente aceptables**

En algunas realizaciones, al menos una macromolécula de liberación de NO está presente en una composición farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéuticamente aceptable, como se define en el presente documento, se refiere a una composición que es adecuada para su aplicación/administración a un sujeto, tal como un ser humano, sin efectos secundarios no deseados tales como toxicidad o irritación de la piel. Los efectos secundarios no deseados son aquellos que hacen que la composición no sea adecuada para su aplicación/administración a un sujeto debido a que el daño de los efectos secundarios supera los beneficios de la composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen al menos una macromolécula de liberación de NO; opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional; y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las macromoléculas de liberación de NO pueden estar presentes en composiciones farmacéuticamente aceptables de acuerdo con las realizaciones de la invención a cualquier concentración adecuada, pero en algunas realizaciones, las macromoléculas de liberación de NO están presentes en las composiciones a una concentración suficiente para

alcanzar el objetivo terapéutico. Por ejemplo, en algunos casos, la concentración es suficiente para reducir la inflamación, promover la cicatrización y/o matar las bacterias. Como otro ejemplo, en algunos casos, la concentración es suficiente para disminuir, eliminar o prevenir el acné y/o disminuir la producción de sebo. En algunas realizaciones, la concentración de macromoléculas de liberación de NO varía del 0,1 % al 20 % p/p en la composición.

Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen al menos un agente terapéutico adicional, tales como aquellos que tienen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, analgésicas, inmunosupresoras, vasodilatadoras.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables en las que la presente macromolécula de liberación de NO multidonante puede utilizarse incluyen las descritas en la Solicitud de Estados Unidos N.º 12/580418, Publicación N.º 2010/0098733, presentada el 16 de octubre de 2009; Solicitud de Estados Unidos N.º 12/860.657, presentada el 20 de agosto 2010; Solicitud de Estados Unidos N.º 12/860.457, presentada el 20 de agosto de 2010; y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 61/504.628; presentada el 5 de julio de 2011.

#### **Procedimientos de tratamiento usando composiciones desveladas en el presente documento**

Se desvelan en el presente documento los procedimientos para tratar a un sujeto mediante la administración al sujeto de una macromolécula o una composición farmacéutica de acuerdo con una realización de la invención. El NO ha demostrado ser beneficioso para el tratamiento de muchas afecciones médicas. Como tal, cualquier afección médica adecuada puede tratarse con una composición de la divulgación. En particular, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser beneficiosas para su uso en el tratamiento de afecciones dermatológicas. Los ejemplos incluyen infecciones microbianas, inflamación, heridas, arañas, acné, y similares. Otras afecciones se analizan en la Publicación de Estados Unidos N.º 2009/0214618. Las afecciones dermatológicas también se analizan en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 61/504.634; presentada el 5 de julio de 2011.

En algunas realizaciones, la composición farmacéuticamente aceptable se puede aplicar por vía tópica a la piel del sujeto. Cualquier porción de la piel del sujeto puede tratarse. Sin embargo, la cara del sujeto se trata mediante un procedimiento descrito en el presente documento. Además, el tronco del sujeto se trata mediante un procedimiento descrito en el presente documento.

Además, en algunas realizaciones, la composición farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la divulgación se aplica de otra manera, tal como una aplicación sistémica. Como se usa en el presente documento, la aplicación sistémica se refiere a la aplicación/administración de la composición farmacéuticamente aceptable por todo el cuerpo. Además, en algunas realizaciones, la composición farmacéuticamente aceptable puede aplicarse/administrarse al sujeto por vía parenteral, oral, bucal, subcutánea, mediante inhalación, por vía intratraqueal, quirúrgicamente, por vía transdérmica, o mediante cualquier otro procedimiento conocido en la técnica para la introducción de un medicamento al cuerpo.

Los sujetos adecuados a tratar con un procedimiento descrito en el presente documento incluyen, pero sin limitación, sujetos aves y mamíferos. Los mamíferos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, caninos, felinos, bovinos, caprinos, équidos, ovinos, porcinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, primates, seres humanos, y similares, y mamíferos en el útero. Cualquier sujeto mamífero que necesite ser tratado es adecuado. Se pueden tratar sujetos humanos de ambos sexos y en cualquier etapa de desarrollo (es decir, neonato, infante, juvenil, adolescente, adulto).

Las aves ilustrativas de acuerdo con la presente invención incluyen pollos, patos, pavos, gansos, codornices, faisanes, rátidas (por ejemplo, avestruz) y aves domesticadas (por ejemplo, loros y canarios), y aves *in ovo*.

Las composiciones para su uso y los procedimientos de esta divulgación también pueden administrarse/realizarse en sujetos animales, particularmente sujetos mamíferos tales como ratones, ratas, perros, gatos, ganado y caballos con fines veterinarios, y para fines de detección de fármacos y de desarrollo.

Los procedimientos para tratar una afección dermatológica administrando a un sujeto una composición farmacéutica pueden realizarse junto con otro régimen terapéutico y/o junto con otros medicamentos, tales como aquellos que tienen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, analgésicas, inmunosupresoras, vasodilatadoras, y/o propiedades anti-acné. Por ejemplo, en el tratamiento del acné, se pueden usar otros agentes anti-acné tales como retinoides, junto con (antes, concurrentemente o después de) la aplicación de la composición farmacéutica de la invención. Como tal, un paciente puede tratarse con una composición descrita en el presente documento junto con un agente terapéutico adicional cuando el agente terapéutico adicional no está en la misma composición. Por ejemplo, se puede administrar un agente terapéutico adicional (por ejemplo, por vía tópica, sistémica, parenteral, oral, bucal, subcutánea, mediante inhalación, por vía intratraqueal, quirúrgicamente, por vía transdérmica, etc.), concurrentemente y/o secuencialmente con la aplicación de la composición farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéuticamente aceptable se puede administrar a la piel mediante administración por pulverización. Se puede usar un propulsor de administración no acuoso para compuestos de liberación de NO sensibles al agua tales como compuestos modificados con diazeniodiolato. Además, los componentes particulares

de los medicamentos pueden separarse en algún momento antes de la aplicación del medicamento. Por ejemplo, un compuesto de liberación de NO reactivo con agua se puede almacenar por separado de un componente acuoso o propulsor hasta su aplicación (por ejemplo, mediante pulverización o aplicación de un gel). Los compuestos de liberación de NO se pueden combinar con un constituyente acuoso antes de la aplicación o los compuestos de liberación de NO y un componente acuoso se puede aplicar a la piel secuencialmente.

Una composición que incluye compuestos modificados con nitrosotiol se puede mantener a baja temperatura (por ejemplo, <math><0\text{ }^\circ\text{C}</math>) para minimizar la descomposición térmica y la liberación de NO. La composición fría se puede aplicar a la piel, y la temperatura elevada de la piel puede permitir la liberación de NO. El nitrosotiol puede estar presente en un medicamento (por ejemplo, una formulación hidrófila que puede limitar la difusión de NO) de tal forma que sea estable a temperatura ambiente debido al efecto jaula, y después libera NO al aplicarse a la piel. La luz también se puede aplicar a un medicamento que incluye compuestos modificados con nitrosotiol. La aplicación de luz en flujos puede aplicarse para crear flujos de NO.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### **Ejemplos**

#### **15 Dendrimeros: Materiales y consideraciones generales**

Etilenediamina (EDA), acrilonitrilo (ACN), óxido de propileno (PO), óxido de estireno (SO), acrilato de metilo (MA), acrilato de poli(etilenglicol) metil éter (Mn promedio = 480) (PEG), y 1,2-epoxi-9-deceno (ED) se adquirieron en Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Se adquirieron 1,6-Hexanodiamina (HDA) y metóxido sódico (solución 5,4 M en metanol) en Acros Organics (Geel, Bélgica). Catalizadores Matthey (Londres, Reino Unido). Las sales y disolventes comunes de laboratorio se adquirieron en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Todos los demás materiales se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional a menos que se indique otra cosa. Los espectros de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  (RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (400 MHz) y Varian (600 MHz). Las reacciones de hidrogenación usadas para la síntesis de PPI-NH<sub>2</sub> (por ejemplo, de G2 a G5) se realizaron en un reactor de alta presión de acero inoxidable adquirido en Parr Instrument Company (Moline, IL). La agitación se proporcionó mediante una barra de agitación magnética revestida de Teflon. Se proporcionó calentamiento usando un tejido de calentamiento envuelto alrededor del reactor, y la temperatura se controló usando un controlador de temperatura a través de un termopar. La liberación de óxido nítrico se midió usando el Analizador de óxido nítrico por quimioluminiscencia Sievers 280i (Boulder, CO).

#### **Ejemplo 1: Síntesis de [G-0.5]-PPI-CN a [G-4.5]-PPI-CN**

Para la síntesis de [G-0.5]-PPI-CN, se pusieron etilendiamina (EDA, 25,0 ml, 0,374 mol) y agua desionizada (263 ml) en un matraz de fondo redondo de 1000 ml. Se añadió acrilonitrilo (ACN, 140 ml) en porciones de 20 ml con agitación durante 15 min. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 h, y después se enfrió a temperatura ambiente durante una noche. Se eliminó el ACN al vacío a 40 °C. Se sintetizó [G-0.5]-PPI-CN en la mezcla y se aisló por filtración al vacío. El producto en bruto se recristalizó en THF/metanol en forma de un polvo de color blanco.

Los datos de RMN  $^1\text{H}$  representativos fueron como se indica a continuación: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 2,55 (8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2,77 (4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2,96 (t, 8H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN). La síntesis de PPI-CN de generación superior (por ejemplo, de [G-1.5] a [G-4.5]) no fue significativamente diferente de la síntesis de PPI-[G-0.5]-CN como se ha descrito anteriormente, con la excepción de que PPI-CN (por ejemplo, desde [G-1.5] a [G-4.5]) fueron habitualmente líquidos viscosos y sus procedimientos de purificación normalmente requerirán el uso de cromatografía a escala preparativa. Como resultado, la síntesis de PPI-CN de generación superior se realizó de forma modificada. Se disolvió PPI-CN de generación superior (10,0 g) (por ejemplo, de [G-1.5] a [G-4.5]) en agua desionizada (50 ml) y THF (100 ml) antes de añadir ACN (50 ml). Si se observó la separación de fases de la solución resultante, se añadió una cantidad adicional de THF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 d; luego se eliminó una pequeña cantidad para el análisis por espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  para determinar el grado de reacción. Si la reacción estaba incompleta, se añadió una cantidad adicional de ACN (25 ml) y la agitación continuó durante 2-3 días más.

#### **Ejemplo 2: Síntesis de [G-1]-PPI-NH<sub>2</sub> a [G-5]-PPI-NH<sub>2</sub>**

Para la síntesis de [G-1]-PPI-NH<sub>2</sub>, el catalizador de esponja de cobalto (5,0-6,0 g) se lavó con una solución al 10 % de KOH durante 10 min, tres veces con agua desionizada, y dos veces con metanol antes del uso. [G-0,5]-PPI-CN (10,0 g) se puso en un manguito de reactor de vidrio y se disolvió en THF (70 ml) y metanol (30 ml). A esta solución, se le añadió el catalizador de esponja de cobalto preparado como se ha descrito anteriormente (5,0-6,0 g) usando una pipeta. El manguito del reactor se puso entonces en la cámara de hidrogenación con la agitación adecuada. El reactor se purgó con nitrógeno interno (413 KPa (60 PSI)) cinco veces, y después con hidrógeno (2757 KPa (400 PSI)) dos veces. El reactor se cargó con hidrógeno a una presión de 5515 KPa (800 PSI), y se calentó a 100 °C. La presión de gas hidrógeno se mantuvo a 6894 KPa (1000 PSI) durante toda la reacción. Después de 3 h, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. El hidrógeno se eliminó lentamente, y la cámara de reacción se purgó una vez con nitrógeno interno. La mezcla de reacción resultante se filtró entonces para eliminar el catalizador de cobalto, y el disolvente se eliminó al vacío. El producto final se secó al vacío durante una noche para producir [G-1]-

PPI-NH<sub>2</sub> en forma de un líquido incoloro.

Los datos de RMN 1H representativos fueron como se indica a continuación: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 1,52 (c, 8H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2,40 (t, 8H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2,44 (s, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2,64 (t, 8H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-). El enfoque para la síntesis de PPI-NH<sub>2</sub> de generación superior (por ejemplo, de [G-2] a [G-5]) fue similar al de [G-1]-PPI-NH<sub>2</sub> con la excepción de que se usó una mezcla de ED y THF (50:50, v/v) como disolvente. Después de la reacción, el disolvente se eliminó al vacío usando 1-butanol como agente azeotrópico debido a su alto punto de ebullición. El PPI-NH<sub>2</sub> de generación superior resultante (por ejemplo, de [G-2] a [G-5]) se secó al vacío durante una noche, produciendo un líquido de color amarillo claro. El análisis de masas por EM IEN fue como se indica a continuación: 744,73, 1657,64, 3483,45 y 7142,4 para G2-PPI, G3-PPI, G4-PPI y G5-PPI, respectivamente.

### 10 Ejemplo 3: Síntesis de dendrímeros de PPI funcionalizados con aminas secundarias

Se disolvieron 100 mg de PPI-NH<sub>2</sub> (por ejemplo, de G2 a G5) en 2 ml de metanol en un vial de 10 ml. Un equivalente de acrilonitrilo (ACN), acrilato de poli(etilenglicol) metil éter (Mn promedio = 480) (PEG), óxido de propileno (PO), óxido de estireno (SO), o 1,2-epoxi-9-deceno (ED) (por ejemplo, con respecto a la cantidad molar de la funcionalidad de amina primaria) se añadió después al vial de 10 ml. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El disolvente se eliminó a presión reducida. Los dendrímeros se disolvieron en agua seguido de diálisis frente a agua y liofilización.

Los datos representativos de RMN 1H del conjugado de G5-PPI funcionalizado con amina secundaria formado a través de las reacciones de G5-PPI-NH<sub>2</sub> con ACN, PEG, PO, SO, y ED (denominado en lo sucesivo como G5-PPI-ACN **a-64**, G5-PPI-PEG **b-64**, G5-PPI-PO **c-64**, G5-PPI-SO **d-64**, G5-PPI-ED **e-64**) fueron como se indica a continuación: G5-PPI-ACN **a-64**: RMN 1H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 2,87 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2,82 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2,40 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH). RMN 13C (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 117, 52,4, 51,8, 44,5, 33,3, 26,1, 23,6, 16,9. G5-PPI-PEG **b-64**: RMN 1H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 2,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2,40 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3,40-3,70 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2,80 (CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOPEG), 2,65 (CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOPEG), 2,42 (CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOPEG). RMN 13C (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 172, 71,6, 70,85, 69,3, 60,1, 57,0, 51,4, 43,9, 39,1, 22,9. G5-PPI-PO **c-64**: RMN 1H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 3,70 (CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>), 2,60-2,62 (CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2,40 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1,00 (CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>). RMN 13C (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 66,9, 58,2, 53,7, 52,8, 41,2, 30,8, 27,6, 24,9, 21,8. G5-PPI-SO **d-64**: RMN 1H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 7,50-7,20 (CH<sub>2</sub>CH(OH)Ph), 3,70 (CH<sub>2</sub>CH(OH)Ph), 2,72 (CH<sub>2</sub>CH(OH)Ph), 2,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2,40 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH). RMN 13C (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 140,6, 128,2, 127,5, 127,3, 125,8, 71,9, 57,1, 52,4, 45,6, 39,8, 26,3, 23,6. G5-PPI-ED **e-64**: RMN 1H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 5,74 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4,88 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3,58 (NHCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>), 2,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2,40 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1,98 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 1,60 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1,2-1,4 ((CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>). RMN 13C (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 140,0, 116,1, 70,5, 56,5, 52,4, 47,2, 39,2, 33,9, 30,2, 25,6, 24,9.

### 35 Ejemplo 4: Síntesis de dendrímeros de PPI funcionalizados con N-diazeniodiolato

Se añadió un equivalente de una solución 5,4 M de metóxido sódico en metanol (por ejemplo, con respecto a la cantidad molar de funcionalidades de aminas primarias en PPI-NH<sub>2</sub> usado para sintetizar esta PPI funcionalizada con amina secundaria) en un vial que contenía dendrímeros de PPI funcionalizados con amina secundaria G1 a G5 en metanol (2 ml). La solución de reacción resultante se cargó con 1,013 x 10<sup>6</sup> Pa (10 atm) de NO mientras se agitaba en un reactor de acero inoxidable. Antes de la carga con NO, el reactor se lavó tres veces con argón seguido de una serie de tres ciclos de carga/descarga más largos con argón (3 x 10 min) para eliminar el oxígeno de las soluciones de agitación. Después, el reactor se llenó con 1,013 x 10<sup>6</sup> Pa (10 atm) de NO (purificado sobre sedimentos de KOH durante 30 minutos para eliminar los procedimientos de degradación de NO traza descritos anteriormente con argón para eliminar el NO sin reaccionar de los productos de la solución de reacción) a temperatura ambiente. Después de 3 días, el NO se eliminó usando la misma carga/descarga.

### 45 Ejemplo 5: Caracterización de almacenamiento y liberación de NO

Se añadieron alícuotas (~10-25 µl) de PPI funcionalizada con N-diazeniodiolato como una solución en metanol (por ejemplo, ~7-200 mM) a 30 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (10 mM, pH = 7,4) a 37 °C para iniciar/medir la liberación de NO. Los datos de quimioluminiscencia para los dendrímeros de liberación de NO se representaron como: i) cantidad total de liberación de NO (t[NO], µmol de NO/mg y µmol de NO/µmol de dendrímeros funcionalizados con amina secundaria); ii) flujo máximo de liberación de NO ([NO] máx, ppb/mg de dendrímeros funcionalizados con amina secundaria); iii) vida media (t<sub>1/2</sub>) de la liberación de NO; y iv) eficiencia de conversión definida como porcentajes de funcionalidades amina en PPI (por ejemplo, de G1 a G5) convertidas en funcionalidad de N-diazeniodiolato (por ejemplo, moles totales de liberación de NO divididos por el doble de la cantidad molar de funcionalidades de amina primaria en PPI-NH<sub>2</sub> usado inicialmente para sintetizar conjugados dendrímeros funcionalizados con aminas secundarias).

### Resultados dendrímeros y análisis

Se considera que las reacciones químicas de funcionalidades de amina primaria con compuestos orgánicos son el enfoque más directo para preparar compuestos que contienen aminas secundarias. Tanto las reacciones de apertura

de anillo de compuestos que contienen aminas primarias con epóxidos como las reacciones de adición de conjugados de funcionalidades de amina primaria con enlaces dobles  $\alpha,\beta$ -insaturados representan enfoques viables para diseñar conjugados de PPI funcionalizados con aminas secundarias. Por lo tanto, nos dirigimos a la síntesis de dendrímeros funcionalizados con amina secundaria usando reacciones de apertura de anillo y de adición de conjugados de PPI-NH<sub>2</sub> con PO, SO, ED, ACN y PEG (Véase la **figura 1**).

Los epóxidos, acrilatos y acrilonitrilo utilizados para la conjugación se basaron en estérica, hidrofobicidad y biocompatibilidad. Cabe señalar que también es posible producir aductos de amina terciaria. Además, se realizó una serie de estudios cinéticos modelo utilizando espectroscopía de RMN para reacciones de adición de conjugados de G1-PPI-NH<sub>2</sub> de primera generación con ACN, 1,6-hexanodiamina (HDA) con MA, y reacciones de apertura de anillo de HDA con PO para determinar la idoneidad de las reacciones de adición de conjugados y de apertura de anillo para la síntesis de dendrímeros de PPI funcionalizados con amina secundaria. Los resultados de estos estudios revelaron grandes diferencias en las velocidades de reacciones de G-1-PPI-NH<sub>2</sub> con ACN, y HDA con PO. Las constantes de velocidad de la primera reacción de adición de conjugados o de apertura de anillo ( $k_1$ ) fueron sustancialmente mayores que las de las segundas reacciones ( $k_2$ ) (datos no mostrados), proporcionando un fuerte respaldo para el uso de dichas reacciones (por ejemplo, durante un periodo de cuatro días, en una solución diluida, y en un equivalente de ACN, epóxidos o acrilatos con respecto a la cantidad molar de PPI-NH<sub>2</sub>) para producir productos funcionalizados con amina secundaria adecuados para posteriores estudios de liberación de NO.

El enfoque descrito anteriormente se basa en la funcionalización de dendrímeros en su exterior para producir dendrímeros de PPI funcionalizados con aminas secundarias. Una ventaja práctica de este enfoque es que la síntesis de dendrímeros con funcionalidad amina secundaria estructuralmente diversos puede permitir la identificación de propiedades clave para el almacenamiento y la liberación de NO. De hecho, las reacciones de PPI funcionalizada con aminas secundarias (por ejemplo, de G2 a G5) con NO en condiciones básicas (por ejemplo, metóxido de sodio) produjeron dendrímeros funcionalizados con donantes de NO de N-diazeniodiolato con diversas características de liberación de NO.

Se usó quimioluminiscencia para caracterizar las propiedades de almacenamiento y liberación de NO (por ejemplo, en PBS, pH = 7,4, 37 °C) para los dendrímeros de PPI modificados con N-diazeniodiolato. Los perfiles de liberación de NO representativos para estos dendrímeros se muestran en las **figuras 2A y 2B**. El tratamiento de los parámetros de liberación de NO específicos (por ejemplo, liberación total de NO, flujo máximo, vida media y eficiencia de conversión) se proporcionan en la **Tabla 1**. En general, los resultados de liberación de NO revelan altas capacidades de almacenamiento de NO (por ejemplo, 0,9-3,8  $\mu\text{mol}$  de NO/mg) y una amplia gama de cinéticas de liberación (por ejemplo, vida media de liberación de NO de 0,8 a 4,9 h). La inspección adicional de estos datos revela que las eficiencias de conversión (por ejemplo, 10-34 %) de los dendrímeros variaron sustancialmente a base de la modificación química. Como se muestra en la **Tabla 1**, G2 a G5-PPI-SO (**d-n-NO**) se caracterizaron por una menor formación de donantes de NO (por ejemplo, ~10-15 %) frente a los otros dendrímeros de PPI (por ejemplo, ~14-40 %). Las menores eficiencias de conversión para PPI-SO (**d-n-NO**) se pueden atribuir a un entorno más estéricamente impedido alrededor de los precursores donantes de NO (es decir, aminas secundarias), lo que da como resultado una menor accesibilidad de NO y de las bases a las aminas durante el proceso de carga de NO.

**Tabla 1: Características de liberación de óxido nítrico para los dendrímeros de PPI en PBS (pH = 7,4) a 37 °C.**

|         | Dendrímero    | t[NO] ( $\mu\text{mol}$ NO/mg) <sup>a</sup> | t[NO] ( $\mu\text{mol}$ NO/ $\mu\text{mol}$ ) <sup>b</sup> | [NO] <sub>máx</sub> (ppb/mg) <sup>c</sup> | [NO] <sub>máx</sub> (ppb/ $\mu\text{mol}$ ) <sup>d</sup> | t <sub>1/2</sub> (h) | Conversión (%) |
|---------|---------------|---|--|---|--|----------------------|----------------|
| a-8-NO  | G2-PPI-ACN-NO | 3,57  | 4,18   | 1529                                      | 1788   | 4,81                 | 26,1           |
| a-16-NO | G3-PPI-ACN-NO | 3,33  | 8,35   | 1100                                      | 2758   | 4,84                 | 26,1           |
| a-32-NO | G4-PPI-ACN-NO | 2,45  | 12,7   | 1547                                      | 7977   | 4,82                 | 19,9           |
| a-64-NO | G5-PPI-ACN-NO | 1,68  | 17,7   | 881                                       | 9282   | 4,88                 | 13,8           |
| b-8-NO  | G2-PPI-PEG-NO | 1,11  | 5,10   | 3771                                      | 17291  | 0,67                 | 31,9           |
| b-16-NO | G3-PPI-PEG-NO | 1,08  | 10,1   | 2309                                      | 21564  | 1,11                 | 31,6           |
| b-32-NO | G4-PPI-PEG-NO | 1,37  | 25,8   | 4088                                      | 77035  | 0,84                 | 40,3           |
| b-64-NO | G5-PPI-PEG-NO | 1,17  | 44,3   | 1886                                      | 71403  | 1,22                 | 34,6           |

(continuación)

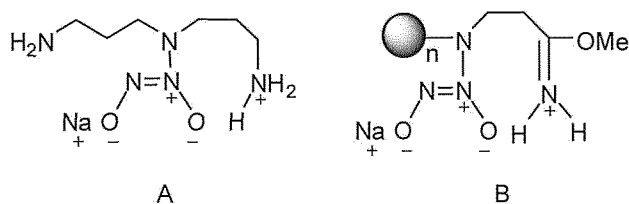
|         | Dendrímtero  | t[NO] ( $\mu\text{mol NO/mg}$ ) <sup>a</sup> | t[NO] ( $\mu\text{mol NO}/\mu\text{mol}$ ) <sup>b</sup> | [NO]máx (ppb/mg) <sup>c</sup> | [NO]máx (ppb/ $\mu\text{mol}$ ) <sup>d</sup> | t <sub>1/2</sub> (h) | Conversión (%) |
|---------|--------------|--|---|-------------------------------|--|----------------------|----------------|
| c-8-NO  | G2-PPI-PO-NO | 2,99   | 3,63  | 17130                         | 20725  | 0,30                 | 22,7           |
| c-16-NO | G3-PPI-PO-NO | 3,22   | 8,38  | 9617                          | 24888  | 0,62                 | 26,2           |
| c-32-NO | G4-PPI-PO-NO | 3,27   | 17,5  | 7762                          | 41481  | 0,78                 | 27,3           |
| c-64-NO | G5-PPI-PO-NO | 3,78   | 41,1  | 6839                          | 74250  | 1,06                 | 32,1           |
| d-8-NO  | G2-PPI-SO-NO | 1,14   | 1,95  | 8495                          | 14496  | 1,47                 | 12,2           |
| d-16-NO | G3-PPI-SO-NO | 0,91   | 3,30  | 2363                          | 8462   | 0,97                 | 10,3           |
| d-32-NO | G4-PPI-SO-NO | 1,18   | 8,70  | 1720                          | 12609  | 1,43                 | 13,6           |
| d-64-NO | G5-PPI-SO-NO | 1,25   | 18,5  | 3315                          | 32843  | 1,62                 | 14,5           |
| e-8-NO  | G2-PPI-ED-NO | 1,95   | 3,87  | 5648                          | 11178  | 0,81                 | 24,2           |
| e-16-NO | G3-PPI-ED-NO | 1,64   | 6,75  | 2733                          | 11279  | 1,71                 | 21,1           |
| e-32-NO | G4-PPI-ED-NO | 1,51   | 12,8  | 2401                          | 20217  | 1,34                 | 19,9           |
| e-64-NO | G5-PPI-ED-NO | 1,86   | 31,6  | 3190                          | 54262  | 1,88                 | 24,7           |

<sup>a</sup> cantidad total de liberación de NO ( $\mu\text{mol}$ ) por miligramo de PPI funcionalizada con amina secundaria. <sup>b</sup> cantidad total de liberación de NO ( $\mu\text{mol}$ ) por micromol de PPI funcionalizada con amina secundaria. <sup>c</sup> flujo máximo de liberación de NO (ppb) por miligramo de PPI funcionalizada con amina secundaria. <sup>d</sup> flujo máximo de liberación de NO (ppb) por micromol de PPI funcionalizada con amina secundaria.

5 La modificación exterior también influyó en la cinética de liberación de NO. Por ejemplo, tanto PPI-PO (**c-n-NO**) como PPI-PEG (**b-n-NO**) liberaron NO rápidamente (**Tabla 1** y **figuras 2A-2B**). Los grupos isopropilo y PEG son hidrófilos y facilitan el ahorro de agua que puede ser favorable para la degradación del donante de NO de diazeniodiolato, por lo que estos grupos podrían proporcionar una cinética de liberación de NO rápida. Los datos también indican que la vida media de la liberación de NO para G2-G5 PPI-SO (**d-n-NO**) y PPI-ED (**e-n-NO**) es ligeramente mayor que PPI-PO (**c-n-NO**) y PPI-PEG (**b-n-NO**). La mayor liberación de NO para PPI-SO (**d-n-NO**) y PPI-ED (**e-n-NO**) se correlaciona bien con la estructura hidrófoba aumentada en el exterior de estos dendrímeros.

10 La modificación de ACN para el dendrímtero de PPI (**a-n-NO**) mostró un gran almacenamiento de NO (por ejemplo,  $\sim 1,7\text{-}3,6 \mu\text{mol}$  de NO/mg) y eficacia de conversión (por ejemplo,  $\sim 14\text{-}26 \%$ ) (**Tabla 1**). Cabe señalar que estudios anteriores han indicado que la reacción de compuestos que contienen ciano con NO a altas presiones en condiciones básicas puede producir productos funcionalizados con C-diazeniodiolato. Tanto el NO como el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) pueden liberarse de los C-diazeniodiolatos en entornos acuosos a pH bajo. En este contexto, puede ser posible que las altas eficiencias de conversión para PPI-ACN (**a-n-NO**) surjan de la contribución de NO liberado a partir de productos funcionalizados con C-diazeniodiolato. Por lo tanto, una serie de experimentos se realizaron para investigar la naturaleza de la liberación de NO de PPI-ACN (**a-n-NO**) usando G0.5-PPI, un compuesto que contiene ciano sin la capacidad de formar N-diazeniodiolato debido a la ausencia de aminas secundarias. La liberación de NO de G0.5-PPI fue  $\sim 4,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$  de NO/mg, lo que proporciona un fuerte respaldo a que la alta eficiencia de conversión y almacenamiento de NO para los dendrímeros modificados con ACN son de hecho el resultado de la funcionalización de N-diazeniodiolato.

25 Los análogos de PPI-ACN (**a-n-NO**) también se caracterizaron por tener las vidas medias de liberación de NO más largas (por ejemplo,  $\sim 5$  h). Dada la naturaleza hidrófila de la funcionalidad ciano, la liberación de NO extendida no se atribuye fácilmente a la captación de agua. Por ejemplo, las vidas medias largas de los derivados de molécula pequeña funcionalizados con N-diazeniodiolato (por ejemplo, dipropilentiamina o DPTA-NO) se han atribuido previamente a la estabilización de diazeniodiolato por funcionalidades de amonio catiónico adyacente como se representa en las moléculas A y B a continuación.



- De esta manera, la presencia de funcionalidades catiónicas adyacentes (por ejemplo, imidatos protonados) para dendrímeros de PPI-ACN (**a-n-NO**) puede proporcionar una estabilización adicional a la funcionalidad de diazeniodiolato (**A**). Dado que se usó metóxido de sodio como la base para la reacción de PPI-ACN (**a-n**) con NO (para producir productos funcionalizados con diazeniodiolato), el anión de metóxido también puede servir como un nucleófilo para reaccionar con el grupo ciano en PPI-ACN (**a-n**) y producir aductos de imidato. La transferencia de protón del disolvente (por ejemplo, metanol) al átomo de nitrógeno relativamente básico en los imidatos resultantes podría conducir a la funcionalidad de imidato protonado (**B**) que es similar a la funcionalidad de amonio catiónico en DPTA-NO (**A**).
- Como se muestra en la **Tabla 1**, tanto el almacenamiento de NO como el flujo de NO máximo por molécula de dendrímero aumentan en función del tamaño de dendrímeros (es decir, la generación). Por ejemplo, la carga útil de NO a partir de G5-PPI-PO-NO (**c-64-NO**) fue de 41,1  $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$  de dendrímero, mucho mayor que G2-PPI-PO-NO (**c-8-NO**) (por ejemplo, 3,63  $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$  de dendrímero). Se observa una tendencia similar para el flujo máximo de NO. Estos resultados revelan la capacidad de los dendrímeros de PPI de mayor liberación de NO para suministrar concentraciones significativas de NO. Según se sintetizan, los dendrímeros anfílicos funcionalizados con aminas secundarias (por ejemplo, PPI-SO, PPI-ED) poseen un núcleo de PPI hidrófilo y una periferia hidrófoba de anillos aromáticos o cadenas de alquilo largas. A diferencia de PPI-ACN, PPI-PO y PPI-PEG, estos dendrímeros anfílicos pueden tener un exterior más empaquetado en el disolvente de carga debido a la escasa compatibilidad de los anillos aromáticos o cadenas de alquilo largas con disolvente polar (por ejemplo, metanol).
- Para evaluar la capacidad de crear perfiles de liberación de NO ajustables entre la cinética de liberación observada para modificaciones de dendrímeros de PPI individuales, se diseñaron conjugados de dendrímeros funcionalizados con N-diazeniodiolato multifuncionales usando G5-PPI-NH<sub>2</sub> con relaciones definidas de PO y/o ACN en el exterior. Específicamente, G5-PPI-NH<sub>2</sub> se hizo reaccionar con PO exclusivamente (por ejemplo, **c-64**), ACN exclusivamente (por ejemplo, **a-64**), o tres mezclas diferentes compuestas por PO y ACN a relaciones molares de 3:7, 5:5, y 7:3, respectivamente; PO, ACN, o mezclas definidas de PO y ACN fueron un equivalente con respecto a la cantidad molar de funcionalidades de aminas primarias en G5-PPI-NH<sub>2</sub>. La **figura 3** ilustra que las dos estructuras donantes pueden interactuar para formar un nanoentorno de liberación de NO único.
- Se realizó una serie de experimentos RMN <sup>1</sup>H en los productos de estas reacciones para determinar las composiciones reales de PO y ACN conjugadas con G5-PPI-NH<sub>2</sub> (**figura 4**). Se evidenció una resonancia distinta a 1,10 ppm correspondiente a los protones de metilo en el grupo isopropilo de los productos. El desplazamiento químico de este pico se observó en los productos para reacciones con PO exclusivamente (por ejemplo, **c-64**) y aquellos con diferentes mezclas de PO y ACN. La inspección adicional de estos datos indica la presencia de un segundo pico distinto a 2,80 ppm, formado tras la reacción del dendrímero G5-PPI-NH<sub>2</sub> con ACN exclusivamente (por ejemplo, **a-64**) o mezclas definidas de PO y ACN; este pico corresponde a los protones de metileno, un carbono alejado del grupo ciano de los productos. Las composiciones de PO y ACN incorporadas en los productos fueron 27/73 (**c/a (27/73)**), 40/60 (**c/a (40/60)**), y 60/40 (**c/a (60/40)**), e indican que el ACN se incorporó a relaciones mayores que las de las mezclas de reacción probablemente debido a una reacción más rápida de G5-PPI-NH<sub>2</sub> con ACN frente a PO.
- La liberación de NO de los conjugados G5-PPI-PO/ACN a relaciones molares de PO/ACN de 27/73, 40/60, y 60/40, respectivamente, fue intermedia a los sintetizados basados en reacciones de G5-PPI-NH<sub>2</sub> con PO (por ejemplo, **c-64**) o ACN (por ejemplo, **a-64**) en solitario. Además, los perfiles de liberación de NO se vieron afectados por la relación molar de la composición PO/ACN. Por ejemplo, la liberación de NO se prolongó para los conjugados de PPI modificados con una menor relación molar de PO/ACN. (2,90, 1,57, 1,10 h durante 27/73, 40/60 y 60/40, respectivamente) (**figuras 5A y 5B**).
- Los perfiles de liberación de NO simulados (expresados como porcentajes de liberación de NO total,  $y_{a,b}$ ) se determinaron promediando los perfiles de liberación de NO para G5-PPI-PO (**c-64**) ( $y_{PO}$ ) y G5-PPI-ACN (**a-64**) ( $y_{ACN}$ ) se promedió con respecto a las composiciones reales de PO y ACN en estos tres conjugados de PPI (expresados como relaciones molares, a:b) (Ec. 1).

$$y_{a:b} = y_{PO} \times \frac{a}{a+b} + y_{ACN} \times \frac{b}{a+b} \quad (1)$$

- Como se muestra en las **figuras 5A y 5B**, los conjugados de PPI híbrido se caracterizaron por una liberación de NO

más rápida que la esperada por los datos simulados (vidas medias de liberación de NO de 3,13, 2,42, 1,65 para *c/a* (27/73), *c/a* (40/60) y *c/a* (60/40), respectivamente). Estos resultados demuestran que la funcionalización de PPI-NH<sub>2</sub> con una mezcla definida de PO y ACN permite una capacidad de ajuste de la liberación de NO adicional con acceso a cinéticas de liberación de NO que son intermedias a las formadas tras las reacciones con PO o ACN exclusivamente.

La síntesis de diversos dendrímeros de PPI de liberación de NO se logró mediante la modificación química de aminas primarias exteriores con ACN y PEG a través de la adición de conjugación o PO, ED, SO a través de reacciones de apertura de anillo. La liberación de NO de estos dendrímeros demostró que el tamaño (es decir, el número de generación o el peso molecular) y las estructuras exteriores (por ejemplo, entorno estérico, hidrofobicidad, etc.) desempeñan funciones importantes en la cinética de liberación de NO. Además, el uso de donantes seleccionados de NO con una cinética de liberación de NO única y cargas útiles globales puede aprovecharse utilizando estas modificaciones sintéticas para crear dendrímeros "multidonantes". Los andamiajes dendríticos estructuralmente diversos amplían el rango y el ámbito de las funcionalidades de aminas secundarias que pueden diseñarse en conjugados de PPI.

### 15 **Ejemplos de sílice co-condensada**

#### **Ejemplo 6:**

Se proporcionará ahora un ejemplo de una síntesis de sílice co-condensada multidonante y se muestra esquemáticamente en la **figura 6**. MAP3 diazeniodiolato se mezcló con AEAP diazeniodiolato. La primera molécula es conocida por su rápida liberación de NO y es capaz de establecer rápidamente y exponer las bacterias a una alta concentración de óxido nítrico, pero la liberación dura solo unos minutos. Por otro lado, AEAP diazeniodiolato tiene un perfil de liberación bastante lento con una vida media en tampón de pH = 7,4 a más de 3,5 horas. La exposición constante de bacterias a NO puede inhibir eficazmente el crecimiento, sin embargo, no ofrece una alta concentración inicial de óxido nítrico que puede ser tóxica para las bacterias existentes. Combinando los dos silanos en la misma estructura polimérica, se puede lograr un perfil de liberación programable para un efecto mejorado en, por ejemplo, una aplicación antimicrobiana.

Se sintetizaron una diversidad de macromoléculas de sílice co-condensada de donantes únicos y multidonante. La **figura 7** muestra el total de NO liberado durante un cierto período de tiempo a partir de diferentes macromoléculas de sílice co-condensada de liberación de NO, con una carga total normalizada. Las **figuras 8A** y **8B** ilustran los mismos perfiles de liberación con una concentración de NO máxima normalizada. La **figura 8B** ilustra los mismos perfiles de liberación, con una concentración de NO máxima normalizada, como la **figura 8A**, pero es una vista expandida de los perfiles de liberación. Todos los perfiles de liberación se recogieron con un analizador de óxido nítrico en condiciones fisiológicas a pH = 7,4 y 37 °C.

Además, también se prepararon mezclas físicas de macromoléculas de sílice co-condensada de donante único sintetizadas por separado. La idea de incorporar diferentes aminosilanos cargados con NO en una cadena principal tiene varias ventajas sobre una mezcla física de dos sílices co-condensadas diferentes. Una de estas ventajas es la homogeneidad, y otra es la estabilidad mejorada. Las **figuras 9A** y **9B** ilustran la curva de liberación de las macromoléculas de sílice multidonante y una mezcla física de los mismos donantes en armazones de sílice co-condensada separados. Está claro que en la primera hora que se muestra la cinética es diferente.

La red de siloxano co-condensado con diazeniodiolatos incorporada en toda la macromolécula también tiene una estabilidad aumentada en comparación con cada partícula individual preparada con solo una carga de NO. La **figura 9B** muestra la degradación de la sílice multidonante desacelerada significativamente en comparación con las mezclas físicas. Este descubrimiento puede ser extremadamente útil para aumentar la capacidad de preservar el NO hasta la liberación desencadenada en la ubicación de la aplicación médica seleccionada. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, el mecanismo para el aumento de la estabilidad parece ser un esfuerzo coordinado tanto del impedimento estérico del ataque de protones como del enlace de hidrógeno intramolecular entre diferentes silanos. La interacción de protección intramolecular no está disponible en el sólido mixto, lo que dio como resultado una degradación más rápida.

Para preparar monómeros de aminosilano diazeniodiolato, se añade el aminosilano a un recipiente de reacción de alta presión junto con 1 equivalente de solución de NaOH NaOMe (25-30 % en peso). También se añade un volumen igual de metanol seco. El reactor se bombea/purga con argón a 689 kPa (100 psi) durante tres veces antes de que se bombee NO al reactor. La presión de reacción inicial es al menos 2068 kPa (300 psi) y tan alta como de 2895 kPa (420 psi). La presión se mantiene en este intervalo con recarga. La reacción se detiene a las dos horas y el contenido se usa en las siguientes reacciones de condensación sin más aislamiento.

Para producir sílice co-condensada que libera NO con un perfil de liberación programado, se mezclaron las diferentes soluciones de monómero de silano diazeniodiolato a las relaciones preestablecidas. La mezcla luego se añade a un matraz con etanol preenfriado con protección de nitrógeno. La mezcla se enfría adicionalmente a -15 °C y se añade la cantidad preestablecida de silano de estructura (TEOS o TMOS). Cuando la temperatura de la mezcla se equilibra a -15 °C, se añade la solución acuosa de hidróxido de amonio. La reacción se calienta entonces

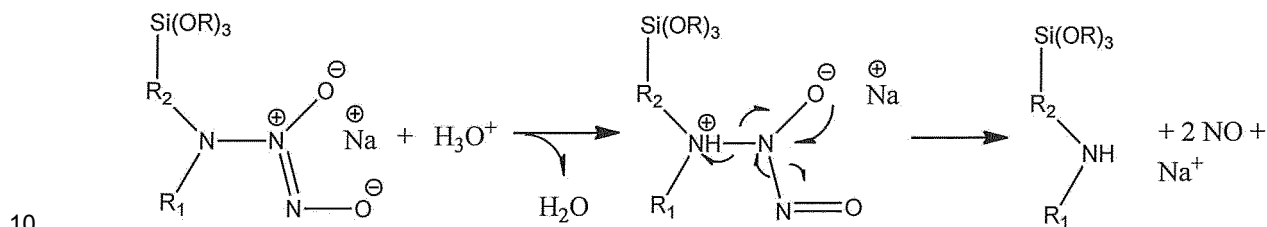


rápidamente a 15 °C y se agita durante 3 horas adicionales. Después, el contenido se filtra. El sólido se lava con etanol seco dos veces y luego se seca extensamente.

**Tabla 2. Un ejemplo de liberación programable de dos silanos**

|   | Composición de muestra | Relación | Vida media/minutos | NO total umol/mg | Referencia |
|---|------------------------|----------|--------------------|------------------|------------|
| 1 | MAP3/AEAP3             | 100/0    | 4                  | 4,5              | 10-7-132   |
| 2 | MAP3/AEAP3             | 50/50    | 23                 | 4,1              | 11-4-61    |
| 3 | MAP3/AEAP3             | 33/66    | 70                 | 3                | 11-4-59    |
| 4 | MAP3/AEAP3             | 25/75    | 112                | 2,7              | 11-4-60    |
| 5 | MAP3/AEAP3             | 0/100    | 210                | 5,1              | 11-4-29    |

5 Resulta evidente que la degradación de diazeniodiolato es el mismo mecanismo que la vía de liberación de NO a través de la reacción iniciada por protones que se ilustra a continuación. Por lo tanto, el agua/humedad se encuentran entre los principales motivos de degradación. Los datos experimentales han demostrado que algunas sílices co-condensadas funcionalizadas con diazeniodiolato son higroscópicas, y el agua intrínseca puede estar estrechamente unida al silicato en la cadena principal del polímero. La propiedad higroscópica de la sílice co-condensada funcionalizada con diazeniodiolato puede conducir a la degradación del diazeniodiolato.

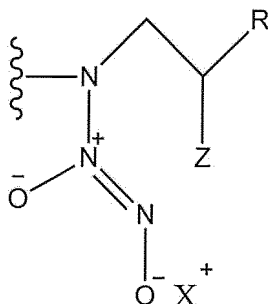


15 Muchas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones expuestas en el presente documento se le ocurrirán a un experto en la técnica a la que pertenecen estas invenciones que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, debe entenderse que las invenciones no están limitadas a las realizaciones específicas desveladas y que las modificaciones y otras realizaciones pretenden incluirse dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean los términos específicos en el presente documento, se usan solo en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

## REIVINDICACIONES

1. Una macromolécula de liberación de óxido nítrico que comprende al menos dos estructuras donantes de NO diferentes de la misma clase; o al menos dos estructuras donantes de NO diferentes de la misma clase que tienen diferentes cinéticas de liberación de óxido nítrico; o al menos dos estructuras donantes de NO diferentes de la misma clase, en las que la clase son donantes de diazeniodiolato o donantes de nitrosotiol; o en la que la macromolécula comprende al menos dos estructuras donantes de diazeniodiolato diferentes.

2. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 1, en la que al menos una estructura donante de diazeniodiolato comprende la estructura:



en la que R es -CN, -COO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6-12</sub>H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -Ph, -C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>CH=CH<sub>2</sub>; Z es -H o -OH; y X es Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>;

en la que al menos uno de las estructuras donantes de diazeniodiolato tiene la fórmula -R-N(NONO<sup>-</sup>X<sup>+</sup>)-R', en la que R es un grupo funcional orgánico divalente, R' es un grupo funcional orgánico monovalente, y X<sup>+</sup> es un catión monovalente; o

R se selecciona entre alquileo o arilalquileo, en la que el grupo alquileo de alquileo o arilalquileo está saturado o insaturado y puede estar sustituido; R' se selecciona de alquilo saturado o insaturado, alquilo sustituido saturado o insaturado, alquilnitrilo saturado o insaturado, arilo, arilo sustituido, alquilarilo en la que el grupo alquilo está saturado o insaturado, poliéter y -alquil-NH<sub>2</sub> en la que el grupo alquilo está saturado o insaturado; y X<sup>+</sup> se selecciona de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

3. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 1, en la que la macromolécula de liberación de óxido nítrico comprende un dendrímero o sílice co-condensada.

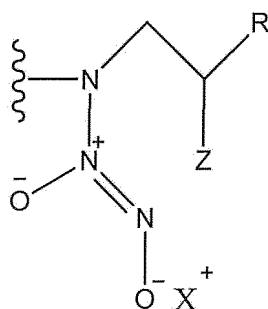
4. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 3, en la que la macromolécula comprende al menos dos estructuras donantes de diazeniodiolato diferentes y al menos una de las estructuras donantes de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO en un intervalo de 30 segundos a 10 minutos, y al menos una estructura donante de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO de más de 60 minutos, según se determina en tampón acuoso a pH 7,4 y 37 °C.

5. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 3, en la que la macromolécula comprende al menos dos estructuras donantes de diazeniodiolato diferentes y al menos una de las estructuras donantes de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO en un intervalo de 30 segundos a 10 minutos, y al menos una estructura donante de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO de más de 10 minutos pero menor o igual a 60 minutos, según se determina en tampón acuoso a pH 7,4 y 37 °C.

6. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 3, en la que la macromolécula comprende al menos dos estructuras donantes de diazeniodiolato diferentes y al menos una de las estructuras donantes de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO de más de 10 minutos pero menor o igual a 60 minutos, y al menos una estructura donante de diazeniodiolato tiene una vida media de liberación de NO de más de 60 minutos, según se determina en tampón acuoso a pH 7,4 y 37 °C.

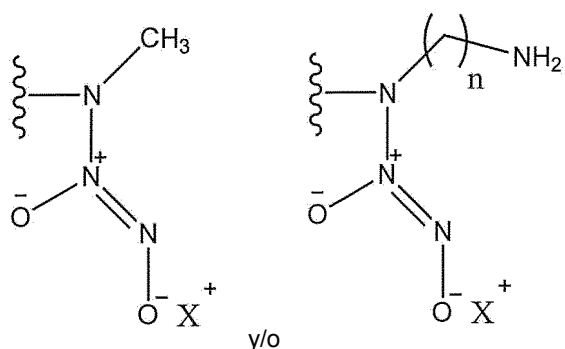
7. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 3, en la que la macromolécula comprende al menos dos estructuras donantes de diazeniodiolato diferentes y al menos una de las estructuras donantes de diazeniodiolato tiene un flujo máximo de NO en un intervalo de 2000 ppb de NO/mg a 20.000 ppb de NO/mg, y una vida media en un intervalo de 0,1 a 1 hora, y al menos una estructura donante de diazeniodiolato tiene un flujo máximo de NO en un intervalo de 100 ppb de NO/mg a 2000 pp de NO/mg y una vida media en un intervalo de 1 hora a 5 horas, según se determina en tampón acuoso a pH 7,4 y 37 °C.

8. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 4, en la que la macromolécula de liberación de óxido nítrico comprende un dendrímero y al menos una de las estructuras donantes de diazeniodiolato comprende la estructura:



en la que R es -CN, -COO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6-12</sub>H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -Ph, -C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>CH=CH<sub>2</sub>; Z es -H o -OH; y X es Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

- 5 9. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 3, en la que la macromolécula de liberación de óxido nítrico comprende sílice co-condensada, al menos dos estructuras donantes de diazeniodiolato diferentes, y al menos una estructura donante de diazeniodiolato comprende



en las que n es 1-5 y X es Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

- 10 10. La macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 3, en la que la sílice está presente como partículas que tienen un tamaño de partícula medio de menos de 10  $\mu\text{m}$ .
- 10 11. Una composición farmacéutica que comprende la macromolécula de liberación de óxido nítrico de la reivindicación 1, al menos un excipiente y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional.
12. Un kit que comprende al menos dos composiciones farmacéuticas de la reivindicación 11.
13. Un apósito para heridas que comprende una matriz polimérica y la macromolécula de liberación de NO de la reivindicación 1.
- 15 14. Un kit que comprende al menos dos apósitos para heridas de la reivindicación 13.
15. La macromolécula de liberación de NO de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una afección dermatológica, una afección dermatológica que comprende al menos uno de una herida, infección microbiana e inflamación o acné.

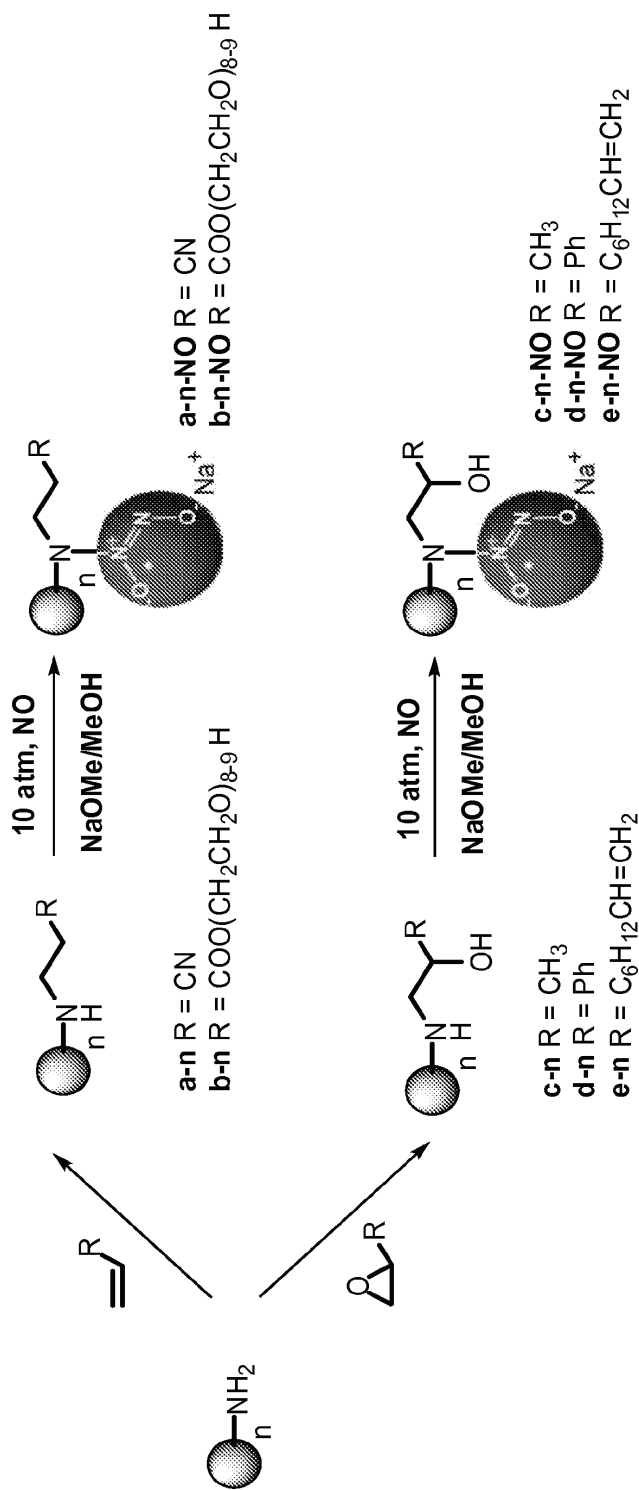


FIGURA 1

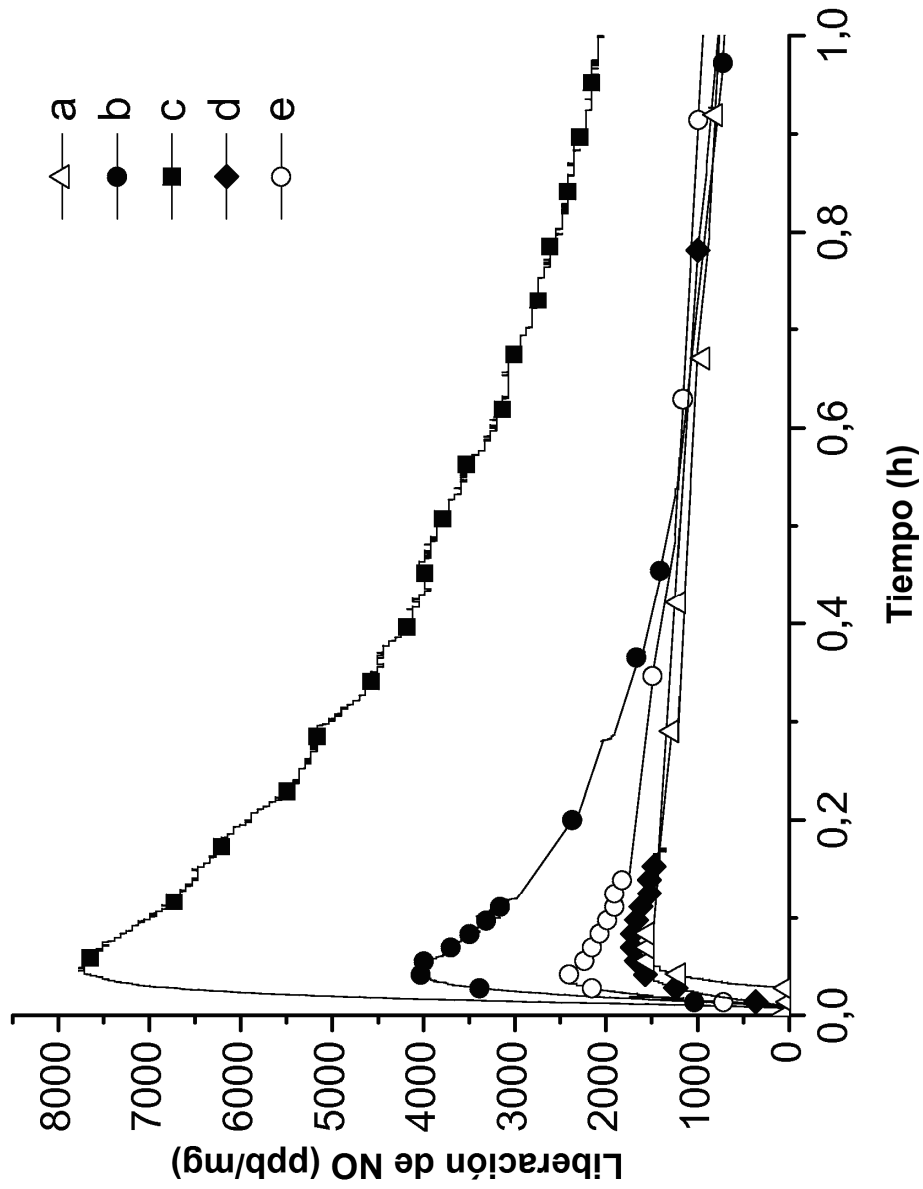


FIGURA 2A

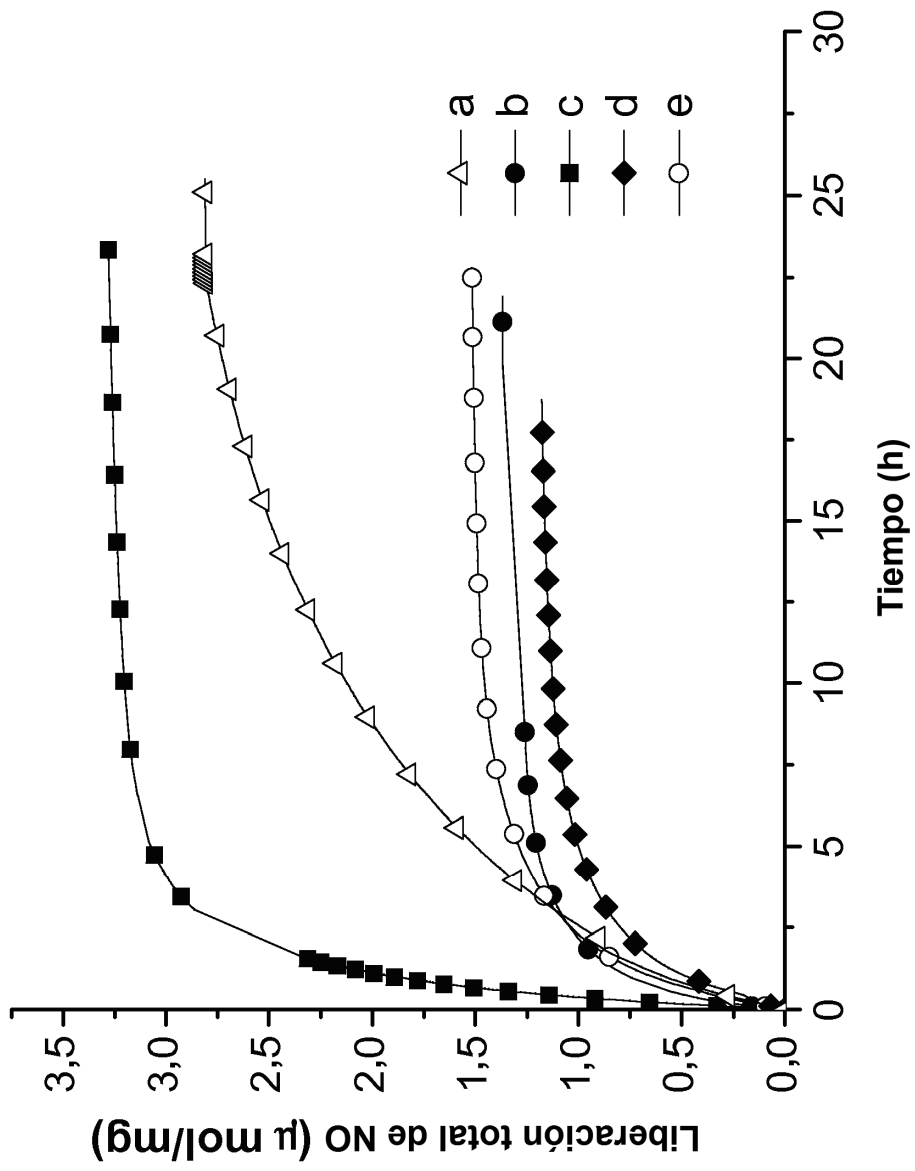


FIGURA 2B

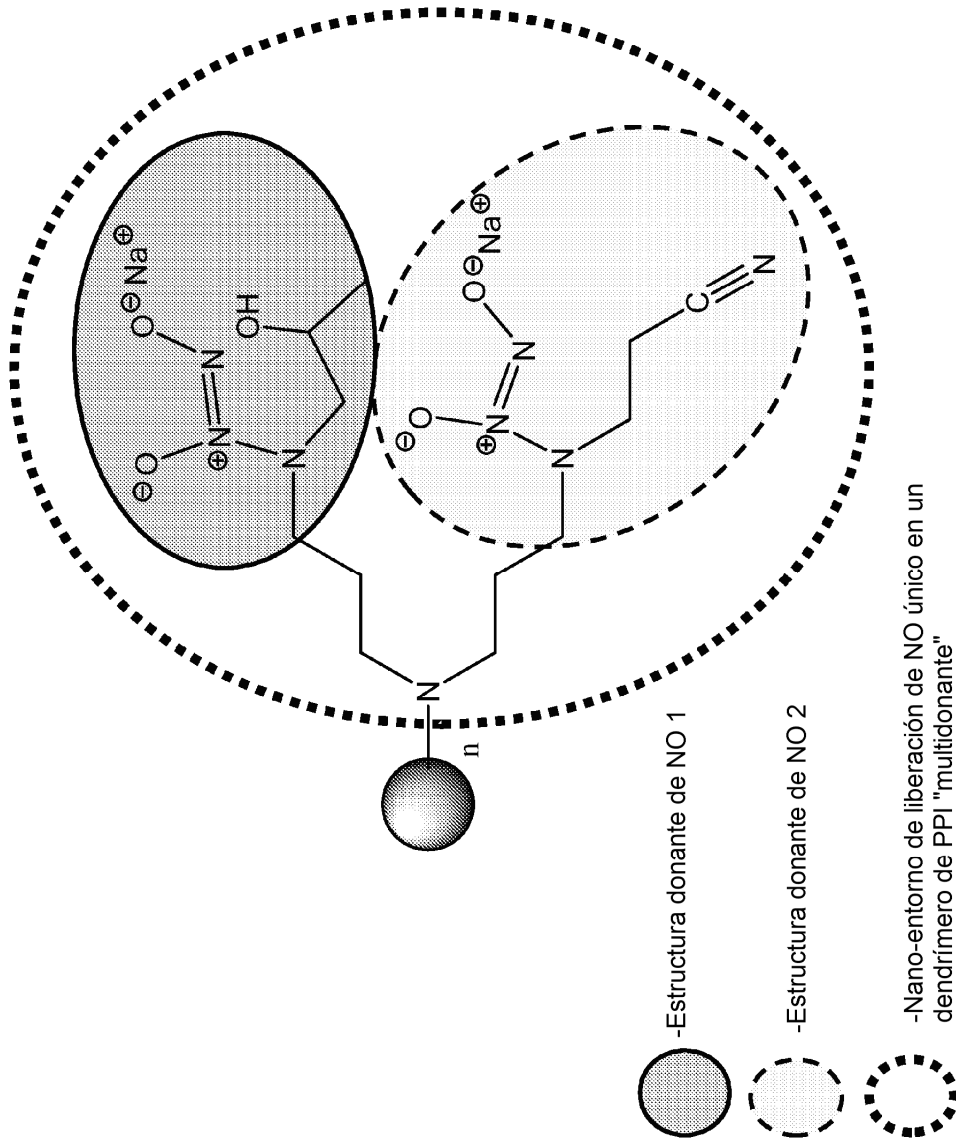


FIGURA 3

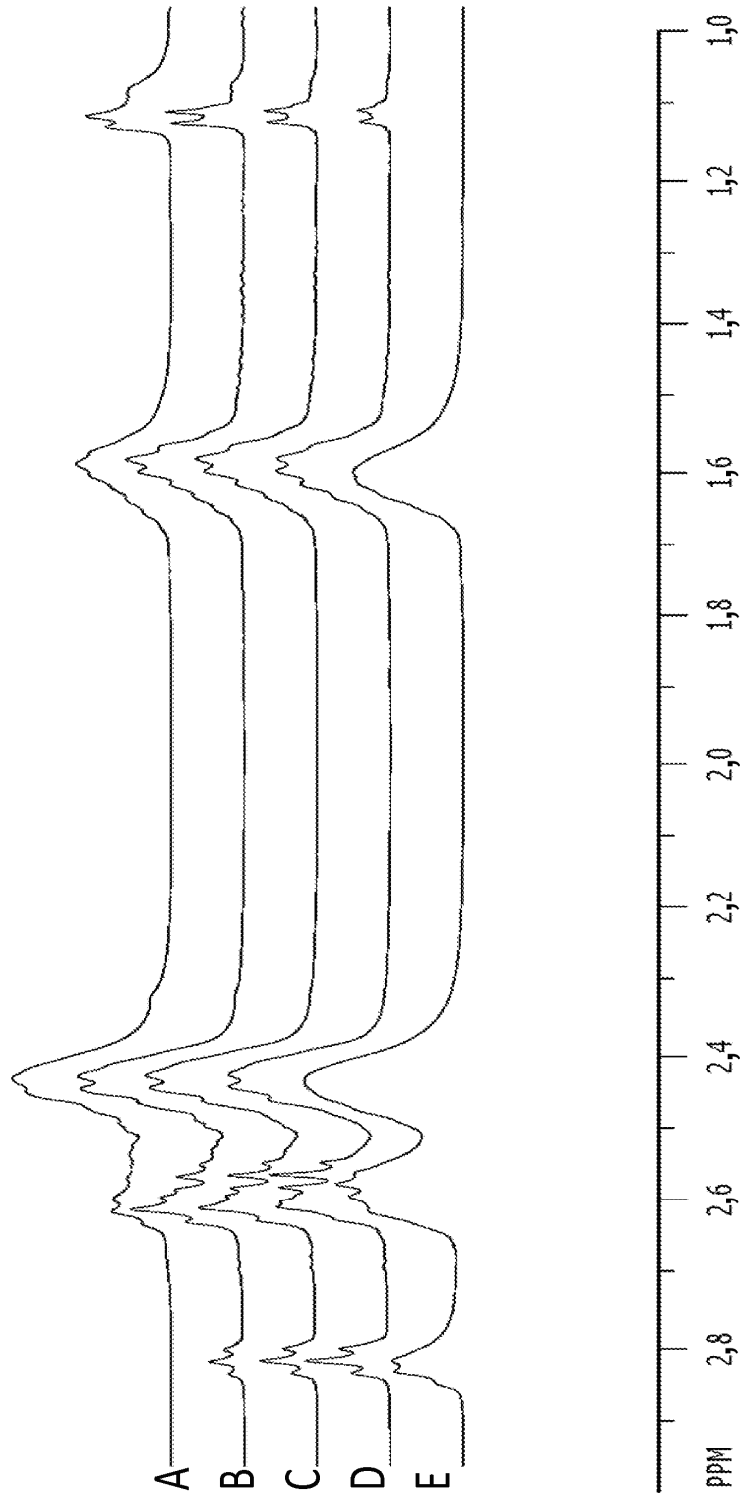


FIGURA 4



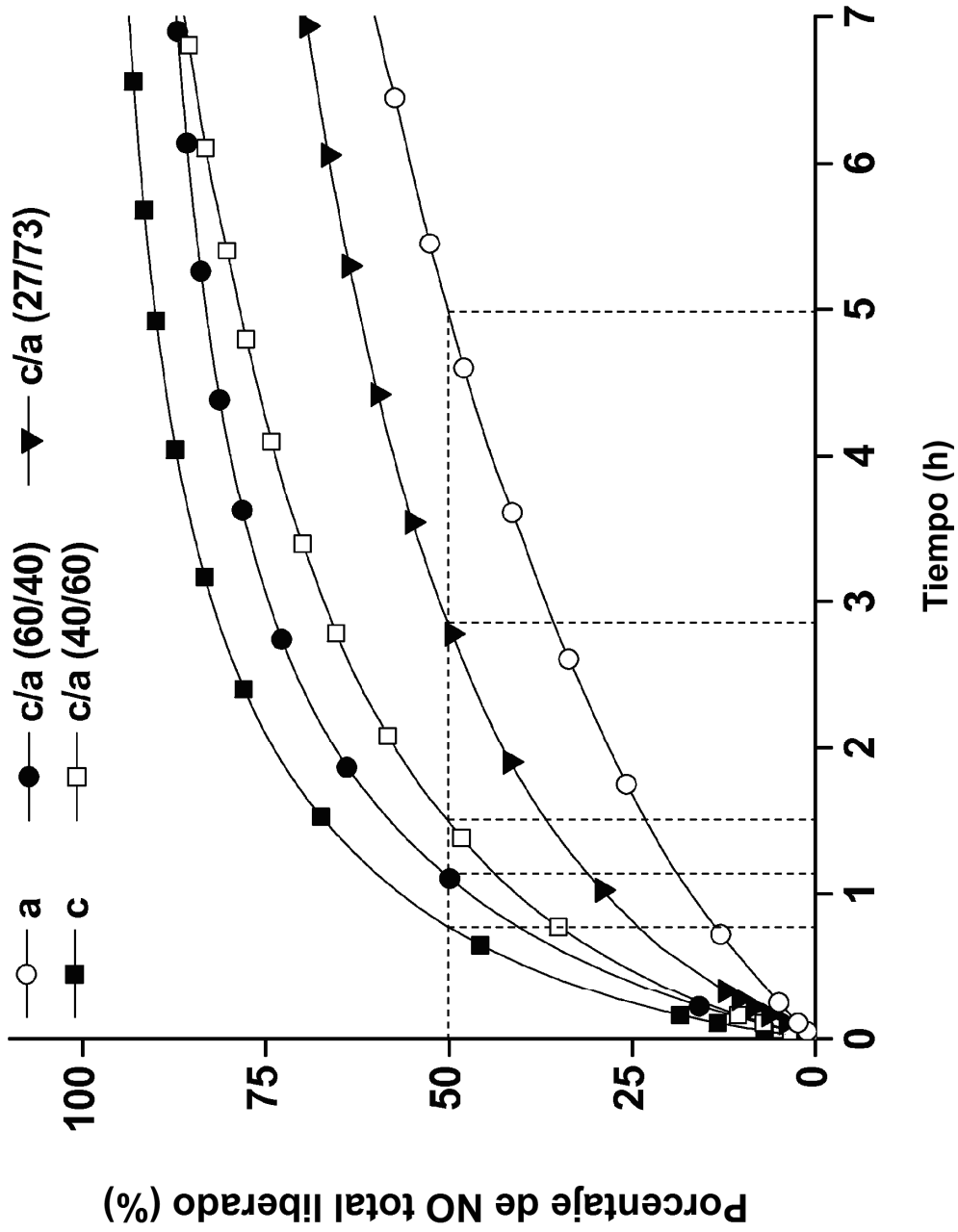


FIGURA 5A

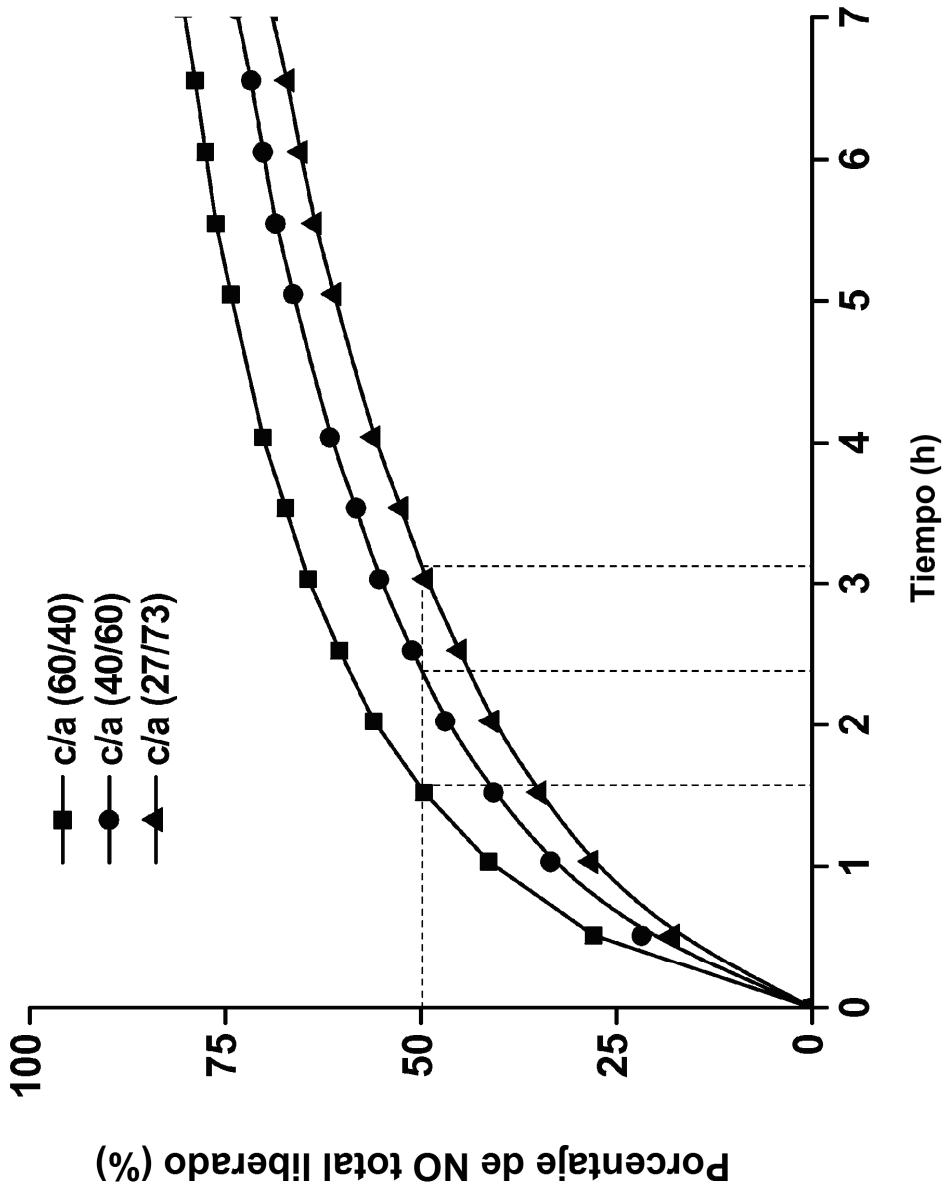


FIGURA 5B

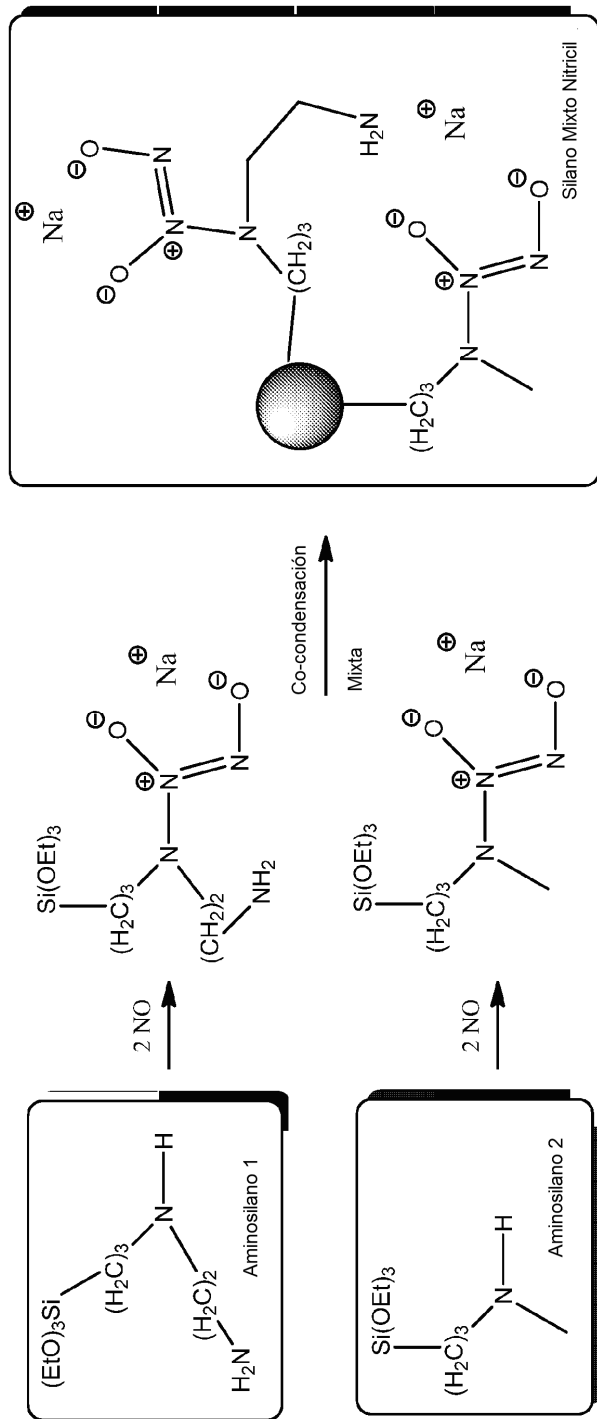


FIGURA 6

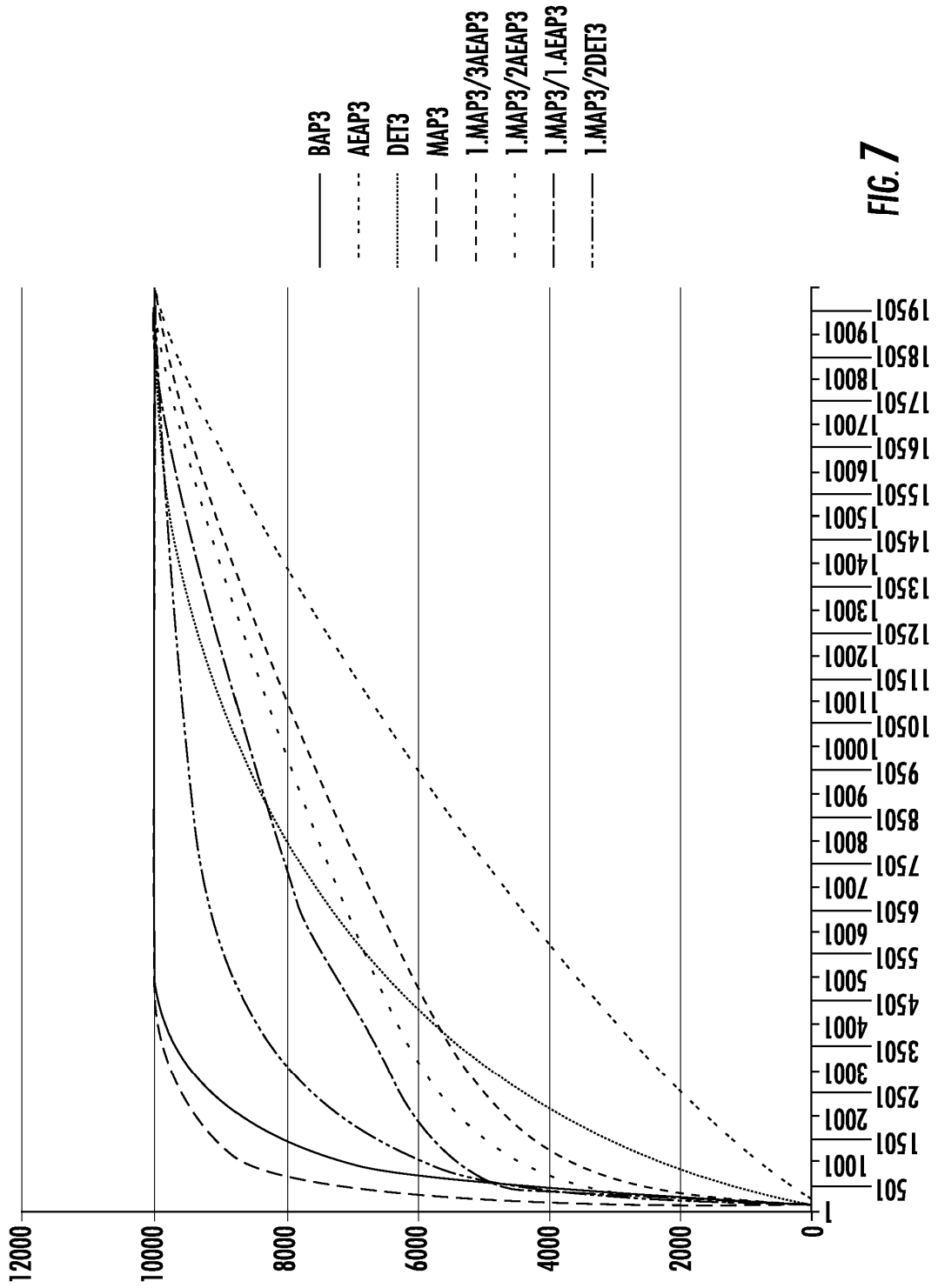
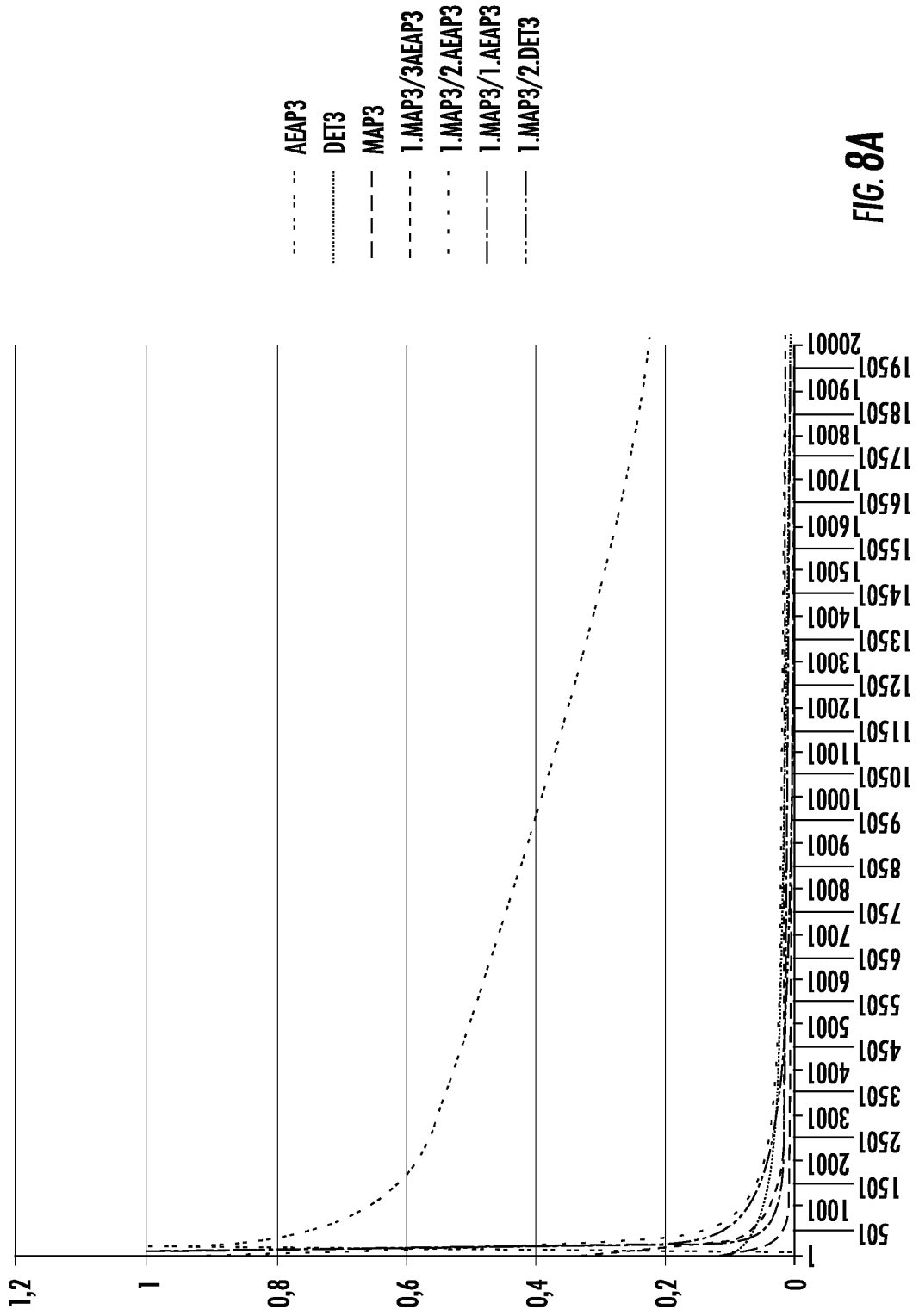


FIG. 7



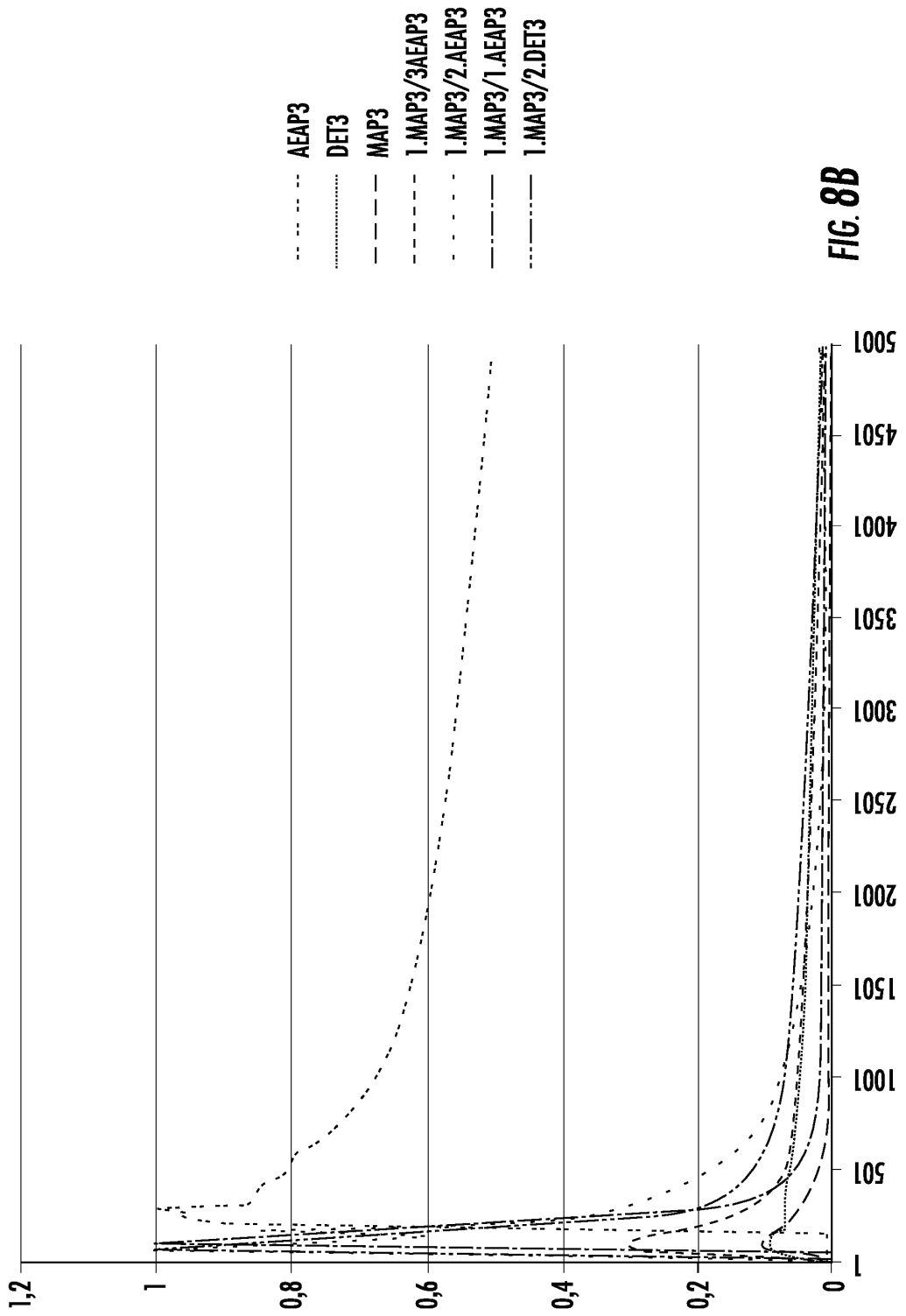


FIG. 8B

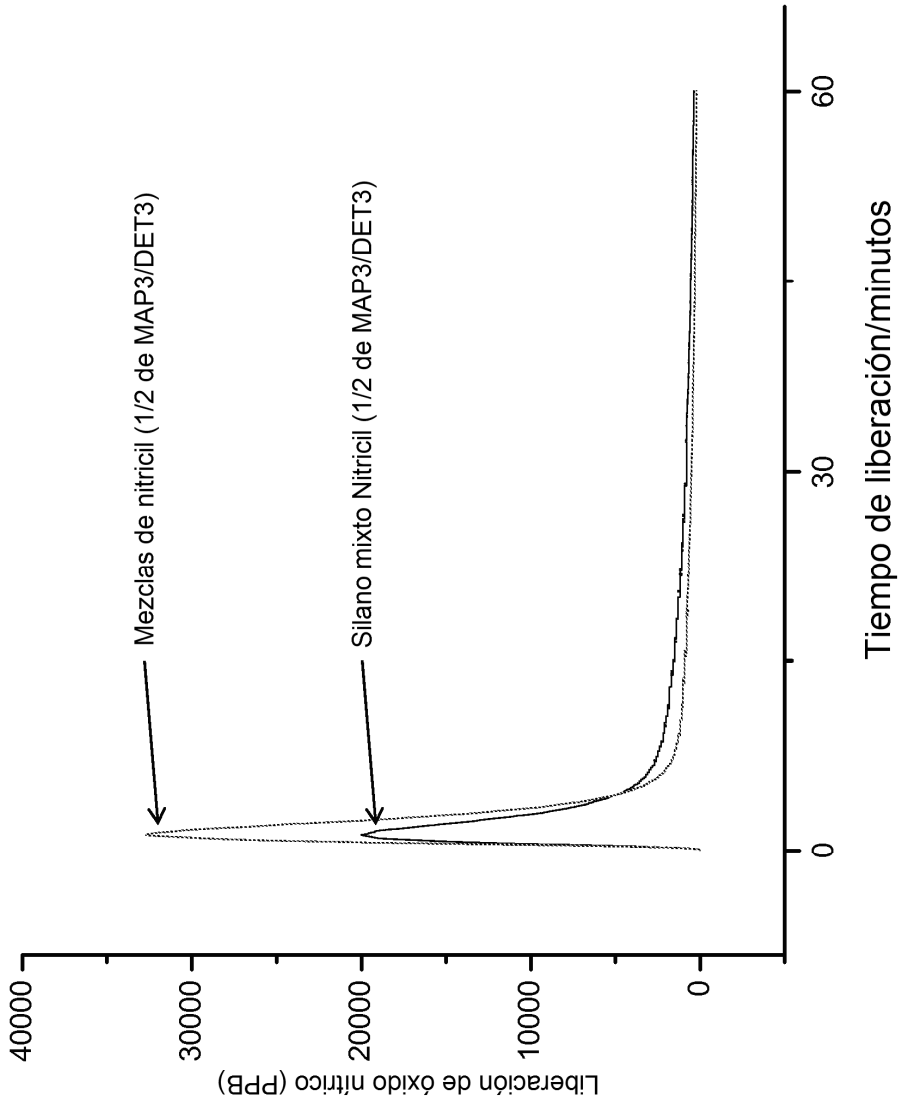


FIGURA 9A

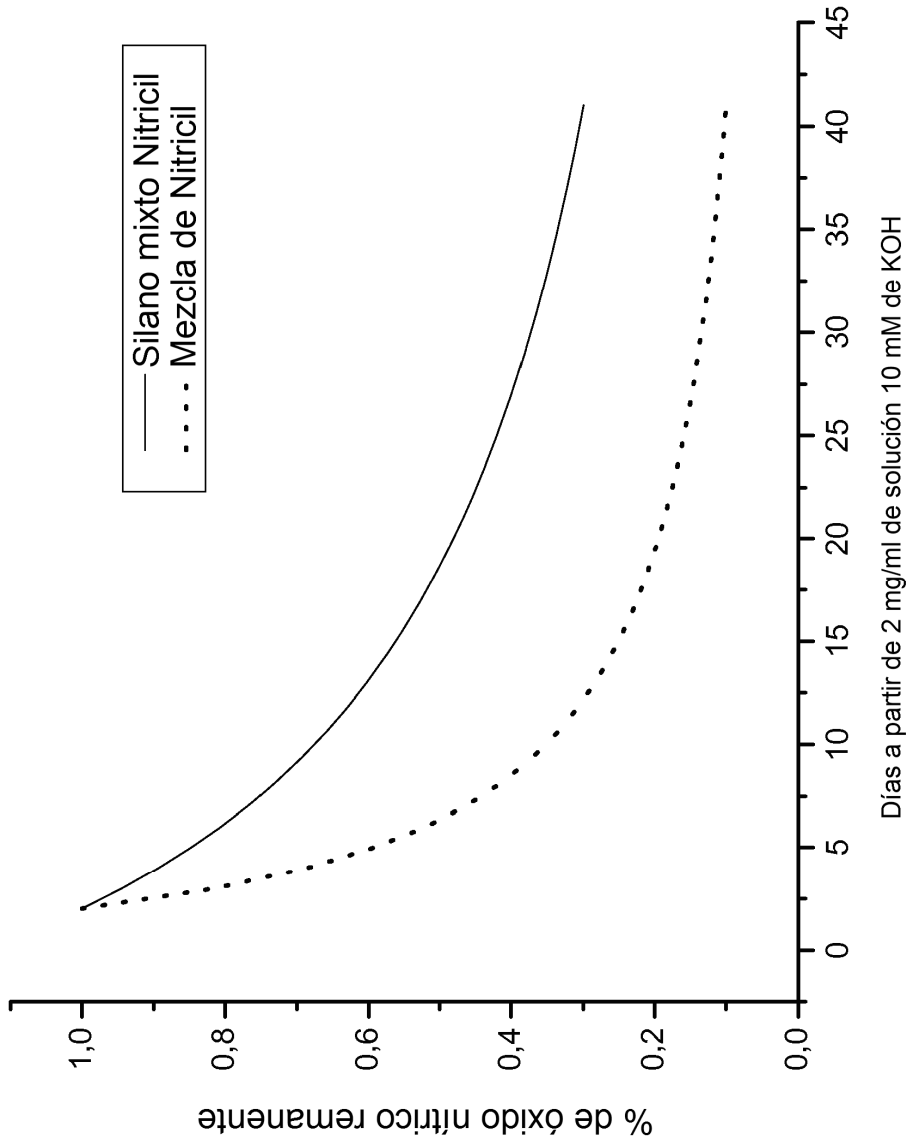


FIGURA 9B



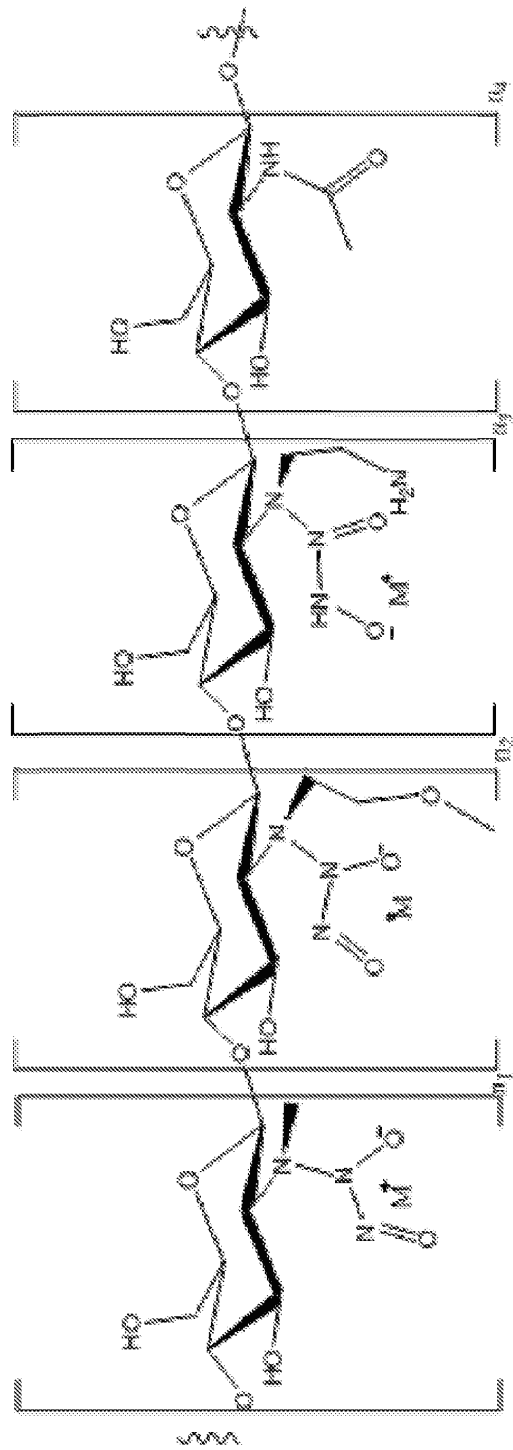


FIGURA 10