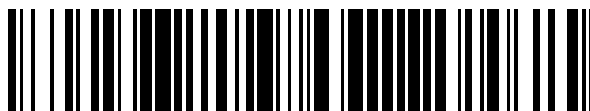


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 927**

51 Int. Cl.:

A61L 27/18	(2006.01)
A61L 27/52	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01)
C07C 271/08	(2006.01)
A61L 15/26	(2006.01)
A61K 47/69	(2007.01)
A61K 47/60	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/US2012/054278**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036847**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12829900 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2755691**

54 Título: **Hidrogeles con reticulación biodegradable**

30 Prioridad:

07.09.2011 US 201161531990 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2018

73 Titular/es:

**Prolynx LLC (100.0%)
455 Mission Bay Blvd. South Suite 145
San Francisco, CA 94158, US**

72 Inventor/es:

**ASHLEY, GARY, W.;
SANTI, DANIEL, V. y
HENISE, JEFFREY, C.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 686 927 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

Hidrogeles con reticulación biodegradable

5 Antecedentes de la Técnica

10 Un hidrogel es una red tridimensional de cadenas poliméricas hidrófilas naturales o sintéticas en las que el agua (hasta el 99 %) es el medio de dispersión. Las macromoléculas frágiles frecuentemente requieren un ambiente bien hidratado para su actividad e integridad estructural y el alto grado de hidratación de un hidrogel puede conservar el plegamiento de una proteína necesario para su actividad. El alto contenido de agua de los hidrogeles hace que el material sea biocompatible y minimiza las reacciones inflamatorias de tejidos en contacto con el gel y proporciona una flexibilidad comparable a la del tejido vivo. Los hidrogeles son, por lo tanto, de interés en la ingeniería biomédica, como materiales absorbentes para apósitos de heridas y pañales desechables y como portadores para la liberación prolongada de fármacos. Los hidrogeles se han preparado mediante reticulación física o química de polímeros hidrófilos naturales o sintéticos.

15 Los ejemplos de hidrogeles formados a partir de la reticulación de polímeros naturales incluyen los formados a partir de hialuronanos, quitosanos, colágeno, dextrano, pectina, polilisina, gelatina o agarosa (ver: Hennink, W. E., y otros, Adv. Fármaco Del. Rev. (2002) 54:13-36; Hoffman, A. S., Adv. Fármaco Del. Rev. (2002) 43:3-12). Estos hidrogeles consisten en cadenas de polisacáridos o polipéptidos de alto peso molecular. Algunos ejemplos de su uso incluyen la encapsulación de interleucina-2 humana recombinante en hidrogeles basados en dextrano químicamente reticulado (Cadee, J. A., y otros, J Control. Release (2002) 78:1-13) y de insulina en un complejo de quitosano/hialuronano iónicamente reticulado (Surini, S., y otros, J. Control. Release (2003) 90:291-301).

25 Los ejemplos de hidrogeles formados mediante reticulación química o física de polímeros sintéticos incluyen polímeros de ácido poli(lactic- co-glicólico) (PLGA), (met)acrilato-oligoláctido-PEO-oligoláctido-(met)acrilato, poli(etilenglicol) (PEO), poli(propilenglicol) (PPO), copolímeros de PEO-PPO-PEO (Pluronic®), poli(fosfaceno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), copolímeros de PL(G)A- PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), y otros (ver, por ejemplo, Hoffman, A. S., Adv. Drug Del. Rev (2002) 43:3-12). Los ejemplos de encapsulación de proteínas en polímeros mediante el uso de tales hidrogeles incluyen la encapsulación de insulina en copolímeros de PEG-g-PLGA y PLGA-g-PEG físicamente reticulados (Jeong, B., y otros, Biomacromolecules (2002) 3:865-868) y de albúmina sérica bovina en macromonomeros de acrilato-PGA-PEO-PGA-acrilato químicamente reticulados (Sawhney A. S., y otros, Macromolecules (1993) 26:581-587).

35 El documento US 2010/0240586 describe la exendina y sus análogos modificados por uno o más derivados de PEG unidos a uno o más ácidos amino de exendina o sus análogos. El documento WO 2009/158668 describe profármacos y conjugados de fármaco y macromolécula que comprenden una macromolécula y el documento WO 201/059883 describe un sistema de suministro in situ de fármaco en hidrogel biodegradable que comprende un enlace amida particular en la estructura de hidrogel o entre el agente activo y el hidrogel.

40 Dependiendo del tamaño del poro, la degradación de un hidrogel se requiere, típicamente, para la liberación de los compuestos encapsulados. La degradación aumenta el tamaño de los poros en la medida en que el fármaco puede difundir fuera del interior del hidrogel en los fluidos corporales circundantes. La degradación es deseable, además, para eliminar el hidrogel del cuerpo una vez que se completa el suministro del fármaco, ya que la eliminación quirúrgica del portador de hidrogel agotado es frecuentemente dolorosa. Mientras que muchos de los hidrogeles conocidos teóricamente son biodegradables, en la práctica la degradación no es controlada y es, por lo tanto, impredecible. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos materiales de hidrogel que se biodegraden a una tasa predeterminada.

50 Para efectuar la degradación del hidrogel, es útil tener agentes de reticulación que sean escindibles en condiciones fisiológicas. En un enfoque, la escisión enzimática del agente reticulante como un sustrato puede dar este resultado. Sin embargo, dependiendo de la degradación enzimática da como resultado la variabilidad entre pacientes, así como también las diferencias entre los resultados *in vivo* e *in vitro*.

55 La presente invención aprovecha un mecanismo de escisión descrito en un contexto diferente - a saber, la liberación de fármacos desde portadores macromoleculares que se describe, por ejemplo, en la solicitud de los Estados Unidos US2006/0171920 y los documentos WO2009/158668, WO2011/140393, WO2011/140392 y WO2011/140376. La reacción de eliminación se basa en un grupo modulador para controlar la acidez de un protón; la ionización de este protón da como resultado la liberación del fármaco.

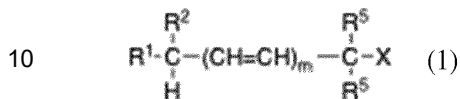
60 Para conocimiento de los solicitantes, este mecanismo no se ha usado para establecer un agente reticulante escindible para hidrogeles que dé como resultado la degradación del gel.

Descripción de la invención

65 Esta invención proporciona hidrogeles que se degradan a componentes más pequeños, solubles en un proceso no enzimático tras la exposición a condiciones fisiológicas y a métodos para prepararlos. Los hidrogeles se preparan a partir de agentes de reticulación que experimentan reacciones de eliminación en condiciones fisiológicas, escindiendo, por lo tanto, el agente de reticulación de la cadena principal del hidrogel. La invención se refiere, además, a los agentes de

reticulación en sí y a productos intermedios para formar los hidrogeles de la invención. Los hidrogeles biodegradables preparados de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser para el uso en varios campos, incluidos ingeniería biomédica, materiales absorbentes, y como portadores para el suministro de fármacos.

5 Por lo tanto, en un aspecto, la invención se dirige a un hidrogel que es biodegradable en condiciones fisiológicas cuyo hidrogel comprende uno o más polímeros reticulados por un enlazador que se descompone mediante una reacción de eliminación, (a) en donde el enlazador cuando se dispone en el hidrogel, es un residuo de la fórmula (1):



en donde al menos uno de R¹, R² o R⁵ se acopla a través de un primer grupo funcional a dicho uno o más polímeros y en donde X se acopla a dicho uno o más polímeros del hidrogel a través de un segundo grupo funcional,

15 en donde m es 0 o 1;
en donde uno y solo uno de R¹ y R² puede ser H o puede ser alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

al menos uno o ambos R¹ y R² son independientemente CN; NO₂;

arilo opcionalmente sustituido;

20 heteroarilo opcionalmente sustituido;

alqueno opcionalmente sustituido;

alquino opcionalmente sustituido;

COR³ o SOR³ o SO₂R³ en donde

25 R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u

OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al que se unen forman un anillo heterocíclico;

SR⁴ en donde

30 R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;

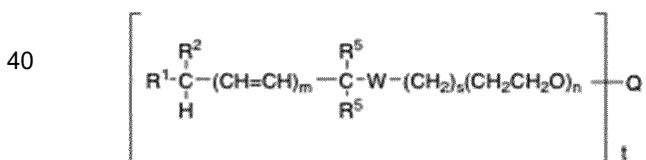
arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

en donde R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y

35 cada R⁵ es independientemente H o es alquilo, alquenalquilo, alquinilalquilo, (OCH₂CH₂)_p O-alquilo en donde p=1-1000, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido,

en donde X es un carbonato, un carbamato, tioéter, un éster o fenol opcionalmente sustituido en donde X se acopla al polímero a través de dicho segundo grupo funcional; o (b) en donde el enlazador es un residuo de la fórmula (2):



45 en donde al menos dos de dichos R¹, R² o R⁵ se acoplan a través de grupos funcionales a uno o más polímeros;

m y R¹, R² y R⁵ se definen como en el párrafo (a);

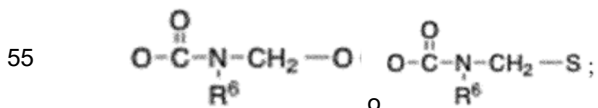
n es 1-1000;

s es 0-2;

50 t es 2,4, 8, 16 o 32;

Q es un grupo núcleo que tiene la valencia t;

W es O(C=O)O, O(C=O)NH, O(C=O)S,



60 en donde R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido.

65 Las definiciones de R¹, R², R⁵, m, X, W, s, n, t y Q se exponen con detalle de aquí en adelante. En el caso de la fórmula (2), el acoplamiento puede ser a través de dos R¹, que existen en la misma molécula de la fórmula (2) o a través de un R¹ y un R⁵, por ejemplo, en la fórmula (2). Es el requisito de que al menos dos de estos sustituyentes acoplados a uno o más polímeros simplemente significa que en el agente reticulante de la fórmula (2) en sí, debe haber al menos dos puntos de unión. En algunas modalidades los sustituyentes R¹, R² y R⁵ son uniformes en cada uno de los "brazos" t.

El hidrogel puede contener, además, uno o más fármacos. El(los) fármaco(s) puede(n) residir simplemente en los poros del hidrogel, o puede(n) acoplarse a un agente de reticulación que a su vez se acopla a la cadena principal polimérica del hidrogel.

5

La invención proporciona, además, métodos para preparar hidrogeles biodegradables que comprenden poner en contacto ya sea simultáneamente o secuencialmente al menos un polímero reactivo y un compuesto reticulante escindible en donde dicho compuesto reticulante escindible comprende un grupo funcional que reacciona con el polímero reactivo y una porción que se escinde mediante eliminación en condiciones fisiológicas que comprende, además, un grupo funcional que reacciona con uno o más polímeros. La invención proporciona, además, métodos para la preparación de hidrogeles biodegradables de liberación de fármacos en donde se controlan las tasas de liberación de fármaco y de biodegradación del hidrogel.

10

Por lo tanto, los fármacos u otros agentes pueden atraparse simplemente en el hidrogel o puede incluirse en el hidrogel en virtud del acoplamiento a través de un enlazador que libera el fármaco a través de una reacción de eliminación también, sin necesidad de la degradación del gel en sí.

15

En otro aspecto, la invención proporciona reactivos de reticulación que comprenden una porción capaz de escindirse mediante la eliminación en condiciones fisiológicas y que comprenden, además, grupos reactivos capaces de formar enlaces covalentes con polímeros reactivos.

20

Aún en otro aspecto, la invención proporciona productos intermedios formados mediante la reacción de los reactivos de reticulación de la invención, con al menos un polímero reactivo.

25

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra una modalidad de la invención en donde los hidrogeles se forman mediante la reticulación de un polímero de múltiples brazos con un agente reticulante de la fórmula (1). Un polímero de 4 brazos en donde cada brazo termina con un ciclooctino (CO) y un agente reticulante de la fórmula (1) en donde un R^5 es $(CH_2)_3N_3$ y X es O-CO-NH- $CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_p-N_3$ (Ejemplo 20) proporcionan un hidrogel 4x4 que comprende un enlazador L de eliminación beta en cada enlace. La tasa de degradación del hidrogel se controla mediante la selección apropiada del grupo modulador R^1 en el enlazador L. También se ilustra la formación de (1) mediante la reacción de un carbonato de succinimidilo con un amino-PEG-azida.

30

Las Figuras 2A y 2B ilustran dos modalidades de la invención en donde los hidrogeles se forman mediante la reticulación de polímeros de múltiples brazos con compuestos de la fórmula (2). El panel A muestra la reticulación de un polímero de 4 brazos en donde cada brazo termina con un ciclooctino (CO) con otro polímero de 4 brazos de la fórmula (2) en donde cada brazo termina con un enlazador de eliminación beta-azida (L_2-N_3). El hidrogel 4x4 resultante comprende un enlazador de eliminación beta en cada enlace. La tasa de degradación del hidrogel se controla mediante la selección apropiada del enlazador L_2 . El panel B muestra la reticulación de un polímero de 8 brazos en donde 4 brazos terminan con un ciclooctino (CO) y los brazos restantes se unen ya sea a una sonda de erosión (EP) o a un fármaco unido liberable (L_1-D). La reticulación con un polímero de 4 brazos en donde cada brazo termina con un enlazador de eliminación beta-azida (L_2-N_3) proporciona un hidrogel 4x8 que comprende un enlazador de eliminación beta L_2 en cada enlace y que comprende un fármaco D unido covalentemente a través de otro enlazador de eliminación beta L_1 . Las tasas de liberación de fármaco desde el hidrogel y la degradación del hidrogel se controlan mediante la selección apropiada de los enlazadores L_1 y L_2 , respectivamente.

35

40

45

La figura 3 muestra la degradación de hidrogeles de PEG 4x4 a pH 7,4, 37 °C según se midió mediante fragmentos de fluoresceína solubilizada-PEG descritos en el Ejemplo 28; tiempos de gelificación inversa mediante el uso de diferentes moduladores: $R^1=(4\text{-clorofenil})SO_2$, 30 horas; $R^1=\text{fenil-SO}_2$, 55 horas; $R^1=O(CH_2CH_2)_2NSO_2$, 22 días; $R^1=CN$, 105 días. La fluoresceína solubilizada se usó como una sonda de erosión, con tiempos de degelificación que se definen como el punto de disolución completa.

50

La figura 4 muestra la correlación entre los tiempos de degelificación medidos para hidrogeles 4x4 del Ejemplo 28 y la tasa de liberación de 5-(aminoacetamido)fluoresceína medida a partir de conjugados de PEG solubles mediante el uso de enlazadores equivalentes.

La figura 5 muestra la dependencia de pH de la degelificación de los hidrogeles de PEG 4x4 del Ejemplo 28, en donde L_2 tiene el modulador $R^1=(4\text{-clorofenil})SO_2$.

55

La figura 6 muestra la correlación entre el pH y tiempo de degelificación para los geles del Ejemplo 28.

La figura 7 muestra la liberación de 5-(aminoacetamido)fluoresceína sustituta de fármaco desde los hidrogeles de PEG 4x8 del Ejemplo 29.

La figura 8 muestra la dependencia de pH de la liberación de 5-(aminoacetamido)fluoresceína sustituta de fármaco desde los hidrogeles de PEG 4x8 del Ejemplo 29. Las vidas medias para la liberación se midieron a pH 7,4 (23,0 h); pH 7,8 (14,0 h); pH 8,1 (6,9 h); pH 8,4 (3,2 h); pH 8,7 (1,9 h); y pH 9,0 (1,1 h).

60

La figura 9 muestra la correlación entre el pH y las vidas medias para la liberación de fármacos desde los hidrogeles 8x4 del Ejemplo 29.

La figura 10 muestra la liberación de la exenatida peptídica (exendina-4) unida covalentemente a través de un enlazador L_1 liberable que tiene el modulador $R^{11}=CH_3SO_2$ a un hidrogel de PEG 8x4 reticulado con enlazadores degradables L_2 que tienen el modulador $R^1=CN$ a pH 8,8, 37 °C (Ejemplo 33). Conociendo la dependencia de pH de la liberación del

65

enlazador y la degradación del gel, también se da la escala correspondiente a pH 7,4. La exenatida solubilizada total (círculos) se libera con $t_{1/2}$ aparente=20,7 h a pH 8,8, que corresponde a $t_{1/2}$ =21 días a pH 7,4. La degelificación (cuadrados=sonda de erosión de fluoresceína solubilizada) se observó a 172 h a pH 8,8, que corresponde a 180 días a pH 7,4.

5 La figura 11 ilustra una modalidad de la invención en donde los hidrogeles de liberación de fármacos se forman mediante la reacción de un primer polímero que comprende al menos dos grupos funcionales ortogonales (B y C) con un enlazador-fármaco de la fórmula (3) en donde el enlazador-fármaco comprende un grupo funcional (B') que reacciona solo con uno de los grupos funcionales ortogonales (B) presentes en el primer polímero, que conecta el enlazador-fármaco al primer polímero a través de un residuo B*. El grupo funcional ortogonal restante (C) en el primer polímero cargado de fármaco resultante (se usa para formar un hidrogel mediante la reacción con un compuesto de la fórmula (1) o (2) en donde estos compuestos comprenden un grupo funcional (C') que reacciona solo con el grupo funcional ortogonal restante presente en el primer polímero cargado de fármaco para reticular el hidrogel a través del residuo C*.

15 Modos de llevar a cabo la invención

Los hidrogeles de la invención son polímeros reticulados por enlazadores que desacoplan el(los) polímero(s) mediante "eliminación." "Eliminación" es un mecanismo de reacción mediante el cual un protón de H y un grupo saliente X se eliminan de una molécula para formar un alqueno. En una modalidad de la invención, la eliminación es una eliminación 1,2 ilustrada como



25 En otras modalidades de la invención, la eliminación es una eliminación 1,4 ilustrada como



35 En el mecanismo de eliminación, el protón de H ilustrado se elimina por una base; en medio acuoso, la base es típicamente ion hidróxido de manera que la tasa de eliminación se determina por el pH del medio. En condiciones fisiológicas, el pH del fluido que rodea e impregna el hidrogel parece ser el factor predominante que controla la tasa de eliminación. Por lo tanto, cuando X y Y representan cadenas dentro de una matriz polimérica ubicada en un ambiente fisiológico, la eliminación dependiente del pH da como resultado la interrupción del enlace entre X y Y y la posterior biodegradación de la matriz polimérica en un proceso que no requiere de la acción de las enzimas.

40 Por "una porción capaz de escindirse mediante eliminación en condiciones fisiológicas" se entiende una estructura que comprende un grupo $\text{H}-\text{C}-(\text{CH}=\text{CH})_m-\text{C}-\text{X}$ en donde m es 0 o 1 y X es un grupo saliente, en donde una reacción de eliminación como se describe anteriormente para eliminar los elementos de HX puede producirse a una tasa de manera que la vida media de la reacción esté entre 1 y 10 000 horas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Preferentemente, la vida media de la reacción está entre 1 y 5000 horas, y con mayor preferencia entre 1 y 1000 horas, en condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Por condiciones fisiológicas de pH y temperatura se entiende un pH de entre 7 y 8 y una temperatura de entre 30 y 40 °C.

45 Debe notarse que cuando los intervalos se dan en la presente solicitud, tal como 1-1000 horas, los números intermedios del intervalo deberían considerarse como los descritos como si se expusieran específicamente y explícitamente. Esto evita la necesidad de una larga lista de números y los solicitantes claramente pretenden incluir cualquier intervalo arbitrario entre los límites externos. Por ejemplo, el intervalo de 1-1000 incluye, además, 1-500 y 2-10.

50 Por hidrogel se entiende una red polimérica predominantemente hidrófila, tridimensional que comprende una gran cantidad de agua, formada mediante reticulación química o física de homopolímeros, copolímeros u oligómeros naturales o sintéticos. Los hidrogeles pueden formarse a través de la reticulación de polietilenglicoles (considerados por ser sinónimos con óxidos de polietileno), polipropilenglicoles, poli(N-vinilpirrolidona), polimetacrilatos, polifosfacenos, poliláctidos, poli(acrilamidas, poliglicolatos, polietileniminas, agarosa, dextrano, gelatina, colágeno, polilisina, quitosanos, alginatos, hialuronanos, pectina, carragenina. El polímero puede ser un polímero con múltiples brazos como se ilustra más adelante.

55 Los hidrogeles pueden ser, además, sensibles al ambiente, por ejemplo, que son líquidos a baja temperatura, pero gelifican a 37 °C, por ejemplo, los hidrogeles formados a partir de poli(N-isopropilacrilamida).

60 Por hidrogel mesoporoso se entiende un hidrogel que tiene poros entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm de diámetro. Los poros en los hidrogeles mesoporosos son lo suficientemente grandes para permitir la difusión libre de moléculas biológicas tales como proteínas. Por hidrogel macroporoso se entiende un hidrogel que tiene poros mayores que aproximadamente 100 nm de diámetro. Por hidrogel microporoso se entiende un hidrogel que tienen poros menores que aproximadamente 1 nm de diámetro.

5 Por polímero reactivo y oligómero reactivo se entiende un polímero u oligómero que comprende grupos funcionales que son reactivos frente a otros grupos funcionales, con la máxima preferencia en condiciones suaves compatibles con los requerimientos de estabilidad de péptidos, proteínas, y otras biomoléculas. Los grupos funcionales adecuados encontrados en polímeros reactivos incluyen maleimidias, tioles o tioles protegidos, alcoholes, acrilatos, acrilamidas, aminas o aminas protegidas, ácidos carboxílicos o ácidos carboxílicos protegidos, azidas, alquinos incluidos cicloalquinos, 1,3-dienos incluidos ciclopentadienos y furanos, alfa-halocarbonilos y N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo o nitrofenil ésteres o carbonatos.

10 Por grupo funcional capaz de conectarse a un polímero reactivo se entiende un grupo funcional que reacciona con un grupo funcional correspondiente de un polímero reactivo para formar un enlace covalente con el polímero. Los grupos funcionales adecuados capaces de conectarse con un polímero reactivo incluyen maleimidias, tioles o tioles protegidos, acrilatos, acrilamidas, aminas o aminas protegidas, ácidos carboxílicos o ácidos carboxílicos protegidos, azidas, alquinos incluidos cicloalquinos, 1,3-dienos incluidos ciclopentadienos y furanos, alfa-halocarbonilos, y N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, o nitrofenil ésteres o carbonatos.

20 Por hidrogel biodegradable se entiende un hidrogel que pierde su integridad estructural a través de la escisión de enlaces de componentes químicos en condiciones fisiológicas de pH y temperatura. La biodegradación puede catalizarse enzimáticamente o puede ser únicamente dependiente de factores ambientales tales como pH y temperatura. La biodegradación da como resultado la formación de fragmentos de la red polimérica que son lo suficientemente pequeños para ser solubles y, por lo tanto, experimentan la eliminación del sistema a través de las vías fisiológicas habituales.

25 Por reactivo de reticulación se entiende un compuesto que comprende al menos dos grupos funcionales que son capaces de formar enlaces covalentes con uno o más polímeros reactivos u oligómeros. Típicamente, los polímeros u oligómeros reactivos son solubles, y la reticulación da como resultado la formación de una red tridimensional insoluble o gel. Los dos grupos funcionales del reactivo de reticulación pueden ser idénticos (homobifuncionales) o diferentes (heterobifuncionales). Los grupos funcionales del reactivo de reticulación heterobifuncional se escogen para permitir la reacción de un grupo funcional con un grupo afín del polímero reactivo u oligómero y la reacción del segundo grupo funcional con un grupo afín del mismo o un polímero u oligómero reactivo diferente. Los dos grupos funcionales de un reactivo de reticulación bifuncional se escogen de manera que no sean reactivos entre sí, es decir, no sean afines.

Los ejemplos de pares de reactivos afines de grupos funcionales incluyen:

35 Azida	+	acetileno, ciclooctino, maleimida
Tiol	+	maleimida, acrilato, acrilamida, vinilsulfona, vinilsulfonamida, halocarbonilo
Amina	+	ácido carboxílico, ácido carboxílico activado
40 Maleimida	+	1,3-dieno, ciclopentadieno, furano

Por lo tanto, como un ejemplo un reactivo de reticulación heterobifuncional puede prepararse para que tenga un grupo azida y uno amina, pero no un grupo azida y uno ciclooctino.

45 "Sustituido" significa un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo o heteroarilo que comprende uno o más grupos sustituyentes en lugar de uno o más átomos de hidrógeno. Los grupos sustituyentes pueden seleccionarse generalmente de halógeno incluido F, Cl, Br e I; alquilo inferior incluido lineal, ramificado y cíclico; haloalquilo inferior incluido fluoroalquilo, cloroalquilo, bromoalquilo y yodoalquilo; OH; alcoxi inferior incluido lineal, ramificado y cíclico; SH; alquiltio inferior incluido lineal, ramificado y cíclico; amino, alquilamino, dialquilamino, sililo incluido alquilsililo, alcoxisililo y arilsililo; nitro; ciano; carbonilo; ácido carboxílico, éster carboxílico, amida carboxílica; aminocarbonilo; aminoacilo; carbamato; urea; tiocarbamato; tiourea; cetona; sulfona; sulfonamida; arilo incluido fenilo, naftilo y antraceno; heteroarilo incluido heteroarilos de 5 miembros incluidos pirrol, imidazol, furano, tiofeno, oxazol, tiazol, isoxazol, isotiazol, tiadiazol, triazol, oxadiazol y tetrazol, heteroarilos de 6 miembros incluidos piridina, pirimidina, pirazina y heteroarilos fusionados incluidos benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, benzimidazol, indol, benzotiazol, benzisoxazol y benzisotiazol.

55 Las propiedades de R¹ y R² pueden modularse mediante la adición opcional de sustituyentes donadores de electrones o extractores de electrones. Por el término "grupo donador de electrones" se entiende un sustituyente que resulta en una disminución de la acidez del R¹R²CH; los grupos donadores de electrones se asocian, típicamente, con las constantes Hammett σ o Taft σ^* negativas y se conocen bien en la técnica de la química física orgánica física. (Las constantes Hammett se refieren a sustituyentes arilo/heteroarilo, las constantes Taft se refieren a sustituyentes en porciones no aromáticas.) Los ejemplos de sustituyentes donadores de electrones adecuados incluyen, pero no se limitan a alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio inferior, amino, alquiloamino, dialquiloamino y sililo. De manera similar, por "grupo extractor de electrones" se entiende un sustituyente que resulta en un aumento de la acidez del grupo R¹R²CH; los grupos extractores de electrones se asocian, típicamente, con las constantes Hammett σ o Taft σ^* positivas y se conocen bien en la técnica de la química orgánica física. Los ejemplos de sustituyentes extractores de electrones adecuados incluyen, pero no se limitan a halógeno, difluorometilo, trifluorometilo, nitro, ciano, C(=O)-R^X, en donde R^X es H, alquilo inferior, alcoxi inferior, o amino, o S(O)_mR^Y, en donde m = 1-2 y R^Y es alquilo, arilo o heteroarilo inferior. Como se conoce bien en

la técnica, la influencia electrónica de un grupo sustituyente puede depender de la posición del sustituyente. Por ejemplo, un sustituyente alcoxi en la posición orto o para de un anillo arilo es donador de electrones y se caracteriza por una constante Hammett σ negativa, mientras que un sustituyente alcoxi en la posición meta de un anillo arilo es extractor de electrones y se caracteriza por una constante Hammett σ positiva. A continuación, se dan los valores de las constantes Hammett σ y Taft σ^* .

Sustituyente	$\sigma(\text{meta})$	$\sigma(\text{para})$	σ
h	0,00	0,00	0,49
CH ₃	-0,07	-0,17	0
C ₂ H ₅	-0,07	-0,15	-0,10
n-C ₃ H ₇	-0,07	-0,13	-0,115
i-C ₃ H ₇	-0,07	-0,15	-0,19
n-C ₄ H ₉	-0,08	-0,16	-0,13
t-C ₄ H ₉	-0,10	-0,20	-0,30
H ₂ C=CH	0,05	-0,02	0,56
C ₆ H ₅	0,06	-0,01	0,60
CH ₂ Cl	0,11	0,12	1,05
CF ₃ ;	0,43	0,54	2,61
-CN	0,56	0,66	3,30
CHO	0,35	0,42	
COCH ₃	0,38	0,50	1,65
CO ₂ H	0,37	0,45	2,08
Si(CH ₃) ₃	-0,04	-0,07	-0,81
CH ₂ Si(CH ₃) ₄	-0,16	-0,22	-0,25
f	0,34	0,06	3,21
Cl	0,37	0,23	2,96
Br	0,39	0,23	2,84
i	0,35	0,18	2,46
-OH,	0,12	-0,37	1,34
OCH ₃	0,12	-0,27	1,81
OCH ₂ CH ₃	0,10	-0,24	1,68
OCF ₃	0,40	0,35	
SH	0,25	0,15	1,68
SCH ₃	0,15	0,00	1,56
NO ₂	0,71	0,78	4,0
No	0,62	0,91	
NH ₂	-0,16	-0,66	0,62
NHCHO	0,19	0,00	
NHCOCH ₃	0,07	-0,15	1,40
N(CH ₃) ₂	-0,15	-0,83	0,32
N ⁺ CH ₃	0,88	0,82	4,55
CCL ₃	0,47		2,65

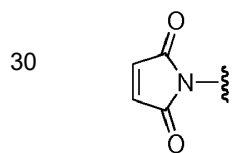
Sustituyente	$\sigma(\text{meta})$	$\sigma(\text{para})$	σ
CO ₂ CH ₃	0,32	0,39	2,00
CH ₂ NO ₂			1,40
CH ₂ CF ₃			0,92
CH ₂ OCH ₃			0,52
CH ₂ Ph		0,46	0,26
pH	0,06	-0,01	0,60

15 "Alquilo", "alqueniilo" y "alquinilo" incluyen grupos hidrocarburos lineales, ramificados o cíclicos de 1-8 carbonos o 1-6 carbonos o 1-4 carbonos en donde alquilo es un hidrocarburo saturado, alqueniilo incluye uno o más dobles enlaces carbono-carbono y alquinilo incluye uno o más triples enlaces carbono-carbono. A menos que se especifique de cualquier otra manera estos contienen 1-6C.

20 "Ariilo" incluye grupos hidrocarburos aromáticos de 6-18 carbonos, preferentemente 6-10 carbonos, incluidos los grupos tales como fenilo, naftilo y antraceniilo. "Heteroarilo" incluye anillos aromáticos que comprenden 3-15 carbonos que contienen al menos un átomo de N, O o S, preferentemente 3-7 carbonos que contienen al menos un átomo de N, O o S, incluidos los grupos tales como pirrolilo, piridilo, pirimidinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, quinolilo, indolilo, indenilo y similares.

25 "Halógeno" incluye fluoro, cloro, bromo y yodo.

"Maleimido" es un grupo de la fórmula

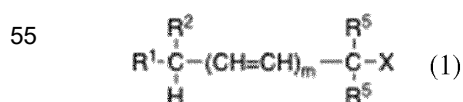


35 Los términos "proteína" y "péptido" se usan indistintamente independientemente de la longitud de cadena, y estos términos incluyen, además, pseudopéptidos que comprenden enlaces diferentes a los enlaces amida, tales como enlaces CH₂NH₂ así como también peptidomiméticos.

40 Los términos "ácidos nucleicos" y "oligonucleótidos" se usan indistintamente, además, independientemente de la longitud de cadena. Los ácidos nucleicos u oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios o pueden ser ADN, ARN o formas modificadas de estos con enlaces alterados, tales como fosfodiésteres, fosforamidatos y similares. Tanto para las proteínas como los ácidos nucleicos útiles como fármacos en la invención, estos términos incluyen, además, aquellas moléculas con cadenas laterales no encontradas en la naturaleza en el caso de proteínas y con bases no encontradas en la naturaleza en el caso de ácidos nucleicos.

45 Las moléculas pequeñas en el contexto de los fármacos es un término bien entendido en la técnica, y pretende incluir compuestos diferentes de proteínas y ácidos nucleicos ya sea que se sintetizan o se aíslan de la naturaleza y en general no se parecen a proteínas o ácidos nucleicos. Típicamente, tienen pesos moleculares <1000, aunque no es un nivel de corte específico reconocido. Sin embargo, el término se entiende bien en los campos de farmacología y medicina.

50 La presente invención proporciona reactivos de reticulación que comprenden una porción capaz de escindir-se mediante eliminación en condiciones fisiológicas y que comprenden, además, grupos reactivos capaces de formar enlaces covalentes con polímeros reactivos. En una modalidad, los reactivos de reticulación son de la fórmula (1)



60 en donde al menos uno de R¹, R², R⁵ se acopla a través de un primer grupo funcional a dicho uno o más polímeros y en donde X se acopla a dicho uno o más polímeros del hidrogel a través de un segundo grupo funcional, en donde m es 0 o 1;

en donde uno y solo uno de R¹ y R² puede ser H o puede ser alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

al menos uno o ambos R¹ y R² son independientemente CN; NO₂;

65 arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

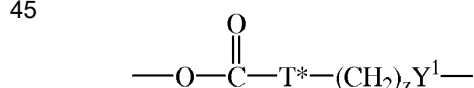
alqueno opcionalmente sustituido;
 alquino opcionalmente sustituido;
 COR³ o SOR³ o SO₂R³ en donde
 R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;
 5 arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
 heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u
 OR⁹ o NR₂⁹ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados
 junto con el nitrógeno al que se unen forman un anillo heterocíclico;
 SR⁴ en donde
 10 R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;
 arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o
 heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
 en donde R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y
 cada R⁵ es independientemente H o es alquilo, alquenalquilo, alquinalquilo, (OCH₂CH₂)_p O-alquilo en donde p=1-1000,
 15 arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido,

en donde X es un carbonato, un carbamato, tioéter, un éster o fenol opcionalmente sustituido en donde X se acopla al
 polímero a través de dicho segundo grupo funcional. Los reactivos de reticulación de la fórmula (1) comprenden una
 porción capaz de escindirse mediante eliminación en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, los hidrogeles formados
 20 mediante el uso de reactivos de reticulación de la fórmula (1) son biodegradables en condiciones fisiológicas. El
 mecanismo de eliminación es dependiente del pH y la temperatura del medio. Mientras que los reactivos de reticulación
 son estables frente a la escisión mediante la eliminación a bajo pH y temperatura, a valores de pH fisiológicos
 (aproximadamente 7,4) y temperatura (aproximadamente 37 °C) la eliminación se produce a una tasa que se controla
 principalmente por los grupos R¹ y R², y a un grado menor por los grupos R⁵.

Las tasas de la reacción de eliminación son predecibles en base a las estructuras de los grupos R¹, R², y R⁵. Los grupos
 R¹ y R² extractores de electrones aceleran la reacción de eliminación, mientras que los grupos R¹ y R² donadores de
 electrones retardan la reacción de eliminación, de manera que las tasas obtenidas pueden variarse para proporcionar
 30 enlazadores que tengan vidas medias para la eliminación de minutos a años. Los grupos R⁵ alquilo enlentecen la reacción
 de eliminación ligeramente en relación con los grupos R⁵ arilo. Mediante el cambio de los grupos R¹ y R² es posible, por
 lo tanto, controlar la tasa a la cual se produce la eliminación, y en consecuencia la tasa de biodegradación del hidrogel
 puede controlarse en un amplio intervalo. Por lo tanto, se espera que los hidrogeles formados mediante el uso de reactivos
 de reticulación de la fórmula (1) encuentren uso en aplicaciones donde se requiera una matriz de gel temporal, por
 ejemplo, como portadores o depósitos para el suministro de fármacos o como andamios temporales para la regeneración
 35 de tejidos.

Modalidades de X

X comprende un grupo funcional capaz de conectarse a un polímero reactivo y es susceptible, además, a la eliminación
 40 en condiciones fisiológicas. Típicamente, el ácido HX resultante tendrá un pK_a de 10 o menos, preferentemente un pK_a
 de 8 o menos. Los ejemplos de grupos X adecuados incluyen, por lo tanto, carbonatos, carbamatos, tioéteres, ésteres y
 fenoles opcionalmente sustituidos. En una modalidad de la invención, X es un carbonato activado tal como carbonato de
 succinimidilo, carbonato de sulfosuccinimidilo o carbonato de nitrofenilo. En otra descripción, X es un haluro de carbonilo
 tal como O(C=O)Cl o O(C=O)F. En otra modalidad de la invención, X es un carbamato de la fórmula

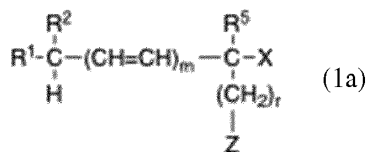


en donde T* es O, S o NR⁶ en donde R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo
 opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido y heteroarilalquilo opcionalmente sustituido; z es 1-6; y Y¹
 está ausente o es OR⁷ o SR⁷, en donde R⁷ es alqueno opcionalmente sustituido, fenileno opcionalmente sustituido o
 (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000 y Z² es un grupo funcional capaz de conectarse con un polímero reactivo, en donde Y¹
 se acopla a un polímero a través de dicho segundo grupo funcional (Z²). En una modalidad particular de la invención, Y¹ es
 55 (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000; o Y¹ es (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-100; o Y¹ es (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-10.

En otra modalidad, X es OR⁷ o SR⁷, en donde R⁷ es alqueno opcionalmente sustituido, fenileno opcionalmente sustituido
 o (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000, y Z² es un grupo funcional capaz de conectarse con un polímero reactivo.

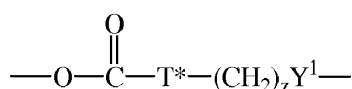
En determinadas modalidades, la invención proporciona reactivos de reticulación de la fórmula (1) en donde R⁵ es el
 sustituyente entre R¹, R² y R⁵ que comprende, además, un grupo funcional capaz de conectarse a un polímero. En
 modalidades más particulares, la invención proporciona reactivos de reticulación de la fórmula (1) en donde uno de R⁵
 comprende, además, un grupo funcional capaz de conectarse a un polímero y el otro R⁵ es H.

Por lo tanto, la invención proporciona reactivos de reticulación de la Fórmula (1a)



en donde m es 0-1; r es 2-8; y R¹, R², R⁵, m, X y Z son como se definió antes. En una modalidad más particular, la invención proporciona reactivos de reticulación de la fórmula (1a) en donde R⁵ es H. Incluso en una modalidad más particular, la invención proporciona reactivos de reticulación de la fórmula (1a) en donde R¹ es CN o R⁸SO₂, en donde R⁸ es alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido u OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al cual se unen forman un anillo heterocíclico; R² y R⁵ son H y m=0.

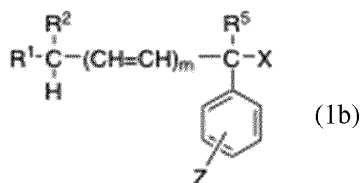
En otra modalidad, la invención proporciona reactivos de reticulación de la fórmula (1a) en donde X es de la fórmula



en donde T* es O, S o NR⁶ en donde R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido; z es 1-6; y Y¹ está ausente o es OR⁷ o SR⁷, en donde R⁷ es alquileo opcionalmente sustituido, fenileno opcionalmente sustituido o (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000, y Z² es un grupo funcional capaz de conectarse con un polímero reactivo. En una modalidad particular de la invención, Y¹ es (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000; o Y¹ es (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-100; o Y¹ es (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-10.

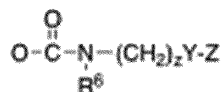
En otra modalidad de la invención, X es OR⁷ o SR⁷, en donde R⁷ es alquileo opcionalmente sustituido, fenileno opcionalmente sustituido o (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000, y Z² es un grupo funcional capaz de conectarse con un polímero reactivo.

En una modalidad, la invención proporciona reactivos de reticulación de la Fórmula (1b)



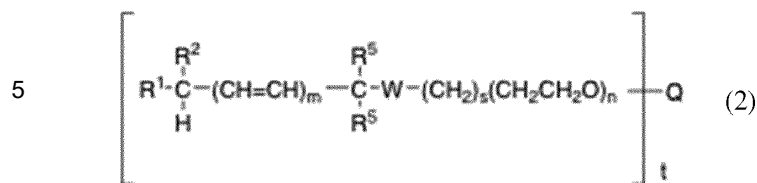
en donde m es 0-1 y R¹, R², R⁵, m, X y Z² son como se definió antes. En una modalidad más particular, la invención proporciona reactivos de reticulación de la fórmula (1b) en donde R⁵ es H. Incluso en una modalidad más particular, la invención proporciona reactivos de reticulación de la fórmula (1b) en donde R¹ es CN o R⁸SO₂, en donde R⁸ es alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, u OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al cual se unen forman un anillo heterocíclico; R² y R⁵ son H, y m=0.

Los métodos para la preparación de compuestos de la fórmula (1) en donde X es OH, Cl u O-succinimidilo se han descrito anteriormente en las publicaciones de patentes WO2009/158668, WO2011/140393 y WO2011/140392. Los compuestos de la fórmula (1) en donde X es un carbamato de la fórmula



pueden prepararse a partir de compuestos de la fórmula (1) en donde X es Cl u O-succinimidilo mediante la reacción con aminas de la fórmula R⁶-NH-(CH₂)₂Y-Z² mediante el uso de los métodos ilustrados en los ejemplos de trabajo más adelante.

En otra modalidad de la invención, se proporcionan reactivos de reticulación multivalentes de la Fórmula (2)



en donde al menos dos de dichos R¹, R², R⁵ se acoplan a través de grupos funcionales a dicho uno o más polímeros;

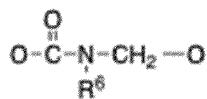
m y R¹, R² y R⁵ se definen como en el párrafo (a);

n es 1-1000;

s es 0-2;

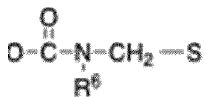
t es 2, 4, 8, 16 o 32,

W es O(C=O)O, O(C=O)NH, O(C=O), S,



20

o



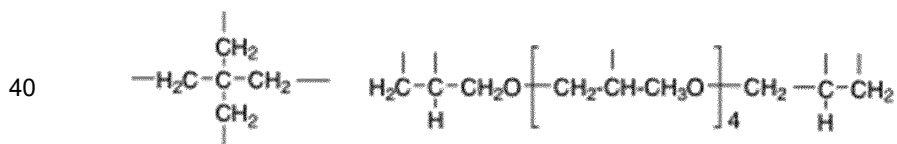
25

y

Q es un grupo núcleo que tiene una valencia=t, en donde t=2, 4, 8, 16, o 32,

en donde R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido.

El grupo núcleo Q es un grupo de valencia=t que conecta los múltiples brazos del reactivo de reticulación. Los ejemplos típicos de Q incluyen C(CH₂)₄ (t=4), en donde el reactivo de múltiples brazos se prepara en base a un núcleo de pentaeritritol; (t=8), en donde el reactivo de múltiples brazos se prepara en base a un núcleo de hexaglicerina; y (t=8), en donde el reactivo de múltiples brazos se prepara en base a un núcleo de tripentaeritritol.

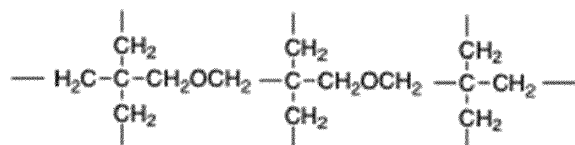


40

pentaeritritol

hexaglicerina

45



50

tripentaeritritol

Los compuestos de la fórmula (2) pueden prepararse mediante la reacción de un polietilenglicol de múltiples brazos con un reactivo de la fórmula (1). Una variedad de polietilenglicoles de múltiples brazos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de NOF Corporation y JenKem Technologies.

En una modalidad particular de la invención, t es 4. En otra modalidad de la invención, t es 8.

60

Preparación de hidrogeles

En otro aspecto la invención proporciona métodos para preparar hidrogeles biodegradables que comprenden ya sea poner en contacto simultáneamente o secuencialmente al menos un polímero reactivo y un compuesto reticulante escindible en donde dicho compuesto reticulante escindible comprende un grupo funcional que reacciona con el polímero reactivo y una porción que se escinde mediante eliminación en condiciones fisiológicas.

65

En una modalidad de la invención, los hidrogeles biodegradables se forman mediante la reacción de un polímero reactivo único y un compuesto reticulante escindible en donde dicho compuesto reticulante escindible comprende un grupo funcional que reacciona con el polímero reactivo y una porción que incluye, además, un grupo funcional que reacciona con un polímero reactivo que se escinde mediante eliminación en condiciones fisiológicas. En esta modalidad, el polímero reactivo tendrá múltiples valencias, para permitir formación de nódulos en la matriz de hidrogel tridimensional. Como una ilustración de este método, un PEG de múltiples brazos en donde cada brazo termina con un grupo funcional reactivo Z^3 como se define más adelante se deja reaccionar con un reactivo reticulante de la fórmula (1) o (2) para formar un hidrogel. Los PEG de múltiples brazos están disponibles comercialmente en una variedad de tamaños y con una variedad de grupos funcionales reactivos, por ejemplo, de NOF Corporation y JenKem Technologies. Como otra ilustración de este método, un polímero lineal que comprende múltiples copias de un grupo funcional reactivo Z^3 se deja reaccionar con un reactivo reticulante de la fórmula (1) o (2) para formar un hidrogel. Las ilustraciones de tales polímeros lineales que comprenden múltiples grupos Z^3 son ácido hialurónico, carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, poli(2-hidroxietil metacrilato), dextrano, colágeno, quitosano, alginato y agarosa.

En otra modalidad la invención proporciona métodos para la formación de hidrogeles biodegradables a través de la reacción de un primer polímero reactivo, un segundo polímero reactivo, y un compuesto reticulante escindible que comprende un primer grupo funcional que reacciona con el primer polímero reactivo, un segundo grupo funcional que reacciona con el segundo polímero, y una porción que se escinde mediante eliminación en condiciones fisiológicas. Los grupos funcionales primero y segundo pueden ser iguales o diferentes. Para la formación de una red de gel tridimensional los componentes reactivos (primer polímero reactivo, segundo polímero reactivo si lo hay) tendrán múltiples brazos y sirven, por lo tanto, para formar nódulos en la matriz de gel. En modalidades preferidas de la invención, este componente reactivo formador de nódulos comprende al menos 3 brazos y con mayor preferencia al menos 4 brazos.

En cada modalidad los polímeros reactivos pueden ser polietilenglicoles homopoliméricos o copoliméricos, polipropilenglicoles, poli(N-vinilpirrolidona), polimetacrilatos, polifosfacenos, poliláctidos, poli(acrilamidas), poliglicolatos, polietileniminas, agarosas, dextranos, gelatinas, colágenos, polilisinas, quitosanos, alginatos, hialuronanos, pectinas o carrageninas que comprenden funcionalidades reactivas adecuadas en su estado nativo o se han derivado para que comprendan funcionalidades reactivas adecuadas. Las funcionalidades reactivas adecuadas típicas incluyen maleimidas, tioles o tioles protegidos, alcoholes, acrilatos, acrilamidas, aminas o aminas protegidas, ácidos carboxílicos o ácidos carboxílicos protegidos, azidas, alquinos incluidos cicloalquinos, 1,3-dienos incluidos ciclopentadienos y furanos, alfa-halocarbonilos, y N-hidroxisuccinimida o ésteres o carbonatos de N-hidroxisulfosuccinimida. Los polímeros nativos que no comprenden una multiplicidad eficaz de grupos reactivos pueden transformarse mediante la reacción con reactivos que introducen una multiplicidad eficaz de grupos reactivos antes de la formación del hidrogel.

En algunas modalidades, los polímeros incluyen estructuras ramificadas multivalentes de la fórmula $[Z^3-(CH_2)_s-(CH_2CH_2O)_n]_tQ$, en donde Z^3 es un grupo funcional reactivo seleccionado de las opciones expuestas anteriormente para Z^1 y Z^2 , s es 0-2, Q es un grupo núcleo multivalente que tiene valencia t, en donde t es 2, 4, 8, 16 o 32. El valor de n puede ser 10-1000 o valores intermedios tales como 20, 50, 100, etc. Este listado pretende incluir todos los enteros intermedios entre 10 y 1000.

Las reacciones formadoras de gel pueden realizarse en una variedad de solventes adecuados, por ejemplo, agua, alcoholes, acetonitrilo, o tetrahidrofurano y se realizan, preferentemente, en medio acuoso.

La formación de los hidrogeles puede realizarse por etapas o de manera concertada. Por lo tanto, en una modalidad de la invención, un primer polímero reactivo se deja reaccionar con un reactivo de reticulación de la fórmula (1) o (2) para formar una combinación intermedia no reticulada, que se aísla opcionalmente. Esta combinación no reticulada después se deja reaccionar con el segundo polímero reactivo para formar el gel reticulado final. En otra modalidad de la invención, el primer polímero reactivo, el segundo polímero reactivo, y el reactivo de reticulación de la fórmula (1) o (2) se combinan y se dejan reaccionar y forman el hidrogel en una operación única.

En una modalidad, la invención proporciona métodos para la formación de hidrogeles mediante la reticulación de un polímero con un reactivo de reticulación de la fórmula (1). En dependencia de la funcionalidad presente, el polímero puede estar en su estado nativo o puede derivarse primero mediante el uso de métodos conocidos en la técnica para introducir la funcionalidad que tiene reactividad cruzada con la funcionalidad en el compuesto de la fórmula (1). En esta modalidad, los dos grupos funcionales capaces de reaccionar con un polímero en el compuesto de la Fórmula (1) son típicamente los mismos. Un ejemplo de esta modalidad se ilustra en la figura 1. Como se muestra, un agente reticulante escindible de la Fórmula (1) con dos grupos funcionales azida reticula un polímero de 4 brazos con grupos funcionales ciclooctino. Los geles alternativos con otras modalidades como se mencionó anteriormente para Z^1 , Z^2 y Z^3 se preparan para proporcionar resultados similares o idénticos.

En otra modalidad, la invención proporciona métodos para la formación de hidrogeles mediante la reticulación de dos polímeros sustituidos de manera diferente uno de los cuales comprende un agente reticulante susceptible a la eliminación. Dos ejemplos de esta modalidad se ilustran en la figura 2. El panel A muestra la reticulación de un primer polímero de 4 brazos en donde cada brazo termina con un ciclooctino (CO) con un segundo polímero de 4 brazos en donde cada brazo termina con un compuesto enlazador de eliminación beta-azida de la fórmula (1) (L_2-N_3) que es, por lo tanto, un compuesto

de 4 brazos de la Fórmula (2). El hidrogel 4x4 resultante comprende un enlazador de eliminación beta en cada enlace. El gel contiene, por lo tanto, nódulos alternos derivados del polímero de 4 brazos y de la Fórmula (2).

5 Como se ilustra en el panel B, este método puede usar, además, polímeros con un mayor número de brazos. Como se muestra, algunos de los brazos del polímero de 8 brazos pueden derivarse a un fármaco a través del acoplamiento a un compuesto de la fórmula (3) mostrada más adelante. Además, o en lugar de, uno o más de los brazos pueden acoplarse a un compuesto marcador, tal como un colorante fluorescente para evaluar la tasa de desintegración del gel como una función de las condiciones ambientales y/o como una función de la naturaleza de R^1 , R^2 y/o R^5 . Esta "sonda de erosión" permite el diseño de geles con tasas de desintegración deseadas.

10 En un aspecto de tal diseño, un fármaco puede incluirse simplemente en los poros del gel mediante la formación del gel en la presencia del fármaco y la tasa de suministro del fármaco se controla mediante la selección apropiada de sustituyentes en los compuestos de reticulación que dan como resultado la formación del gel.

15 También pueden prepararse geles que contienen fármaco tanto incluido en los poros como acoplado al polímero a través de un enlace como se muestra en la fórmula (3) más adelante. Las tasas de liberación desde el enlace y desde los poros también pueden compararse.

20 En la tercera alternativa, el fármaco puede suministrarse simplemente en la forma de la fórmula (3) de manera que la tasa de liberación desde el gel se determina únicamente mediante la reacción de eliminación del fármaco del gel.

25 En otro aspecto, la invención proporciona hidrogeles que se forman de acuerdo con los métodos anteriores. Estos hidrogeles pueden comprender una variedad de polímeros hidrófilos, incluidas como se describió anteriormente las formas nativas o modificadas de polietilenglicoles, polipropilenglicoles, poli(N-vinilpirrolidona), polimetacrilatos, polifosfacenos, poliláctidos, poliácridamidas, poliglicolatos, polietileniminas, agarosas, dextranos, gelatinas, colágenos, polilisinas, quitosanos, alginatos, hialuronanos, pectinas, carrageninas, o los polímeros de múltiples brazos ilustrados y se caracterizan por su reticulación que incluye al menos una porción capaz de escindirse mediante eliminación en condiciones fisiológicas. Estos hidrogeles son, por lo tanto, biodegradables a través de un proceso dependiente de pH.

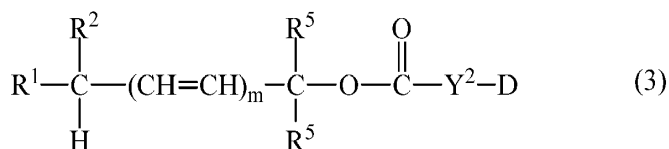
30 A través de la selección apropiada de reactivos y estequiometrías, puede determinarse el tamaño del poro de los hidrogeles resultantes. Los hidrogeles de la invención pueden ser microporosos, mesoporosos, o macroporosos y pueden tener un intervalo de tasas de biodegradación que se determinan por la naturaleza de los reactivos de reticulación usados en su preparación.

35 Los hidrogeles de la invención pueden comprender, además, grupos reactivos residuales que no se consumen en el proceso de gelificación, ya sea a través de la estequiometría seleccionada, a través de la reticulación incompleta o a través de la incorporación de grupos funcionales que no participan en el proceso de gelificación debido a la reactividad ortogonal. Estos grupos reactivos residuales pueden usarse para modificar aún más el hidrogel resultante, por ejemplo, mediante la unión covalente de fármacos o profármacos. En una modalidad de la invención, los grupos reactivos residuales se usan para unir profármacos que comprenden un fármaco unido a un enlazador que posteriormente libera el fármaco desde la matriz de hidrogel. En una modalidad más particular de la invención, la liberación del fármaco desde la matriz de hidrogel se produce mediante un mecanismo de eliminación. El uso de enlazadores de eliminación para la conjugación de fármacos se describe, por ejemplo, en las publicaciones PCT WO2009/158668 y WO2011/140393.

45 Una modalidad de hidrogeles degradables de liberación de fármacos de la invención se ilustra en la figura 2B y se ejemplifica en los Ejemplos de trabajo 29 y 33 más adelante. La reacción de un subconjunto de los grupos funcionales en un primer polímero con un enlazador-fármaco liberable, en donde el enlazador comprende un primer grupo modulador que controla la tasa de liberación del fármaco, proporciona un polímero cargado de fármaco intermedio; los grupos funcionales residuales se hacen reaccionar con un reactivo de reticulación de la fórmula (1) o (2) que comprende un segundo grupo modulador que controla la tasa de la degradación del hidrogel para proporcionar un hidrogel degradable cargado de fármaco. Mediante la selección apropiada de los grupos moduladores presentes en el enlazador de fármacos y en el reactivo de reticulación, pueden controlarse las tasas de liberación de fármacos y de degradación del hidrogel. En un método de la invención, el primer polímero se trata con el enlazador-fármaco en una primera etapa; el polímero cargado de fármaco intermedio se aísla opcionalmente; y el hidrogel se forma mediante la reacción con el reactivo reticulante es una etapa separada. En un segundo método de la invención, el primer polímero, enlazador-fármaco y el reactivo reticulante se combinan en una etapa única. Si todas las funcionalidades reactivas en los polímeros no se consumen ya sea mediante la conexión al enlazador-fármaco o la reticulación, las funcionalidades en exceso pueden bloquearse opcionalmente mediante la reacción con reactivos adecuados. Por ejemplo, el exceso de ciclooctinos puede bloquearse mediante la reacción con PEG-azidas cortas tales como azido-heptaetilenglicol.

60 Por lo tanto, en una modalidad de la invención, se proporciona un método para formar hidrogeles degradables de liberación de fármacos que consiste en las etapas de:

(a) hacer reaccionar un primer polímero multivalente que comprende funcionalidades reactivas con una cantidad subestequiométrica de un enlazador-fármaco que tiene la fórmula (3)



en donde m, R¹, R², y R⁵ pueden tener las modalidades enumeradas para estas en las Fórmulas (1) y (2) aunque, por supuesto, seleccionadas independientemente, de manera que un gel que contiene ambos residuos de la fórmula (1) o (2) y la Fórmula (3) no necesita comprender los mismos sustituyentes de estas notaciones, D es el residuo de un fármaco y Y², en este caso, es NH o NBCH₂, en donde B es H, alquilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido, en donde al menos uno de R¹, R², R⁵ se sustituye con un grupo funcional que corresponde a Z¹ comprendido por el reactivo Y² con un grupo funcional en el primer polímero;

para formar un primer polímero cargado de fármaco;

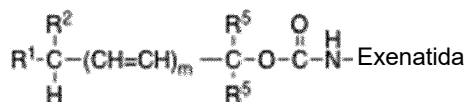
(b) aislar opcionalmente el primer polímero cargado de fármaco; y

(c) reticular las funcionalidades reactivas restantes en el primer polímero cargado de fármaco con un compuesto de la fórmula (1) o fórmula (2) para formar un hidrogel.

La preparación de enlazador-fármacos de la fórmula (3) se detalla en las publicaciones PCT WO2009/158668 y WO/2011/140393.

El fármaco D unido puede ser una molécula pequeña o un polipéptido, incluidos péptidos y proteínas. El Ejemplo de trabajo 32 más adelante detalla la preparación de un hidrogel degradable de liberación de fármacos en donde D es la exenatida peptídica, que tiene la secuencia: H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂(sec. con núm. de ident.:1).

En una modalidad de la invención, el péptido exenatida se acopla al enlazador mediante un grupo amina para proporcionar

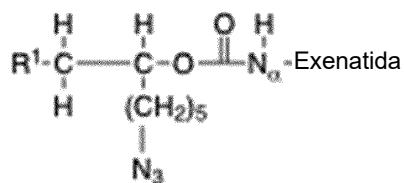


en donde R¹, R², R⁵, y m son como se definieron para la fórmula (3) anterior. En determinadas modalidades, m = 0, R² es H, un R⁵ es H, y el otro R⁵ es (CH₂)_nY en donde n = 1-6 o CH₂(OCH₂CH₂)_pY en donde p = 1-1000 y Y es un grupo que comprende un grupo N₃, SH, S^tBu, maleimida, 1,3-dieno, ciclopentadieno, furano, alquino, ciclooctino, acrilato, acrilamida, vinil sulfona o vinil sulfonamida. En determinadas modalidades de la invención, R¹ es CN o SO₂R³, en donde R³ es alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, OR⁹, o N(R⁹)₂, en donde cada R⁹ es independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y en donde N(R⁹)₂ puede formar un anillo heterocíclico. El enlazador puede acoplarse a cualquier grupo amino libre en el péptido, es decir, la amina N-terminal o cualquier amina de cadena lateral tal como los grupos épsilon amino de lisina.

En una modalidad específica de la invención, el enlazador-fármaco de la fórmula (3) comprende un grupo azida reactivo en un R⁵. Una cantidad subestequiométrica del enlazador-fármaco se hace reaccionar, por lo tanto, con un polímero de múltiples brazos que comprende grupos ciclooctino reactivos en el extremo de cada brazo. Los ejemplos de grupos ciclooctino reactivos incluyen los eficaces en reacciones de cicloadición 1,3-dipolar libres de cobre con azidas, incluidos por ejemplo dibenzociclooctinos, dibenzoazaciclooctinos (DBCO), difluorociclooctinos (DIFO), ciclooctinos bicíclicos lineales tales como biciclónoninas (BCN).

En una modalidad de la invención, el primer polímero comprende al menos 8 brazos, cada brazo que termina con un grupo funcional reactivo. Como se muestra en la figura 2B, se usan 3 brazos del primer polímero para reticular compuestos de la Fórmula (1) o (2). En una modalidad preferida de la invención, se usan al menos 4 brazos del primer polímero para reticular compuestos de la Fórmula (1) o (2). Por lo tanto, la cantidad subestequiométrica del enlazador-fármaco usado puede estar en el intervalo de 0,01 a 5 equivalentes molares en relación con el primer polímero, lo que conduce a cargar de 0,01 a 5 moléculas de un fármaco D por primer polímero de 8 brazos. En una modalidad de la invención, la cantidad subestequiométrica del enlazador-fármaco usado puede estar en el intervalo de 0,1 a 5 equivalentes molares en relación con el primer polímero. En otra modalidad de la invención, la cantidad subestequiométrica del enlazador-fármaco usado puede estar en el intervalo de 1 a 5 equivalentes molares en relación con el primer polímero.

Por lo tanto, en determinadas modalidades de la invención, un hidrogel degradable de liberación de exenatida se prepara mediante la reacción de un primer polímero multivalente que comprende un grupo ciclooctino en el extremo de cada brazo con una cantidad subestequiométrica de un enlazador-fármaco de la Fórmula (4)



(4)

5

10

15

20

25

en donde $R^1 = \text{CN}$; NO_2 ;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

alqueno opcionalmente sustituido;

alquino opcionalmente sustituido;

COR^3 o SOR^3 o SO_2R^3 en donde

R^3 es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u

OR^9 o NR^9_2 en donde cada R^9 es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R^9 tomados junto con el nitrógeno al cual se unen forman un anillo heterocíclico; o SR^4 en donde

R^4 es alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

para formar un primer polímero cargado con exenatida, el cual se aísla opcionalmente, por ejemplo, mediante precipitación, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico, u otros métodos conocidos en la técnica.

En modalidades específicas de la invención, R^1 en la Fórmula (4) es CN o SO_2R^3 .

30

El primer polímero cargado con exenatida se hace reaccionar después con un compuesto escindible de la fórmula (1) o (2) para formar el hidrogel degradable de liberación de exenatida. En determinadas modalidades de la invención, el primer polímero de liberación de exenatida es un polietilenglicol de 8 brazos, y el compuesto escindible usado para la formación del hidrogel es un compuesto de la Fórmula (2). En determinadas modalidades de la invención, el compuesto escindible usado para la formación del hidrogel es un compuesto de la Fórmula (2) en donde m es 0, n es 10-150, s es 0, t es 4, y Q es $\text{C}(\text{CH}_2)_4$.

35

Como se describió anteriormente, las tasas de liberación de fármacos y de degradación del hidrogel se controlan principalmente mediante la selección de los grupos R^1 y R^2 en los enlazadores de fármaco y en los agentes reticulantes, respectivamente. La tasa de liberación de fármacos seleccionada se determina, típicamente, mediante las farmacocinéticas deseadas del fármaco, por ejemplo, las concentraciones máximas y/o mínimas del fármaco libre durante la administración, como se ha descrito en Santi y otros PNAS (2012) (presentada) y en la solicitud PCT pendiente (presentada el 7 de septiembre de 2012) (número de expediente del abogado 670573000540). Los grupos R^1 y R^2 en los compuestos de la fórmula (I) y (II) se seleccionan después para proporcionar la tasa óptima de degradación del hidrogel para suministrar la cantidad necesaria de fármaco libre durante la administración mientras que se minimiza el tiempo de vida del hidrogel degradable en el cuerpo.

40

45

En otra modalidad de la invención, los hidrogeles degradables de liberación de fármacos se preparan mediante un método en donde un primer polímero de múltiples brazos en donde cada brazo termina en un grupo que comprende al menos dos grupos funcionales ortogonales se hace reaccionar con un enlazador-fármaco de la fórmula (3) en donde el enlazador-fármaco comprende un grupo funcional que reacciona solo con uno de los grupos funcionales ortogonales presentes en el primer polímero. El grupo funcional ortogonal restante en el primer polímero cargado de fármaco resultante se usa para formar un hidrogel mediante la reacción con un compuesto de la fórmula (1) o (2) en donde estos compuestos comprenden un grupo funcional que reacciona solo con uno de los grupos funcionales ortogonales restantes presentes en el primer polímero cargado de fármaco. Este método es ventajoso porque debe proporcionar hidrogeles degradables de liberación de fármacos de estructura más regular que los formados mediante el control estequiométrico de los componentes. Este método se ilustra en el Ejemplo de trabajo 37 más abajo. El primer polímero de múltiples brazos en donde cada brazo termina con un grupo que comprende al menos dos grupos funcionales ortogonales puede prepararse a partir de polímeros de múltiples brazos en donde cada brazo termina con un grupo funcional único mediante condensación con un adaptador multifuncional apropiado. Esto se ilustra en la Figura 11.

50

55

60

Lo hidrogeles de la invención pueden prepararse *in vitro*, y después se implantan según se requiera. Los geles pueden moldearse en formas específicas, o pueden prepararse como suspensiones microparticuladas o microesféricas para inyección. Alternativamente, los hidrogeles pueden formarse mediante gelificación *in situ*, en cuyo caso se preparan formulaciones farmacéuticamente aceptables de los componentes de hidrogel; la mezcla de los componentes se sigue mediante inyección o aplicación antes de la gelificación. La inyección puede ser subcutánea, intramuscular, intraocular, intratumoral o intravenosa. Los hidrogeles de la invención pueden aplicarse tópicamente, por ejemplo, mediante gelificación *in situ* de los componentes mezclados después de la aplicación a la piel o a heridas quirúrgicas. Lo hidrogeles de la invención pueden aplicarse, además, como revestimientos en dispositivos médicos o apósitos quirúrgicos.

65

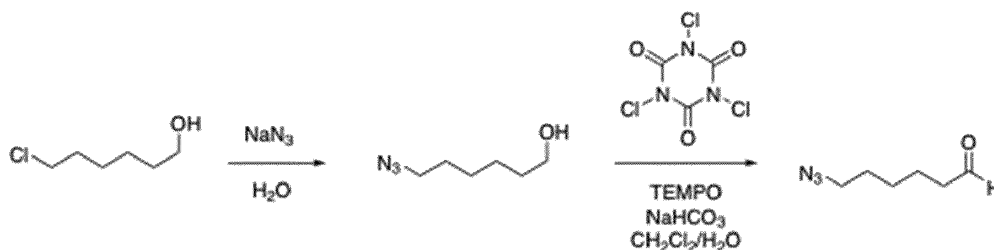
Todas las referencias mencionadas en la presente descripción se incorporan en su totalidad como referencia. La invención se ilustra adicionalmente pero no se limita por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

5

Preparación de 6-Azidohexanal

10



15

(1) 6-Azido-1-hexanol: una mezcla de 6-cloro-1-hexanol (25 g, 183 mmol) y azida sódica (32,5 g, 500 mmol) en 200 ml de agua se calentó a reflujo durante 20 h, después se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron para obtener el producto como un aceite amarillo pálido (28,3 g).

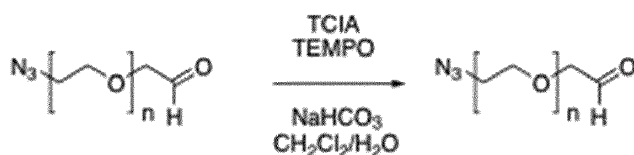
20

(2) 6-Azido-1-hexanal: Se añadió ácido tricloroisocianúrico sólido (4,3 g) en pequeñas porciones a una mezcla vigorosamente agitada de 6-azido-1-hexanol (7,15 g), TEMPO (50 mg), y bicarbonato de sodio (5,0 g) en diclorometano (100 ml) y agua (10 ml). La mezcla se agitó durante unos 30 minutos adicionales después de la adición, después se filtró a través de una almohadilla de Celite. La fase orgánica se separó y se lavó sucesivamente con NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera, después se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró para proporcionar el producto (5,8 g), el cual se usó sin purificación adicional.

25

Ejemplo 2.

30

Preparación de ω -Azido-PEG-Aldehídos

35

Se añadió ácido tricloroisocianúrico sólido (60 mg) a una mezcla vigorosamente agitada de O-(2-azidoetil) heptaetilenglicol ($n=7$; 250 mg), 1 mg de TEMPO, 100 mg de NaHCO_3 , 2 ml de CH_2Cl_2 y 0,2 ml de agua. La mezcla se volvió naranja, y después de aproximadamente 30 minutos se formó una suspensión blanca. El análisis por TLC (1:1 acetona/hexano) indica la formación de un producto que se tiñó con ácido fosfomolibdico. La mezcla se diluyó con 10 ml de CH_2Cl_2 , se secó mediante agitación con MgSO_4 , se filtró y se evaporó para obtener el producto crudo. Este se disolvió en CH_2Cl_2 y se cargó en una columna 4-gm de gel de sílice equilibrada en hexano, que se eluyó secuencialmente con 25 ml de cada uno de hexano, hexano/acetona 75:25, hexano/acetona 50:50 y hexano/acetona 25:75. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para proporcionar el producto purificado.

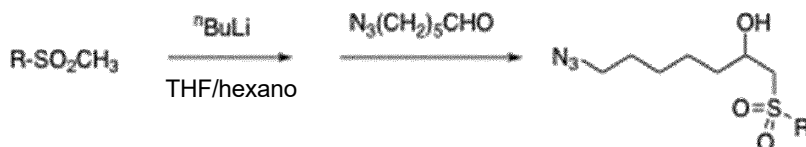
40

45

Ejemplo 3.

50

Preparación de azidoalcoholes



55

Una solución 1,6 M de n -butyllitio (3,1 ml, 5,0 mmol) en hexano se añadió gota a gota a una solución agitada de $\text{R-SO}_2\text{CH}_3$ (5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF) (15 ml) enfriado a -78°C . Después de la adición, el baño de enfriamiento se eliminó y la mezcla se dejó calentar lentamente a 0°C durante aproximadamente 30 min. La mezcla después se volvió a enfriar a -78°C y se añadió 6-azido-1-hexanal (5,5 mmol). Después de agitar durante 15 minutos, el baño de enfriamiento se eliminó y la mezcla se dejó calentar. En el punto donde la mezcla se vuelve transparente, se añadió 5 ml de NH_4Cl acuoso saturado y la mezcla se dejó que continuara calentándose a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó sucesivamente con agua y salmuera, y después se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó para proporcionar el producto crudo como un aceite. La cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de acetato de etilo en hexano proporcionó los productos purificados.

60

65

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

1-(4-(trifluorometil)fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptanol: a partir de 4-(trifluorometil)fenil metil sulfona (1,73 g, 94 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8,08 (2H, d, $J=8,4\text{-Hz}$), 7,87 (2H, d, $J=8,4\text{-Hz}$), 4,21 (1H, m), 3,25 (2H, t, $J=6,8\text{-Hz}$), 3,28 (1H, dd, $J=8,8, 14,4\text{-Hz}$), 3,20 (1H, dd, $J=2,0, 14,4\text{-Hz}$), 3,12 (1H, d, $J=2,8\text{-Hz}$), 1,58 (2H, m), 1,5-1,3 (6H, m);

1-(4-clorofenilsulfonyl)-7-azido-2-heptanol; a partir de 4-clorofenil metil sulfona; aceite incoloro (1,49 g, 90 % de rendimiento): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_6\text{-DMSO}$): δ 7,90 (2H, d, $J=8,8\text{-Hz}$), 7,70 (2H, d, $J=8,8\text{-Hz}$), 4,83 (1H, d, $J=6\text{-Hz}$), 3,86 (1H, m), 3,39 (2H, m), 3,29 (2H, t, $J=6,8\text{-Hz}$), 1,2-1,5 (8H, m);

1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptanol; a partir de fenil metil sulfona; aceite amarillo pálido (1,25 g, 85 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_6\text{-DMSO}$): δ 7,89 (2H, m), 7,72 (1H, m), 7,63 (2H, m), 4,84 (1H, d $J=6\text{-Hz}$), 3,86 (1H, m), 3,33 (2H, m), 3,28 (2H, t, $J=6,8\text{-Hz}$), 1,47 (2H, m), 1,2~1,4 (6H, m);

1-(4-metilfenilsulfonyl)-7-azido-2-heptanol; a partir de 4-(metilsulfonyl)tolueno; aceite incoloro (1,39 g, 85 % de rendimiento): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_6\text{-DMSO}$): δ 7,76 (2H, d, $J=6,4\text{-Hz}$), 7,43 (2H, d, $J=6,4\text{-Hz}$), 4,82 (1H, d, $J=6\text{-Hz}$), 3,85 (1H, m), 3,31 (2H, m), 3,28 (2H, t, $J=6,8\text{-Hz}$), 2,41 (3H, s), 1,4-1,5 (2H, m), 1,2-1,4 (6H, m);

1-(4-metoxifenilsulfonyl)-7-azido-2-heptanol; a partir de 4-metoxifenil metil sulfona (1,53 g, 94 % de rendimiento): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,85 (2H, d, $J=8,8\text{-Hz}$), 7,04 (2H, d, $J=8,8\text{-Hz}$), 4,13 (1H, m), 3,90 (3H, s), 3,24 (2H, t, $J=6,8\text{-Hz}$), 3,20 (1H, dd, $J=8,8, 14,4\text{-Hz}$), 3,14 (1H, dd, $J=2,4, 14,4\text{-Hz}$), 2,47 (3H, s), 1,57 (2H, m), 1,5~1,3 (6H, m);

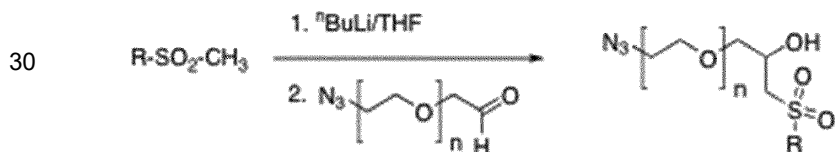
1-(2,4,6-trimetilfenilsulfonyl)-7-azido-2-heptanol; a partir de (2,4,6-trimetil)fenil metil sulfona (1,30 g de reacción 4,0 mmol; 96 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6,99 (2H, s), 4,30 (1H, m), 3,49 (1H, d, $J=2\text{-Hz}$), 3,25 (2H, t, $J=6,8\text{-Hz}$), 3,18 (1H, d, $J=1\text{-Hz}$), 3,17 (1H, s), 2,66 (6H, s), 2,31 (3H, s), 1,59 (2H, m), 1,5~1,3 (6H, m);

1-(morfolinosulfonyl)-7-azido-2-heptanol; a partir de 1-morfolino metilsulfonamida (1,36 g de reacción 10 mmol, 89 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_6\text{-DMSO}$): δ 4,99 (1H, d, $J=6,4\text{ Hz}$), 3,88 (1H, m), 3,62 (4H, t, $J=4,8\text{-Hz}$), 3,32 (2H, t, $J=6,8\text{-Hz}$), 3,20~3,15 (6H, solapamiento), 1,53 (2H, m), 1,46~1,25 (6H, m); y

1-(metilsulfonyl)-7-azido-2-heptanol; a partir de dimetilsulfona; aceite incoloro (880 mg, 75 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_6\text{-DMSO}$).

25 Ejemplo 4:

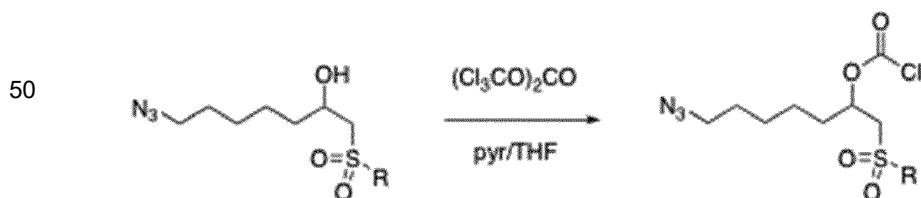
Preparación de azidoalcoholes



35 Una solución de n-butilitio 1,6 M (3,1 ml, 5,0 mmol) en hexano se añade gota a gota a una solución agitada de $\text{R-SO}_2\text{CH}_3$ (5,0 mmol) en tetrahidrofuran anhidro (THF) (15 ml) enfriado a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Después de la adición, el baño de enfriamiento se elimina y la mezcla se deja calentar lentamente a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 30 min. La mezcla después se volvió a enfriar a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ y se añade ω -azido-heptaetilenglicol aldehído ($n=7$, 1,2 g). Después de agitar durante 15 minutos, el baño de enfriamiento se elimina y la mezcla se deja calentar. En el punto donde la mezcla se vuelve transparente, se añade 5 ml de NH_4Cl acuoso saturado y la mezcla se deja que continúe calentándose a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con acetato de etilo y se lava sucesivamente con agua y salmuera, y después se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora para proporcionar el producto crudo. La cromatografía en gel de sílice proporciona los productos purificados.

45 Ejemplo 5:

Preparación de cloroformatos de azido-enlazador



55 Se añadió piridina (160 μl) gota a gota a una solución agitada del azidoalcohol del Ejemplo 3 (1,0 mmol) y trifósgeno (500 mg) en 15 ml de THF anhidro. La suspensión resultante se agitó durante 10 minutos, después se filtró y se concentró para proporcionar el cloroformiato crudo como un aceite.

60 Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

cloroformiato de 1-(4-(trifluorometil)fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptilo

cloroformiato de 1-(4-clorofenilsulfonyl)-7-azido-2-heptilo;

cloroformiato de 1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptilo;

cloroformiato de 1-(4-metilfenilsulfonyl)-7-azido-2-heptilo;

65 cloroformiato de 1-(4-metoxifenilsulfonyl)-7-azido-2-heptilo;

cloroformiato de 1-(2,4,6-trimetilfenilsulfonyl)-7-azido-2-heptilo;

cloroformiato de 1-(4-morfolinosulfonil)-7-azido-2-heptilo; y
cloroformiato de 1-(metanosulfonil)-7-azido-2-heptilo.

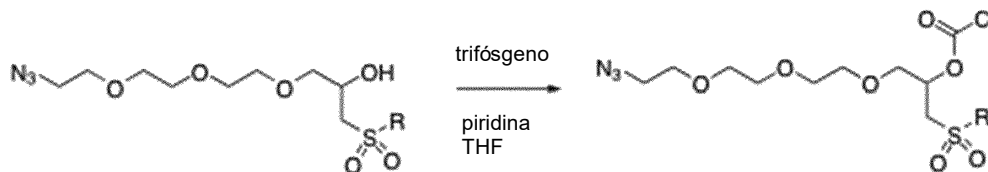
Otros cloroformiatos pueden prepararse de acuerdo con este método general.

5

Ejemplo 6:

Preparación de Cloroformiatos de Azido-Enlazador

10



15

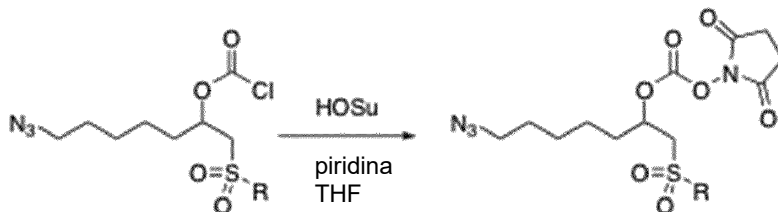
Se añade piridina (160 μ l) gota a gota a una solución agitada del azidoalcohol del Ejemplo 4 (1,0 mmol) y trifósgeno (500 mg) en 15 ml de THF anhidro. La suspensión resultante se agita durante 10 minutos, después se filtró y se concentró para proporcionar el cloroformiato crudo.

20

Ejemplo 7:

Preparación de carbonatos de succinimidilo de azido-enlazador

25



30

Se añadió piridina (300 μ l) gota a gota a una solución agitada del cloroformiato del Ejemplo 5 (1,0 mmol) y N-hidroxisuccinimida (350 mg) en 15 ml de THF anhidro. La suspensión resultante se agitó durante 10 minutos, después se filtró y se concentró para proporcionar el carbonato de succinimidilo crudo. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice proporciona el producto purificado como un aceite que cristaliza espontáneamente. La recrystalización podría realizarse mediante el uso de acetato de etilo/hexano.

35

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

40

Carbonato de O-[1-(4-(trifluorometil)fenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: cristales a partir de acetato de etilo/hexano 40:60 (280 mg, 55 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 8,12 (2H, m), 8,04 (2H, m), 5,18 (1H, m), 4,15 (1H, dd, $J=9,2,15,2$), 3,96 (1H, dd, $J=2,4,15,2$), 3,29 (2H, t, $J=6,8$), 2,80 (4H, s), 1,68 (2H, m), 1,47 (2H, m), 1,27 (4H, m);

45

Carbonato de O-[1-(4-clorofenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: cristales a partir de acetato de etilo/hexano 40:60 (392 mg, 83 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 7,85 (2H, m), 7,72 (2H, m), 5,14 (1H, m), 4,04 (1H, dd, $J=9,6,15,6$), 3,87 (1H, dd, $J=2,4,15,6$), 3,29 (2H, t, $J=6,8$), 2,81 (4H, s), 1,68 (2H, m), 1,47 (2H, m), 1,27 (4H, m);

50

Carbonato de O-[1-(fenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: cristales a partir de acetato de etilo/hexanos 40:60 (391 mg, 89 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 7,91 (2H, m), 7,76 (1H, m), 7,66 (2H, m), 5,12 (1H, m), 3,96 (1H, dd, $J=8,8,15,2$), 3,83 (1H, dd, $J=2,8,15,2$), 3,29 (2H, t, $J=6,8$), 2,81 (4H, s), 1,69 (2H, m), 1,47 (2H, m), 1,27 (4H, m);

55

Carbonato de O-[1-(4-metilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: cristales tras reposo después de la cromatografía (402 mg, 89 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 7,77 (2H, d, $J=8,0$); 7,45 (2H, d, $J=8,0$); 5,11 (1H, m), 3,90 (1H, dd, $J=8,8,15,2$), 3,79 (1H, dd, $J=1,8,15,2$), 3,28 (2H, t, $J=6,8$), 2,81 (4H, s), 2,41 (3H, s), 1,68 (2H, m), 1,47 (2H, m), 1,27 (4H, m);

60

Carbonato de O-[1-(4-metoxifenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: cristales a partir de acetato de etilo/hexano 60:40 (320 mg, 68 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 7,81 (2H, d, $J=8,8$); 7,15 (2H, d, $J=8,8$); 5,11 (1H, m), 3,87 (1H, dd, $J=8,8,15,2$), 3,86 (3H, s), 3,76 (1H, dd, $J=2,8,15,2$), 3,29 (2H, t, $J=6,8$), 2,80 (4H, s), 1,68 (2H, m), 1,47 (2H, m), 1,27 (4H, m);

65

Carbonato de O-[1-(2,4,6-trimetilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: aceite incoloro (458 mg, 95 %): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 7,09 (2H, s), 5,20 (1H, m), 3,82 (1H, dd, $J=8,4,15,2$ -Hz), 3,67 (1H, dd, $J=3,2, 15,2$ -Hz), 3,30 (2H, t, $J=6,8$ -Hz), 2,79 (4H, s), 2,58 (6H, s), 2,28 (3H, s), 1,75 (2H, m), 1,49 (2H, m), 1,30 (4H, m);

60

Carbonato de O-[1-(morfolinosulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: cristales tras reposo después de la cromatografía (430 mg, 95 %): (400 MHz, CDCl_3): δ 5,23 (1H, m), 3,77 (4H, dd, $J=4,0, 5,6$ -Hz), 3,39 (1H, dd, $J=6,4, 14,4$ -Hz), 3,31 (6H, solapamiento), 3,17 (1H, dd, $J=4,8, 14,4$ -Hz), 2,85 (4H, s), 1,88 (2H, m), 1,61 (2H, m), 1,45 (4H, m); y

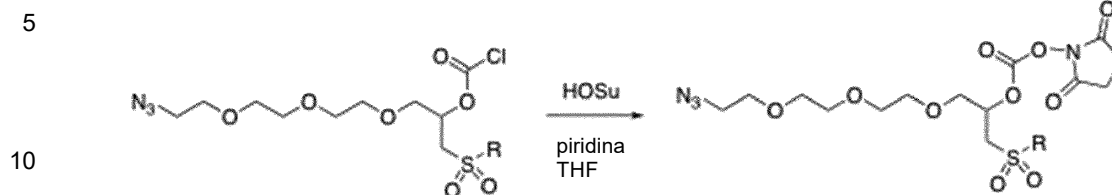
65

Carbonato de O-[1-metilsulfonil-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo: cristales tras reposo después de la cromatografía (360 mg, 95 %): (400 MHz, CDCl_3): δ 5,32 (1H, m), 3,50 (1H, dd, $J=7,2, 14,8$ -Hz), 3,29 (2H, t, $J=6,8$ -Hz), 3,21 (1H, dd, $J=0,8, 4,0, 14,8$ -Hz), 3,02 (3H, s), 2,85 (4H, s), 1,90 (2H, m), 1,62 (2H, m), 1,46 (4H, m).

Otros carbonatos de succinimidilo pueden prepararse de acuerdo con este método general.

Ejemplo 8.

Preparación de carbonatos de succinimidilo de azido-enlazador

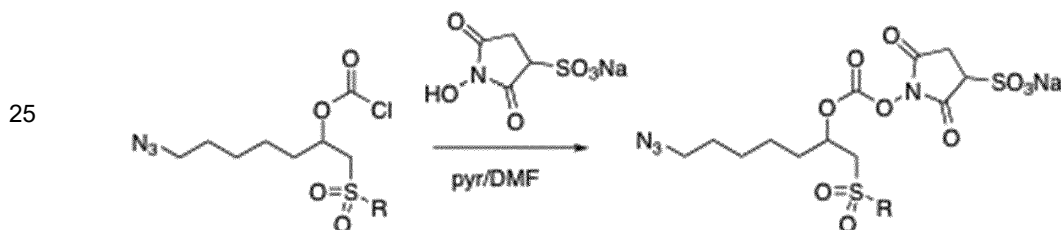


15

Se añade piridina (300 μ l) gota a gota a una solución agitada del cloroformiato del Ejemplo 6 (1,0 mmol) y N-hidroxisuccinimida (350 mg) en 15 ml de THF anhidro. La suspensión resultante se agita durante 10 minutos, después se filtra y se concentra para proporcionar el carbonato de succinimidilo crudo. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice proporciona el producto purificado.

Ejemplo 9.

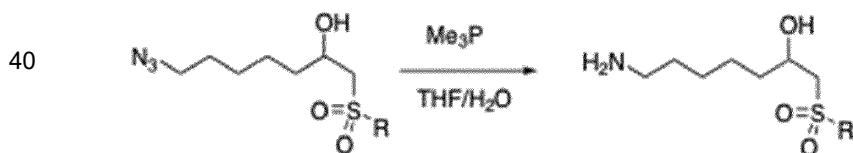
Preparación de carbonatos de sulfosuccinimidilo de azido-enlazador



Una suspensión agitada de N-hidroxisuccinimida sulfonato de sodio (1 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml) se trata con piridina (3 mmol) y un cloroformiato del Ejemplo 7. Después que la suspensión se vuelve transparente, la mezcla se diluye con acetato de etilo.

Ejemplo 10:

Preparación de alcoholes de amino-enlazador



45

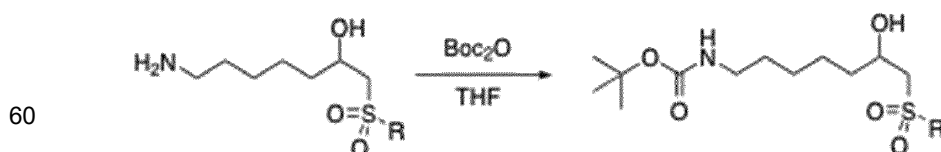
Una solución agitada de un alcohol azido-enlazador del Ejemplo 3 (R=fenilo; 1 mmol) en 1 ml de tetrahidrofurano (THF) se trató con una solución de trimetil-fosfina 1,0 M en THF (1,2 ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió agua (0,1 ml) y la mezcla se dejó agitar durante 1 hora adicional, después la mezcla se evaporó hasta la sequedad mediante el uso de un evaporador rotativo. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, después se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó para proporcionar el producto.

50

Otros alcoholes de amino-enlazador pueden prepararse de acuerdo con este método general.

Ejemplo 11:

Preparación de alcoholes de t'BOC-amino-enlazador



65

Una solución del alcohol enlazador de amino del Ejemplo 10 (R=fenilo; 1,0 mmol) en 2 ml de THF se trató con dicarbonato de di-terc-butilo (1,5 mmol) durante 1 hora, y después se evaporó hasta la sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, después se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó para proporcionar el producto.

La cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de acetato de etilo en hexano proporcionó el producto purificado.

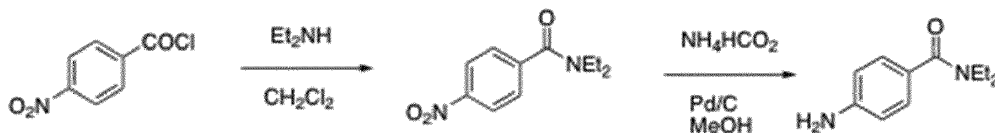
Otros alcoholes de ¹BOC-amino-enlazador pueden producirse de acuerdo con el mismo método general.

5

Ejemplo 12:

Preparación de 4-(N,N-dietilcarboxamido)anilina

10



15

(1) N,N-dietil 4-nitrobenzamida: Se añadió dietilamina (5,6 ml) a una solución enfriada en hielo de cloruro de 4-nitrobenzoilo (5,0 g) en 100 ml de DCM. Después de 1 h, la mezcla se lavó sucesivamente con agua, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un líquido incoloro que cristaliza en reposo. La recrystalización a partir de acetato de etilo/hexano proporciona el producto como cristales amarillos pálidos (4,6 g).

20

(2) 4-(N,N-dietilcarboxamido)anilina: Una mezcla de N,N-dietil 4-nitrobenzamida (4,44 g) y paladio en carbono al 10 % (0,2 g) en 100 ml de metanol se trató con formiato de amonio (4,0 g) durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de celita y se concentró. El residuo se volvió a disolver en DCM, se lavó sucesivamente con Na₂CO₃ 0,5 M, agua y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un material cristalino. La recrystalización a partir de acetato de etilo/hexano proporciona el producto anilina.

25

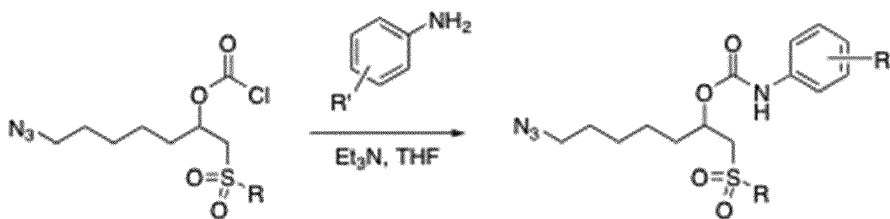
De acuerdo con el mismo procedimiento se preparó, además, 4-(morfolinocarbonil)anilina mediante el reemplazo de dietilamina con morfolina.

Ejemplo 13:

30

Preparación de azidocarbamatos

35



40

El cloroformiato crudo preparado a partir de 2,5 mmol de azidoalcohol de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 5 se disolvió en 20 ml de THF, y se añadieron la anilina (2,5 mmol) y trietilamina (0,7 ml, 5,0 mmol). Después de 1 h, la mezcla se diluyó con acetato de etilo, se lavó sucesivamente con HCl 1 N, agua, NaHCO₃ saturado y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo/hexano para proporcionar el producto carbamato.

45

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

Carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenilo];

Carbamato de O-[1-(morfolinosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenilo];

50

Carbamato de O-[1-(metanosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenilo];

Carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(morfolinocarbocarbamido)fenilo]; y

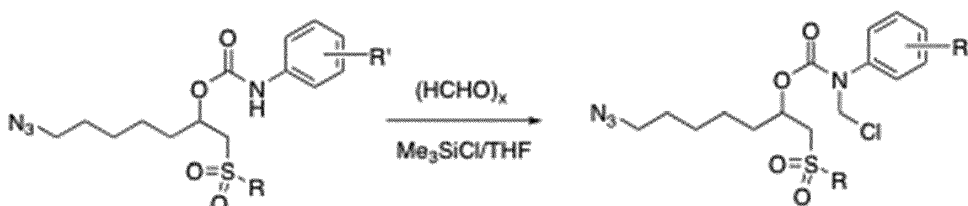
Carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(morfolinosulfonyl)fenilo].

Ejemplo 14:

55

Preparación de carbamatos de N-clorometilo

60



65

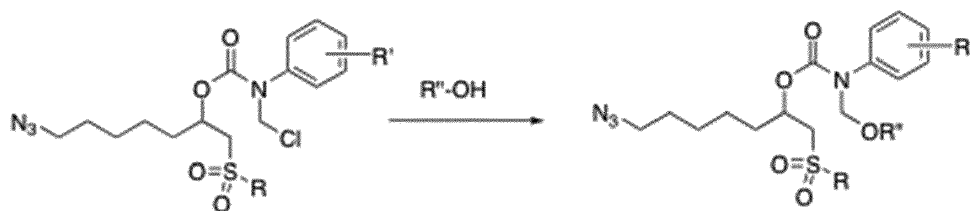
Una mezcla del azidocarbamato del Ejemplo 13 (1,0 mmol), paraformaldehído (45 mg), clorotrimetilsilano (1 ml), y THF (1 ml) en un recipiente sellado de 20 ml se calentó en un baño a 55 °C durante 17 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el recipiente se abrió y la mezcla se concentró en un evaporador rotativo hasta un aceite espeso, el cual se tomó en acetato de etilo y se volvió a concentrar. El residuo se disolvió en acetato de etilo/hexano 2:1, se filtró y se concentró para proporcionar el carbamato de N-clorometilo, el cual se usó sin purificación adicional.

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

Carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo;
Carbamato de O-[1-(morfolinosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo; y
Carbamato de O-[1-(metanosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo.

Ejemplo 15

Preparación de carbamatos de N-alcoximetilo



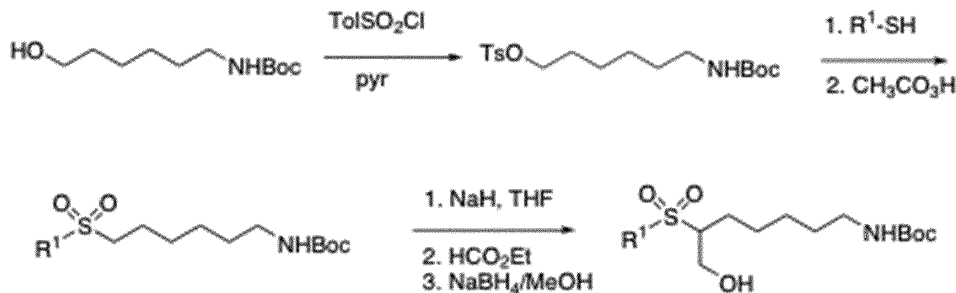
El carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 14 (0,4 mmol) se disolvió en 5 ml de metanol seco. Después de 1 h, la mezcla se evaporó hasta la sequedad y el residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo/hexanos) para proporcionar el producto.

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

Carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo;
Carbamato de O-[1-(morfolinosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo; y
Carbamato de O-[1-(metanosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo.

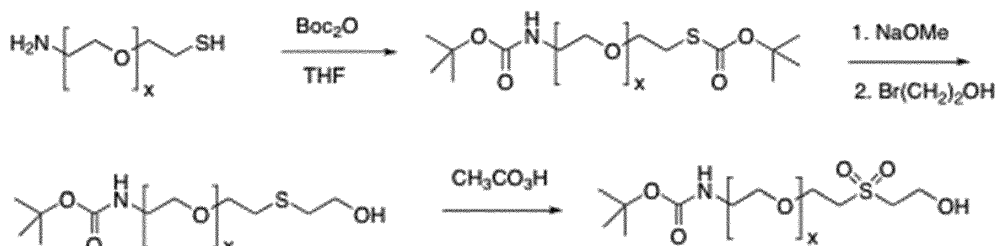
Ejemplo 16

7-(*tert*-Butoxicarbonilamino)-2-(R¹-sulfonyl)-1-heptanol



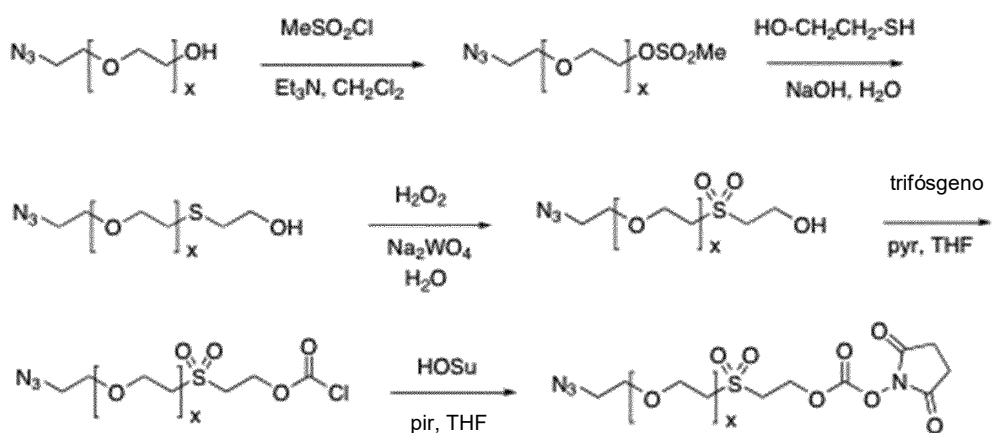
Se añade cloruro de p-toluenosulfonilo (1 mmol) a una solución de 6-azido-1-hexanol (Ejemplo 1, 1 mmol) en piridina (2 ml) enfriada en hielo. Después 30 min, la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se trata con R¹-SH (1 mmol) durante 1 hora adicional. La mezcla se diluye con acetato de etilo, se lava secuencialmente con agua, HCl 1 N, agua, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora. El tioéter crudo se disuelve en acetato de etilo y se trata ácido peracético en exceso para preparar la sulfona. Después del tratamiento acuoso estándar, la sulfona se purifica mediante cromatografía en gel de sílice. Una mezcla de la sulfona, formiato de etilo y 2 equivalentes de hidruro de sodio en DMF se calienta a 50 °C para proporcionar un aldehído intermedio, el cual se trata con borohidruro de sodio en metanol para producir el producto alcohol.

Ejemplo 17



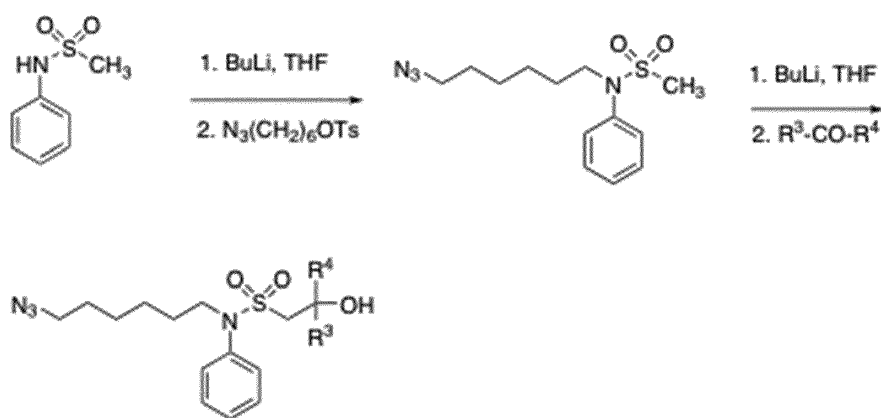
Una solución de un PEG heterobifuncional amino-tiol en THF se trata con dicarbonato de di-*terc-butilo* en exceso hasta que se completa la reacción, y el producto di-BOC se aísla mediante cromatografía. El tiocarbonato se escinde mediante el tratamiento con un equivalente de NaOMe en metanol, y se añade 2-bromoetanol para formar el hidroxietil tioéter, el cual se oxida con ácido peracético para formar el producto.

15 Ejemplo 18



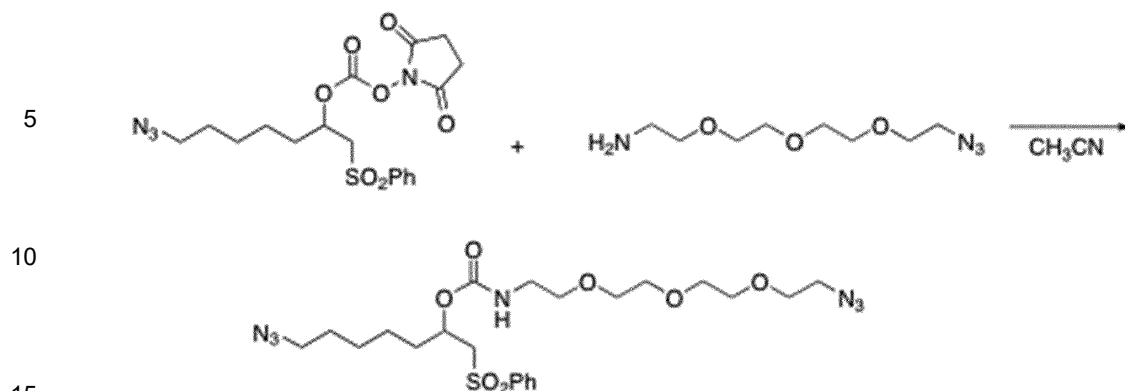
35 Estos compuestos pueden prepararse mediante un método análogo al que se describe para metoxi-PEG-hidroxietil sulfona (Morpurgo, y otros, Bioconjugate Chemistry (1996) 7:363-368, incorporada en la presente descripción como referencia). Por ejemplo, una solución de 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-ol ($x=3$) (3 mmol) en tolueno se seca mediante destilación azeotrópica. Después de la disolución en CH_2Cl_2 , se añade cloruro de metanosulfonilo seguido por trietilamina para formar el mesilato. Una solución del mesilato en agua se trata con 2-mercaptoetanol e NaOH 2 N para formar el hidroxietil sulfuro. El sulfuro se oxida posteriormente a la sulfona, por ejemplo, mediante el uso de peróxido de hidrógeno en la presencia de un catalizador de ácido tungstico o alternativamente mediante el uso de ácido peracético. La hidroxietil sulfona se activa después como el carbonato de succinimidilo de acuerdo con los métodos descritos en los ejemplos anteriores.

45 Ejemplo 19



Ejemplo 20:

65 Preparación de agente reticulantes de la Fórmula (1)

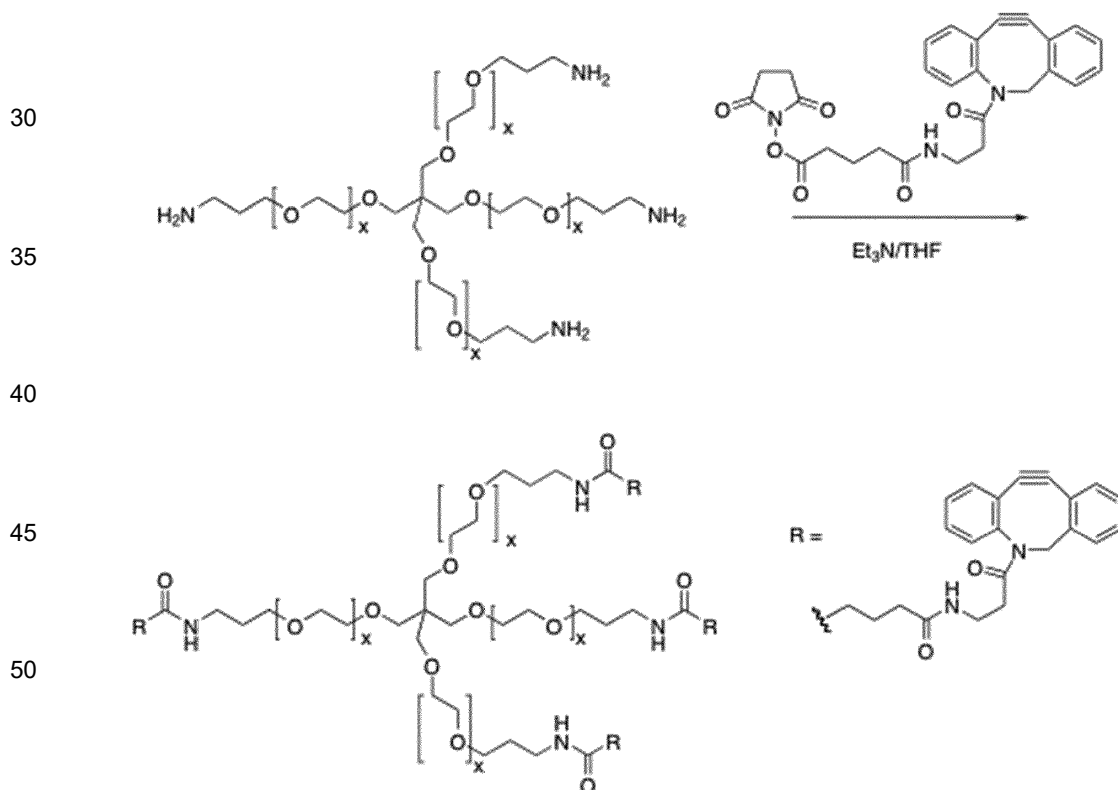


Una solución de carbonato de 7-azido-1-(fenilsulfonil)-2-hepil succinimidilo (119 mg, 0,27 mmol) en 2 ml de acetonitrilo se trató con 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina (65 mg, 0,30 mmol) durante 10 min a temperatura ambiente. Después de la evaporación del solvente, el residuo se disolvió en 1 ml de CH_2Cl_2 y se sometió a cromatografía en una columna 4-g de gel de sílice mediante el uso de un gradiente en etapas de hexano, hexano/acetato de etilo 3:1, hexano/acetato de etilo 1:1 y hexano/acetato de etilo 1:2. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se evaporaron para proporcionar el producto.

20

Ejemplo 21:

25 Preparación de PEG-[DBCO]₄ de 4 brazos



Una solución de polietilenglicol de 4 brazos de 40-kDa con grupos extremos de aminopropilo que tiene un núcleo de pentaeritritol (NOF America, PTE400PA) (500 mg, 12,5 μmol), trietilamina (20 μl) y éster de succinimidilo de ácido 6-aza-5,9-dioxo-9-(1,2-dihidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)nonanoico ("DBCO-NHS", Click Chemistry Tools, Macon, GA) (36 mg, 75 μmol) en 5 ml de THF se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El producto se precipitó mediante la adición de la mezcla de reacción a 50 ml de metil terc-butil éter (MTBE). El precipitado se recolectó mediante filtración al vacío y se secó al vacío para proporcionar 510 mg de producto.

60

Ejemplo 22:

65 Formación de hidrogeles

Una solución de 4,5 mg de PEG-[DBCO]₄ de 4 brazos (Ejemplo 21) en 100 µl de amortiguador acetato 10 mM, pH 5, se trató con 5,0 µl de una solución de 40 mg/ml del agente reticulante diazida del Ejemplo 20. La solución fragua rápidamente para proporcionar un hidrogel elástico.

5 De manera similar, una solución de 4,5 mg de PEG-[DBCO]₄ de 4 brazos (Ejemplo 21) en 100 µl de amortiguador acetato 10 mM, pH 5, se trató con 2,5 µl de una solución de 40 mg/ml del agente reticulante diazida del Ejemplo 20. La solución gelificó para producir un hidrogel viscoso.

Ejemplo 23:

10

Preparación de reactivos de reticulación de PEG-(enlazador-azida)_x multivalentes de la Fórmula (2)

15 La preparación de reactivos de reticulación de PEG-(enlazador-azida)_x multivalentes se ejemplifica mediante la preparación de un compuesto de la fórmula (2) en donde m=0, n≈aproximadamente 100, s=0, t=4, W=O(C=O)NH, Q=C(CH₂)₄, R¹=PhSO₂, R²=H, un R⁵=H y el otro R⁵=(CH₂)₅N₃. Otros compuestos de la fórmula (2) se prepararon mediante el uso del mismo método mediante sustitución del azida-enlazador-carbonato de succinimidilo del Ejemplo 7. Según sea necesario, pueden usarse además azida-enlazador-carbonatos de succinimidilo análogos de otros Ejemplos.

20 Por lo tanto, una solución de 25 µmol del azido-enlazador-carbonato de succinimidilo (Ejemplo 7) en 1 ml de ACN se añadió a una mezcla de 5 µmol (100 mg) de PEG de 4 brazos de 20-kDa-hidrocloruro de amina (núcleo de pentaeritritol, JenKem Technologies) en 1 ml de agua y 40 µl de NaHCO₃ 1,0 M (40 µmol). Después de 1 hora a temperatura ambiente la solución se dializó (MWCO 12-14 k) frente a 1 L de metanol al 50 % seguido por 1 L de metanol. Después de la evaporación, el residuo (109 mg) se disolvió en 2,12 ml de NaOAc 10 mM filtrado estéril, pH 5,0 y se almacenó congelado a -20 °C. La concentración de azida determinada mediante la reacción con DBCO-ácido fue 9,5 mM.

25

Ejemplo 24:

Preparación de PEG-(ciclooctinas)_x multivalentes

30 PEG_{20kDa}-(DBCO)₄: Una solución de 60 mM de DBCO-NHS recientemente sometido a cromatografía (Click Chemistry Tools) en acetonitrilo (0,5 ml, 30 µmol, 1,5 eq) se añadió a una solución de hidrocloreuro de PEG de 4 brazos de 20 kDa-amina (núcleo de pentaeritritol, JenKem Technologies; 100 mg, 5 µmol), y diisopropiletilamina (0,010 ml, 57 µmol) en acetonitrilo (1 ml). Después de agitar 2 h a temperatura ambiente, la mezcla se evaporó hasta la sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol acuoso al 50 % (4 ml) y se dializó frente a metanol acuoso al 50 % seguido por metanol. Después de la evaporación, el residuo (100 mg) se disolvió en agua para obtener una solución concentrada de 50 mg/ml (DBCO 10 mM mediante ensayo espectrofotométrico), la cual se almacenó congelada a -20 °C.

35

40 PEG_{40kDa}-(DBCO)₈: Se añadió un ml de solución 40 mM (40 µmol) de DBCO-NHS en THF a una solución de 168 mg (4,2 µmol) de hidrocloreuro de PEG de 8 brazos de 40-kDa-amina (núcleo de tripentaeritritol, JenKem Technologies) y 12,9 µl de diisopropiletilamina (74 µmol) en 0,6 ml de ACN y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se dializó frente a 2 L de metanol al 50 % seguido por 1 L de metanol. Después de la evaporación, el residuo (149 mg) se disolvió en 1,49 ml de agua y se almacenó congelada a -20 °C. La concentración de DBCO determinada por medios espectrofotométricos fue 16 mM.

40

45 PEG_{40kDa}(BCN)₈: Una solución de 200 mg de PEG de 8 brazos de 40 kDa-amina•HCl (JenKem Technologies; 40 µmol de NH₂), 20 mg de carbonato de p-nitrofenilo de BCN (SynAffix; 63 µmol), y 20 µl de N,N-diisopropiletilamina (115 µmol) en 2 ml de DMF se agitó 16 h a temperatura ambiente. Después de desactivar con 0,5 ml de taurina 100 mM en KP_i 0,1 M, pH 7,5, durante 1 h, la mezcla se dializó secuencialmente frente a agua, metanol/agua 1:1 y metanol mediante el uso de una membrana de 12 kDa. Después de la evaporación, el residuo se disolvió en 2 ml de THF y se precipitó con 10 ml de éter metil ^tbutílico. El producto se recolectó y se secó (190 mg).

50

Ejemplo 25:

Preparación de la sonda de erosión de BODIPY-azida

55

Una solución 100 mM de 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina en acetonitrilo (13 µl, 13 µmol) se añadió a una solución 12,8 mM de BODIPY TMR-X SE (Invitrogen) en DMSO (100 µl, 1,28 µmol). Después de 30 min a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó hasta 2 ml con KP_i 0,1 M, pH 7,4 y se cargó en una columna de extracción C18 BondElut™ de 500 mg (Varian). La columna se lavó sucesivamente con porciones de 5 ml de agua y ACN/agua al 20 %, después se eluyó con ACN/agua al 50 % y se concentró hasta la sequedad. El residuo se disolvió en 1,0 ml of ACN y la concentración (1,0 mM) se determinó mediante el uso de ε₅₄₄ nm=60 000 M⁻¹ cm⁻¹.

60

Ejemplo 26:

Preparación de la sonda de erosión de fluoresceína-azida

65

Una solución de 10 mg/ml de 5-(aminoacetamido)fluoresceína (Invitrogen) en DMF (100 μ l) se mezcló con una solución de 25 mM de carbonato de 6-azidohexiloxi succinimidilo (100 μ l) durante 1 h para proporcionar una solución de 12,5 mM de la sonda de erosión de fluoresceína-azida.

5 Ejemplo 27:

Preparación de hidrogeles mediante el uso de reactivos de reticulación multivalentes de la Fórmula (2)

10 Para la preparación de hidrogeles 4x4, una solución de 50 mg/ml de PEG_{20kDa}(DBCO)₄ (Ejemplo 24; 250 μ l, 2,5 μ mol de grupos de extremos DBCO) en agua se mezcló con 25 μ l de una solución 10 mMn de la sonda de erosión de fluoresceína-azida en DMF (Ejemplo 26; 0,25 μ mol s azida) y se mantuvo 30 min a temperatura ambiente. Se mezclaron alícuotas de cincuenta μ l (0,42 μ mol de DBCO) con 28 μ l de NaOAc 10 mM, pH 5,0, seguido por 42 μ l de 50 mg/ml de PEG_{20kDa}(enlazador-azida)₄ (Ejemplo 23; 0,42 μ mol de azida). Los componentes se mezclaron mediante agitación con vórtex, se centrifugaron brevemente para eliminar cualquier burbuja de aire, y se pipetearon rápidamente en cámaras de perfusión de caucho circulares de 64 μ l (9 x 1 mm) (Grace Bio-Labs) montadas en un portaobjetos de vidrio silanizado y se dejaron curar durante toda la noche.

20 La preparación de hidrogeles 4x8 siguió el mismo método, mediante el uso de soluciones de PEG_{40kDa}(DBCO)₈ o PEG_{40kDa}(BCN)₈ (Ejemplo 24) en lugar de PEG_{20kDa}(DBCO)₄ y el ajuste de las proporciones de ciclooctino de 8 brazos y monómeros de 4 brazos de enlazador-azida para proporcionar geles que tienen el % en peso total deseado de PEG y el grado de reticulación.

Ejemplo 28:

25 Medición de los tiempos de gelificación inversa

Los discos de geles (Ejemplo 27) se suspendieron en amortiguador a 37 °C, y la DO₄₉₃ en la solución se midió periódicamente para monitorear la solubilización de fluoresceína. Los tiempos de gelificación inversa (t_{RGEL}) fueron los tiempos en que los geles se solubilizaron completamente. La dependencia de pH del tiempo de degelificación se determinó mediante el uso de geles 4x4 (5 % de PEG total en peso) preparados a partir de PEG_{20kDa}(DBCO)₄ reticulado mediante el uso de un compuesto de la fórmula (2) en donde m=0, n=aproximadamente 100, s=0, t=4, W=O(C=O)NH, Q=C(CH₂)₄, R¹=(4-clorofenil)SO₂, R²=H, un R³=H y el otro R⁵=(CH₂)₅N₃. Los discos de geles se suspendieron en amortiguadores de pH 7,8-9,0. Las curvas de degelificación se muestran en la figura 5, con tiempos medidos a pH 7,8=20,9 h, pH 8,1=10,9 h, pH 8,4=5,6 h, pH 8,7=2,8 h y pH 9,0=1,5 h. Como se muestra en la figura 6, el tiempo de degelificación varía linealmente con el pH, que aumenta 10 veces por cada caída de 1 unidad de pH.

40 El efecto del modulador de enlazador R¹ sobre el tiempo de degelificación se determinó mediante la preparación de discos de hidrogel a partir de PEG_{20kDa}(DBCO)₄reticulado mediante el uso de compuestos de la fórmula (2) en donde m=0, n=aproximadamente 100, s=0, t=4, W=O(C=O)NH, Q=C(CH₂)₄, R²=H, un R⁵=H y el otro R⁵=(CH₂)₅N₃, y en donde R¹ fue ya sea (4-clorofenil)SO₂, fenil-SO₂, morfolino-SO₂, o CN. Se preparó un gel control que no tiene modulador (R¹R²CH está ausente). Las curvas de degelificación de los discos suspendidos en KP_i, pH 7,4, 37 °C, se muestran en la figura 3. Como se muestra en la figura 4, existe una correlación lineal entre la vida media de la escisión del enlazador según se determina mediante la liberación de 5-(aminoacetamido)fluoresceína (ver Santi, y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos (2012) 109:6211-6216), incorporada en la presente descripción como referencia, y el tiempo de degelificación del hidrogel correspondiente.

Ejemplo 29:

50 Liberación controlada de fármacos de los hidrogeles

Los hidrogeles se prepararon a partir de PEG_{40kDa}(DBCO)₈ en donde una fracción de los ciclooctinos se hizo reaccionar primero con una pequeña cantidad de sonda de erosión de azida y con un azida-enlazador-fármaco de la fórmula (3) en donde el enlazador comprende un grupo modulador R¹, después se reticularon mediante el uso de un compuesto de la fórmula (2) en donde m=0, n=aproximadamente 100, s=0, t=4, W=O(C=O)NH, Q=C(CH₂)₄, R²=H, un R⁵=H y el otro R⁵=(CH₂)₅N₃, y en donde R¹ fue ya sea (4-clorofenil)SO₂, fenil-SO₂, morfolino-SO₂ o CN. Los grupos moduladores del azida-enlazador-fármaco de la Fórmula (3) y el compuesto de la fórmula (2) se seleccionaron de manera que la liberación del fármaco podría producirse más rápidamente que la erosión y la posterior degelificación del hidrogel.

60 En un ejemplo, los geles se prepararon mediante el uso de 5-(acetamido)fluoresceína (AAF) como un sustituto de fármaco. Los grupos moduladores R¹ en la Fórmula (3) se variaron como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, una solución (99,6 μ l) que contenía 50 μ l de 100 mg/ml de PEG_{40kDa}(DBCO)₈ (1,0 μ mol de grupos de extremos DBCO) en agua se mezcló con 6,2 μ l de azida-enlazador-AAF 12,5 mM (0,078 μ mol) en DMF:acetonitrilo 1:1 (donde el enlazador comprende uno de varios moduladores), 15 μ l de BODIPY-azida 1,0 mM (0,015 μ mol) en acetonitrilo como una sonda de erosión, 20 μ l de O-(2-azidoetil)heptaetilenglicol 20 mM (0,40 μ mol) en agua para bloquear el exceso de ciclooctinos y 8,4 μ l de agua. Después de 10 min a temperatura ambiente, la solución que contenía 0,5 μ mol de grupos DBCO no comprometidos se

mezcló con 50 µl de una solución de 50 mg/ml del compuesto de la fórmula (2) en donde R¹=CH₃-SO₂ (0,5 µmol de grupos azida) en NaOAc 10 mM, pH 5,0.

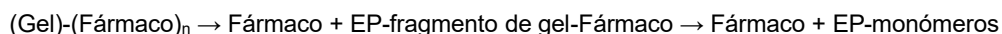
5 Los geles fundidos duplicados se suspendieron en HEPES 0,1 M, pH 7,4, a 37 °C, y se midieron periódicamente la DO₄₉₃ para fluoresceína y la DO₅₄₆ para BODIPY en la solución. Los tiempos de liberación para fluoresceína donde R¹ en la Fórmula 3 es de varios grupos se midieron como se muestra en la figura 7. El tiempo de gelificación inversa, según se determina mediante la solubilización completa de la sonda de erosión BODIPY, fue 630 ± 39 (D.E.) horas (n=8). La solubilización de fluoresceína sigue la ley de tasa de primer orden $[F]_t/F_{tot}=\exp(-k_{obsd}t)$ y da la $k_{obsd} \pm D.E.$ aparente para la fluoresceína liberada total de 0,021 ± 0,00014 hora⁻¹ para R¹=4-ClPh-SO₂⁻, 0,011 ± 0,00031 hora⁻¹ para R¹=Ph-SO₂⁻, 10 0,0053 ± 0,00022 hora⁻¹ para R¹=4-MeO-Ph-SO₂⁻, y 0,0033 ± 0,00010 hora⁻¹ para R¹=MeSO₂⁻. Los datos de tasa se convirtieron en gráficas para la fluoresceína liberada directamente desde el gel mediante el uso de la Ec. S6 (Ejemplo 30).

15 La dependencia de pH de la liberación de fármacos se determinó mediante la observación de liberación de AAF desde los geles anteriores preparados mediante el uso de R¹=(4-clorofenil)SO₂ entre pH 7,4 y 9,0. Como se muestra en la figuras 8 y 9, la tasa de liberación de fármacos aumenta con el aumento del pH.

Ejemplo 30

20 Modelado de la liberación de fármacos y erosión de geles

La liberación del fármaco y la degradación del gel se producen de la siguiente manera, con los productos finales que son el fármaco libre y los monómeros de gel:



25 El fármaco o sustituto de fármaco liberado en la solución puede emanar directamente de la escisión de L1 del gel, o de los fragmentos solubilizados que surgen de la erosión del gel a través de las escisiones de L2. Para distinguir el fármaco liberado desde el gel intacto frente a los fragmentos de gel solubilizados, es necesario determinar la distribución de los nódulos portadores de fármaco entre el gel intacto y la solución en el momento t. En el presente estudio, se usó una modificación de un enfoque informado para monitorear y modelar la degradación del gel (2). La apariencia de una sonda de erosión EP permanentemente unida a los nódulos del gel permite el cálculo de la fracción de nódulos en solución como EP(t)/E_∞; la concentración de fármaco originalmente presente en estos nódulos solubilizados, D_s(t), se obtiene, por lo tanto, mediante la Ec. S1.

$$35 \quad D_s(t)=D_\infty*EP(t)/EP_\infty \text{ or } (D_\infty/EP_\infty)*EP(t) \quad [S1]$$

El fármaco liberado desde el gel intacto en el tiempo t, D_g(t), es la diferencia entre el fármaco total liberado, D(t) y el fármaco contenido en o liberado desde fragmentos de gel solubilizados D_s(t), como en la Ec. S2-

$$40 \quad D_g(t) = D(t) - D_s(t) = D(t) - (D_\infty/EP_\infty)*EP(t) \quad [S2]$$

El cálculo de la tasa de liberación de fármaco de primer orden desde los nódulos de gel intacto no es simple a partir de la medición de D(t) debido a la cantidad variable de gel de la erosión, pero puede calcularse en base a la fracción de fármaco que permanece en el gel intacto. En base a la sonda de erosión liberada EP(t), la fracción de gel restante es 1- EP(t)/EP_∞. La cantidad de fármaco originalmente portado por esta cantidad de gel se da, por lo tanto, mediante D_∞*(1 - EP(t)/EP_∞). Como el fármaco restante en el gel intacto es D_∞-D(t), la fracción de fármaco restante en el gel intacto, D_{f, gel}(t) se da según las Ecuaciones. S3-S4.

$$45 \quad D_{f, gel}(t) = [D_\infty - D(t)]/[D_\infty*(1 - EP(t)/EP_\infty)] \quad [S3]$$

$$50 \quad = [1 - D(t)/D_\infty] / [1 - EP(t)/EP_\infty] \quad [S4]$$

Para una liberación de primer orden de fármaco desde el gel, D_{f, gel}(t) mostrará un decaimiento exponencial que tiene una constante de tasa k_{L1} que describe la tasa de liberación de fármacos desde el gel intacto, Ec. S5. La fusión de las Ecs. S4 y S5 proporciona S6 que puede usarse para estimar experimentalmente la tasa de liberación de fármacos directamente desde el gel intacto.

$$55 \quad D_{f, gel}(t) = e^{-k_{L1}t} \quad [S5]$$

$$60 \quad D_{f, gel}(t) = [1 - D(t)/D_\infty] / [1 - EP(t)/EP_\infty] = e^{-k_{L1}t} \quad [S6]$$

La cantidad de fármaco liberado por el gel en el tiempo depende de la tasa de liberación, k_{L1}, junto con la tasa de erosión del gel. Si la solubilización de la sonda de erosión puede aproximarse mediante un proceso de primer orden entre los tiempos t=0 y t₁ con tasa k_{sol}, la cantidad de fármaco liberado desde el gel durante ese tiempo puede aproximarse según la Ec. S7.

$$D_g(t_1) = D_\infty * (k_{L1}/(k_{sol})) * [1 - e^{-(k_{sol})t_1}] \quad [S7]$$

Si el fármaco que permanece en el gel intacto es insignificante en el momento t_1 , entonces la fracción total de fármaco liberado directamente desde el gel se obtiene en la Ec. S8

$$D_g(t_1)/D_\infty = k_{L1}/k_{sol} = t_{1/2,sol}/t_{1/2,L1} \quad [S8].$$

Ejemplo 31:

Efecto de la densidad de retículo en el tiempo de degelificación

Como se detalla en la Tabla 1, una mezcla de 100 mg/ml de PEG_{40kDa}-(BCN)₈ (grupos de los extremos BCN 20 mM) en agua se combinó con cantidades apropiadas de fluoresceína-azida 10 mM y el compuesto de la Fórmula (2) en donde $m=0$, n =aproximadamente 100, $s=0$, $t=4$, $W=O(C=O)NH$, $Q=C(CH_2)_4$, $R^2=H$, un $R^5=H$ y el otro $R^5=(CH_2)_5N_3$, y $R^1=(4\text{-clorofenil})SO_2$ (azida 10 mM) en agua y O-azidoetil-heptaetilenglicol 50 mM en agua para preparar hidrogeles de PEG al 4 % que tienen 4, 5, 6, 7, o 7,8 enlaces por monómero de PEG de 8 brazos. Los geles fundidos se colocaron en 1 ml de borato 0,1 M, pH 9,2 y se mantuvieron a 37 °C. La disolución de los geles se monitoreó mediante la aparición de DO₄₉₃ en el sobrenadante.

Tabla 1 Preparación y tiempos de degelificación de geles con densidades de reticulación variables.

Retículos/PEG de 8 brazos	4	5	6	7	7.8
PEG-(BCN) ₈	40 µl	36,9 µl	34,3 µl	32,0 µl	30,4 µl
Fluoresceína-azida	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Bloqueo-azida	7,7 µl	5,2 µl	3,1 µl	1,3 µl	0 µl
PEG-(L2-N ₃) ₄	40 µl	46,2 µl	51,4 µl	56,0 µl	59,2 µl
agua	60,8 µl	60,2 µl	59,7 µl	59,2 µl	58,9 µl
Tiempo de degelificación (pH 9,2)	0,62 h	0,77 h	0,83 h	0,88 h	0,97 h
Tiempo de degelificación (pH 7,4)	37 h	46 h	50 h	53 h	58 h

Los geles se disolvieron a 9,2 con tiempos de degelificación como se indica en la Tabla 1, con el tiempo de degelificación a pH 7,4 calculado como (tiempo de degelificación a pH 9,2) * $10^{(9,2-7,4)}$ según se determinó en el Ejemplo 28. Como se esperaba, el tiempo de degelificación aumenta con el aumento del número de enlaces para cada monómero de 8 brazos.

Ejemplo 32

Preparación de un hidrogel degradable de liberación de exenatida

La exenatida unida en el α -terminal a un azida-enlazador que tiene $R^1=MeSO_2-$ como modulador se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida en AnaSpec (Fremont, CA) como se describió anteriormente (Santi, y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos (2012) 109:6211-6216), que resulta en compuestos de la fórmula (3) en donde $R^1 = MeSO_2$, $R^2=H$, $m=0$, un $R^5=H$ y el otro $R^5=(CH_2)_5N_3$, $Y=NH$, y $D=$ exenatida unida a través del grupo amino N-terminal. El azida-enlazador-exenatida (1,2 mg, 270 nmol) en 30 µl de fosfato 1,0 M, pH 7,8, PEG_{40kD} de 8 brazos-(BCN)₈ (Ejemplo 24; 5 mg; 50 µl, 1000 nmol de grupos BCN) en 50 µl de agua se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente, después 20 µl de BODIPY-azida 1 mM (20 nmol) en ACN como sonda de erosión y un agente reticulante de la fórmula (2) en donde $m=0$, n =aproximadamente 100, $s=0$, $t=4$, $W=O(C=O)NH$, $Q=C(CH_2)_4$, $R^2=H$, un $R^5=H$ y el otro $R^5=(CH_2)_5N_3$, y se añadió $R^1=CN$ (3,55 mg; 710 nmol de grupos N₃; Ejemplo 23) en agua 71. Los geles se dejaron curar durante toda la noche, después se almacenaron en 1 ml de PBS, pH 7,4, a 4 °C.

Ejemplo 33

Liberación de exenatida desde un hidrogel degradable de liberación de exenatida

Se colocó un disco de gel (Ejemplo 32) en 1,0 ml de amortiguador borato 0,1 M, pH 8,8 y se mantuvo a 37 °C. La solubilización de exenatida (ya sea como péptido libre o como fragmentos de gel-exenatida solubilizados) y la erosión del gel se monitorearon a 280 nm y 544 nm, respectivamente, mediante el muestreo periódico del sobrenadante. Los resultados se muestran en la figura 10. La liberación se calculó como la solubilización ajustada para la erosión del gel. La solubilización de exenatida fue un proceso de primer orden con $t_{1/2}=20,7$ h a pH 8,8 que, asumiendo que la reacción es de primer orden en ion hidróxido, corresponde a una vida media de 520 h (21 días) a pH 7,4; a $t_{1/2}$ de 23,6 h a pH 8,8, que corresponde a 593 h (24,7 d) a pH 7,4 se calculó para el fármaco directamente liberado desde el gel (Ejemplo 30), que

representa -87,8 % de la exenatida total. La gelificación inversa se observó a 172 h a pH 8,8, que corresponde a aproximadamente 180 días a pH 7,4.

Ejemplo 34:

Difusión de proteínas encapsuladas des los hidrogeles

Las soluciones concentradas de -90 DO₂₈₀/ml de mioglobina (17,7 kDa), anhidrasa carbónica (29,0 kDa), y BSA (66,4 kDa) se prepararon en KP_i 0,1 M, pH 7,4. Los hidrogeles de PEG (4 %) se prepararon mediante la adición de 100 mg/ml de PEG_{20kDa}-(NHCO₂(CH₂)₆N₃)₄ (50 uL) a una mezcla de 100 mg/ml de PEG 20 kDa-(DBCO)₄ (50 µl), solución concentrada de proteína (50 µl) y 10x-PBS (100 µl). Los geles fundidos se suspendieron en 2 ml de KP_i 0,1 M, pH 7,4, a 37 °C, y se midió periódicamente la DO₂₈₀ en la solución. Los valores de t_{1/2} para la liberación en solución fueron -20 min para mioglobina, 24 min para anhidrasa carbónica y 150 min para BSA.

Ejemplo 35:

Preparación de ácidos hialurónicos derivados

El hialuronato de sodio de pm=1,6 x 10⁶ (Lifecore Biomedical; 10,4 mg, 0,0275 mmol de carboxilato) se trató con una solución de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM; 30,4 mg, 0,110 mmol, 4 equiv) en 1,05 ml de amortiguador MES 0,1 M, pH 5,5. La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 15 min hasta disolverse. Una solución de DBCO-PEG4-NH₂ (Click Chemistry Tools; 0,113 ml de 24,3 mM en ACN:MeOH 2:1, 0,00275 mmol, 0,1 equiv) se añadió en 0,3 ml de amortiguador MES. La mezcla resultante se dejó reposar durante 24 h, después se analizó para el consumo de amina libre mediante el ensayo de TNBS a 3,5 y 24 h como sigue: Se diluyó 0,05 ml de la mezcla de reacción hasta 1 ml en amortiguador borato 0,075 M (pH 9,34) que contenía ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico al 0,004 % p/v y metanol al 25 %. La absorbancia de la reacción a 420 nm se siguió hasta que fue estable (~1 h). Las reacciones que contenían cantidades de DMTMM, ácido hialurónico o DBCO-PEG4-NH₂ se usaron como controles. Al finalizar, la mezcla de reacción se diluyó con 8 ml de agua y se dializó (MWCO 12 000-14 000) cinco veces frente a agua y luego una vez frente a metanol. El producto dializado se concentró hasta la sequedad a presión reducida y se desecó bajo vacío fuerte sobre P₂O₅ para producir ácido hialurónico-DBCO (11 mg, ~0,029 mmol de disacárido) como un sólido transparente vítreo seco. Este material se disolvió en 3 ml de agua para obtener una solución muy viscosa ligeramente grasosa que contenía DBCO 0,276 mM (en base a ε₃₀₉=13 448 M⁻¹cm⁻¹. Esto corresponde a un grado de sustitución del 2,9 % (5,3 % en base a la amina consumida en el ensayo de TNBS). Los ácidos hialurónicos de diferentes pesos moleculares pueden derivarse con reactivos de ciclooctino, tales como DIFO o BCN, de acuerdo con este método.

Los ácidos hialurónicos derivados con amina se prepararon de acuerdo con el siguiente método. A una solución de hialuronato de sodio de PM=76 000 (Lifecore Biomedical; 154 mg, 0,385 mmol de disacárido/carboxilato) en agua (4 ml) se añadió 1,3-diaminopropano (0,973 ml, 856 mg, 11,6 mmol, 30 equiv). El pH de la solución resultante se ajustó a 7,0 con HCl 6 N (volumen final ~7 ml) después se añadió N-hidroxisuccinimida sólida (177 mg, 1,54 mmol, 4 equiv), seguido por sal de HCl de 1-(3-dimetilamino)propil-3-etilcarbodiimida sólida (294 mg, 1,54 mmol, 4 equiv). La reacción se volvió ácida en la medida que avanzaba (pH 5,3 después de 10 min). Cada 10 min el pH se volvió a ajustar a 7,2 hasta que fue estable (~1 h). Después de agitar durante 18 h la mezcla se dializó (MWCO 12-14k) frente a PBS, NaCl al 5 %, dos veces frente a agua, después frente a metanol. La mezcla se concentró hasta la sequedad para obtener 85 mg de propilamino-ácido hialurónico como un sólido blanco. Una alícuota de este material (7,4 mg, ~0,019 mmol de disacárido) se disolvió en agua (0,5 ml) para obtener una solución de disacárido ~38 mM. Esta solución (0,025 ml) se evaluó para el contenido de amina libre mediante el ensayo de TNBS mediante la incubación en amortiguador borato pH 9,36 (1 ml) que contenía TNBS al 0,02 % p/v. La absorbancia a 420 nm se monitoreó hasta que fue estable (~1 h). El ensayo indica un grado de sustitución del 7 %.

A una solución de DS propilamino HA al 7 % de pm=1,6 x 10⁶ (0,5 ml de NH₂ 0,64 mM, 320 nmol de NH₂) en agua se añadió 0,1 ml de PBS 100 mM, seguido por una solución de DBCO-PEG4-NHS éster (Click Chemistry Tools; 0,0308 ml de 25 mM según se determina mediante ε₃₀₉=13 449 M⁻¹cm⁻¹, 770 nmol, 2,4 equiv) en metanol. La mezcla resultante se dejó reposar durante 4 horas. El ensayo de TNBS indica la pérdida del 81 % de las aminas disponibles en el ácido hialurónico derivado. Una reacción paralela mediante el uso de 1,2 equivalente de DBCO-PEG4-NHS éster dio como resultado el consumo del 64 % de las aminas disponibles. Para la purificación, las dos reacciones se combinaron y se dializaron (MWCO 12-14k) frente a PBS, después NaCl al 5 % p/v, después dos veces frente a agua, después una vez frente a metanol. La mezcla de diálisis se concentró hasta la sequedad para obtener 2,6 mg de un sólido vítreo blanco. Este material se disolvió en 1 ml de agua para obtener una solución de disacárido 6,5 mM y DBCO 0,31 mM en base a ε₃₀₉=13 448 M⁻¹cm⁻¹, que corresponde a una sustitución de DBCO del 4,8 % y un rendimiento de acilación del 71 %.

Ejemplo 36:

Preparación de hidrogeles de ácido hialurónico

Los hidrogeles de ácido hialurónico se preparan mediante la reticulación de ácido hialurónico derivado con ciclooctino (Ejemplo 35) con agentes reticulantes diazida de la fórmula (1) en donde m=0, X=O-CO-NH-(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃,

$R^1=PhSO_2$, $R^2=H$, un $R^5=H$ y el otro $R^5=(CH_2)_5N_3$. La formación de geles se realiza, típicamente, en agua o agua amortiguada mediante el uso de una relación molar de 2:1 de ciclooctino con respecto a agente reticulante diazida, opcionalmente en la presencia de una solución de proteína o molécula pequeña a encapsular.

5 Para estudiar la difusión de las proteínas desde la matriz de hidrogel de ácido hialurónico, se preparó un hidrogel estable mediante la mezcla de una solución (0,065 ml) de DBCO-HA (Ejemplo 35), DS DBCO al 6,6 %, DBCO 3,9 mM) en agua con una solución de diazido-PEG ya sea de PM=2000 o 5000 (0,005 ml de 25 mM, 0,5 equiv/DBCO). Se mezcló 0,07 ml de la mezcla maestra de hidrogel inmediatamente con una solución sustrato de proteína o molécula pequeña (0,01 ml) para la encapsulación en el fondo de una cubeta de 2,5 ml plástica estándar. Las vidas medias para la difusión desde los
10 geles se dan en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Sustrato	Lys(DNP)	mioglobina	anhidrasa carbónica	BSA	IgG
PM:	312	18,000	29,000	66,000	150,000
$t_{1/2}$ (gel de 2K)	0,96 h	3,98 h	3,66 h	4,26 h	5,71 h
$t_{1/2}$ (gel de 5K)	1,25 h	3,14 h	3,36 h	3,65 h	3,32 h

20 Alternativamente, los fármacos pueden unirse de manera liberable al ácido hialurónico antes de la formación del gel mediante la reacción de un subconjunto de los ciclooctinos disponibles con un azida-enlazador-fármaco como se describió en el Ejemplo 29 y en el Ejemplo 32 anterior. En este caso, la cantidad de agente reticulante diazida usado para la formación del gel se calcula en base a los ciclooctinos disponibles que permanecen después de la unión del fármaco. La
25 unión de 5-(aminoacetamido)fluoresceína a través de un enlazador con $R^D=(4\text{-clorofenil})SO_2$ proporcionó un hidrogel de ácido hialurónico que liberó AAF con $t_{1/2}=49$ h a pH 7,4, 37 °C.

Ejemplo 37:

30 Método para preparar hidrogeles con estequiometrias controladas

Como se representa en la figura 11, la S-t-butiltio-cisteína (H Cys(^tBuS)) comercialmente disponible se acila con un ciclooctino succinimidilo éster (*por ejemplo*, DBCO-HSE o BCN-HSE) para obtener CO-Cys(^tBuS)OH ($A'=COOH$; B =ciclooctino; C=^tBuS). Un PEG amino de 4 brazos ($A=NH_2$) se acila (*por ejemplo*, mediante el uso de una carbodiimida) con este CO-Cys(^tBuS)OH para obtener el PEG funcionalizado con CO/^tBuS. Un azido-enlazador(R^{11})-fármaco se acopla a los residuos de ciclooctino, después se elimina el grupo ^tBuS, por ejemplo mediante el uso de un tiol tal como ditioneitol o con una fosfina tal como TCEP, y el PEG derivado con tiol se purifica de los tioles pequeños (por ejemplo, mediante el uso de diálisis o cromatografía de filtración en gel) y se hace reaccionar con una ciclooctino-maleimida, ciclooctino-haloacetamida o ciclooctino-vinilsulfonamida para introducir exactamente 4 sitios de gelificación de ciclooctino por molécula. Este producto intermedio se reticula después para formar un hidrogel mediante el uso de un compuesto de la fórmula (1) o (2) en donde los grupos funcionales reactivos son azida. Alternativamente, el PEG derivado con tiol (antes de la reacción con ciclooctino-maleimida) podría polimerizarse, además, con un compuesto de la fórmula (1) o (2) en donde el grupo funcional reactivo es un aceptor de Michael o agente alquilante tal como maleimida, vinil sulfona, vinil sulfonamida, acrilato, acrilamida, haloacetato o haloacetamida. Pueden usarse de manera similar adaptadores ortogonalmente protegidos distintos de S-t-butiltio-cisteína, por ejemplo, lisinas, aspartatos o glutamatos adecuadamente protegidos o adaptadores sintéticos que no se basan en aminoácidos.

Listado de secuencias

50 <110> PROLYNX LLC
ASHLEY, Gary W.
SANTI, Daniel V.
HENISE, Jeffrey C.

55 <120> HIDROGELES CON RETICULACIÓN BIODEGRADABLE

<130> P104171EP00

<140> PCT/US2012/054278

60 <141> 2012-09-07

<150> US 61/531,990

<151> 2011-09-07

65 <160> 1

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

ES 2 686 927 T3

<210> 1
<211> 39
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido construido de manera sintética
<220>
10 <221> VARIANTE
<222> 1
<223> Xaa = His modificada por H

<220>
15 <221> VARIANTE
<222> 39
<223> Xaa = Ser modificada por NH2

<400> 1
Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Xaa
35

25

30

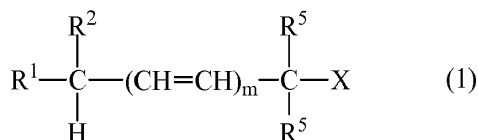
35

40

Reivindicaciones

1. Un hidrogel que es biodegradable en condiciones fisiológicas cuyo hidrogel comprende uno o más polímeros reticulados por un enlazador que se descompone mediante una reacción de eliminación beta,

(a) en donde el enlazador, cuando se dispone en el hidrogel, es un residuo de la Fórmula (1)



en donde al menos uno de R¹, R², R⁵ se acopla a través de un primer grupo funcional a dicho uno o más polímeros y en donde X se acopla a dicho uno o más polímeros del hidrogel a través de un segundo grupo funcional, en donde m es 0 o 1;

en donde uno y solo uno de R¹ y R² puede ser H o puede ser alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

al menos uno o ambos R¹ y R² son independientemente CN; NO₂;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

alqueno opcionalmente sustituido;

alquino opcionalmente sustituido;

COR³ o SOR³ o SO₂R³ en donde

R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u

OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al que se unen forman un anillo heterocíclico;

SR⁴ en donde

R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o

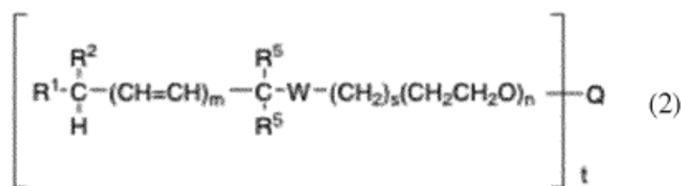
heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

en donde R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y

cada R⁵ es independientemente H o es alquilo, alquenalquilo, alquinalquilo, (OCH₂CH₂)_p O-alquilo en donde p=1-1000, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido,

en donde X es un carbonato, un carbamato, tioéter, un éster o fenol opcionalmente sustituido en donde X se acopla al polímero a través de dicho segundo grupo funcional; o

(b) en donde dicho enlazador es un residuo de la Fórmula (2)



en donde al menos dos de dichos R¹, R², R⁵ se acoplan a través de grupos funcionales a dicho uno o más polímeros;

m y R¹, R² y R⁵ se definen como en el párrafo (a);

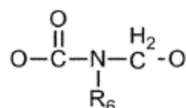
n es 1-1000;

s es 0-2;

t es 2,4, 8, 16 o 32;

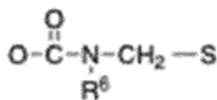
Q es un grupo núcleo que tiene la valencia t;

W es O(C=O)O, O(C=O)NH, O(C=O)S,



o

5

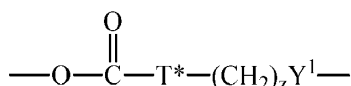


10

en donde R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido.

2. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la fórmula (1), X es

15



20

en donde T* es O, S o NR⁶ en donde R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido;

z es 1-6; y

Y¹ está ausente o es OR⁷ o SR⁷, en donde R⁷ es alquileo opcionalmente sustituido, fenileno opcionalmente sustituido o (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000, en donde Y¹ se acopla a un polímero a través de dicho segundo grupo funcional.

25

3. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde dicho grupo funcional comprende independientemente N₃, NH₂, NH-CO₂^tBu, SH, S^tBu, maleimida, CO₂H, CO₂^tBu, 1,3-dieno, ciclopentadieno, furano, alquino, ciclooctino, acrilato o acrilamida; y en donde cuando un grupo funcional comprende N₃ el otro no comprende alquino o ciclooctino; cuando un grupo funcional comprende SH el otro no comprende maleimida, acrilato o acrilamida; cuando un grupo funcional comprende NH₂, el otro no comprende CO₂H; cuando un grupo funcional comprende 1,3-dieno o ciclopentadieno el otro no comprende furano.

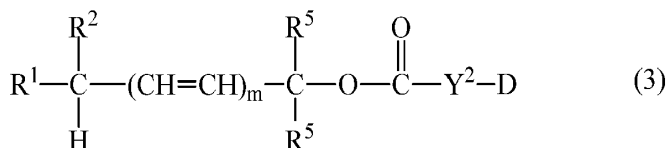
30

4. El hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende, además, un fármaco.

35

5. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 4 en donde el fármaco se acopla al hidrogel a través de un residuo de la fórmula (3)

40



45

en donde al menos uno de R¹, R², R⁵ se acopla al hidrogel;

m y R¹, R² y R⁵ se definen como en la reivindicación 1; D es un fármaco o profármaco; y

Y² es NH o NBCH₂ en donde B es H, alquilo, arilalquilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido.

50

6. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 5 en donde el hidrogel comprende un primer polímero con múltiples brazos en donde cada brazo termina en un grupo que comprende al menos dos grupos funcionales ortogonales acoplados a un enlazador-fármaco de la fórmula (3) en donde el enlazador-fármaco comprende un grupo funcional acoplado a solo uno de los grupos funcionales ortogonales del primer polímero y el grupo funcional ortogonal restante en el primer polímero cargado de fármaco resultante se acopla a un compuesto de la fórmula (1) o (2) en donde el compuesto de la fórmula (1) o (2) comprende un grupo funcional acoplado con solo uno de los grupos funcionales ortogonales restantes del primer polímero cargado de fármaco.

55

7. El hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en donde uno de R¹ y R² es H y el otro es CN o SO₂R³ en donde R³ es alquilo opcionalmente sustituido; arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u

60

OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al cual se unen forman un anillo heterocíclico; y/o uno de R⁵ es H y el otro se acopla a dicho polímero.

65

8. El hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el uno o más polímeros del hidrogel es de la fórmula [-(CH₂)_s(CH₂CH₂O)_n]_tQ, en donde n es 10-1000;

s es 0-2;

t es 2,4, 8, 16 o 32 y representa el número de brazos de dicho polímero; y

Q es un grupo núcleo que tiene una valencia=t,

y dicho polímero se acopla a dichos enlazadores a través de grupos funcionales en el extremo de cada uno de dichos brazos.

5

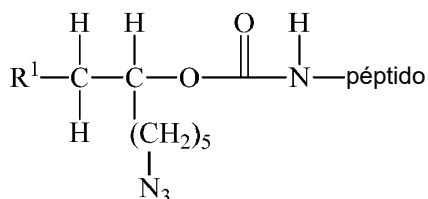
9. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 8 en donde t es 4 y cada brazo de dicho polímero termina en dos grupos funcionales ortogonales.

10

10. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 en donde Q es pentaeritritol, tripentaeritritol o hexaglicerina.

15

11. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 7 en donde uno o más polímeros del hidrogel es el residuo de un polietilenglicol de 8 brazos que comprende un grupo ciclooctino en el extremo de cada brazo en donde al menos algunos de dichos brazos se han acoplado a



20

en donde R¹=CN; NO₂ o es:

25

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

alqueno opcionalmente sustituido;

alquino opcionalmente sustituido;

COR³ o SOR³ o SO₂R³ en donde

30

R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u

OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al cual se unen forman un anillo heterocíclico; o

35

SR⁴ en donde

40

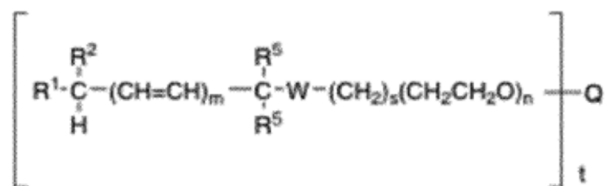
R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido.

12. El hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7- 11, en donde el compuesto de reticulación escindible es de la fórmula

45



50

y en donde m es 0,

55

n es 90-110,

s es 0,

t es 4,

W es O(C=O)NH,

Q es C(CH₂)₄,

60

R¹ es CN o SO₂R³, en donde R³ es alquilo opcionalmente sustituido,

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

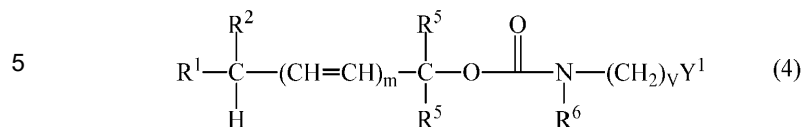
OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al que se unen forman un anillo heterocíclico;

65

R² y uno de R⁵ es H, y

el otro R⁵ se acopla a uno o más polímeros del hidrogel.

13. Un compuesto de reticulación de la Fórmula (4)



en donde al menos dos de R¹, R², y R⁵ y Y¹ comprenden, además, un grupo funcional capaz de conectarse a un polímero;

en donde, m es 0 o 1;

R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido;

v es 1-6;

Y¹ es H o está en un enlace si Y¹ comprende un grupo funcional o es OR⁷ o SR⁷, en donde R⁷ es alquileo opcionalmente sustituido, fenileno opcionalmente sustituido, o (OCH₂CH₂)_p, en donde p=1-1000;

al menos uno o ambos R¹ y R² son independientemente CN; NO₂;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

alqueno opcionalmente sustituido;

alquino opcionalmente sustituido;

COR³ o SOR³ o SO₂R³ en donde

R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u

OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al que se unen forman un anillo heterocíclico;

SR⁴ en donde

R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;

arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o

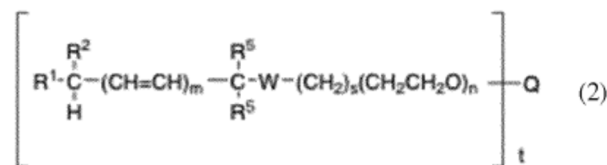
heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

en donde R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y

en donde uno y solo uno de R¹ y R² puede ser H o puede ser alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; y

cada R⁵ es independientemente H o es alquilo, alquenalquilo, alquinalquilo, (OCH₂CH₂)_p, O-alquilo en donde p=1-1000, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

o de la Fórmula (2)



en donde en al menos dos ejemplos R¹, R², y/o R⁵ comprende, además, un grupo funcional capaz de conectarse a un polímero;

m es 0 o 1;

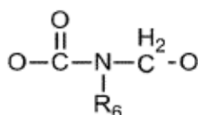
n es 1-1000;

s es 0-2;

t es 2, 4, 8, 16 o 32;

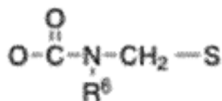
Q es un grupo núcleo que tiene una valencia = t;

W es O(C=O)O, O(C=O)NH, O(C=O)S,



o

5



10

en donde R⁶ es H, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido; al menos uno o ambos R¹ y R² son independientemente CN; NO₂;

15

arilo opcionalmente sustituido;
heteroarilo opcionalmente sustituido;
alqueno opcionalmente sustituido;
alquino opcionalmente sustituido;
COR³ o SOR³ o SO₂R³ en donde

20

R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;
arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; u
OR⁹ o NR⁹₂ en donde cada R⁹ es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R⁹ tomados junto con el nitrógeno al que se unen forman un anillo heterocíclico;

25

SR⁴ en donde

30

R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;
arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o
heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
en donde R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y
en donde uno y solo uno de R¹ y R² puede ser H o puede ser alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; y
cada R⁵ es independientemente H o es alquilo, alquenalquilo, alquinilalquilo, (OCH₂CH₂)_p O-alquilo en donde p=1-1000, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido.

35

14.

El compuesto de reticulación de acuerdo con la reivindicación 13 en donde cada grupo funcional capaz de conectarse a un polímero comprende N₃, NH₂, NH-CO₂^tBu, SH, S^tBu, maleimida, CO₂H, CO₂^tBu, 1,3-dieno, ciclopentadieno, furano, alquino, ciclooctino, acrilato, vinil sulfona, vinil sulfonamida, o acrilamida y en donde cuando un grupo comprende N₃ el otro no comprende alquino o ciclooctino; cuando un grupo comprende SH el otro no comprende maleimida, acrilato, o acrilamida; cuando un grupo comprende NH₂ el otro no comprende CO₂H; y cuando un grupo comprende un 1,3-dieno o ciclopentadieno el otro no comprende furano.

40

15.

El compuesto de reticulación de acuerdo con la reivindicación 13 o 14 en donde Q es pentaeritritol, tripentaeritritol o hexaglicerina.

45

16.

Un método para preparar un hidrogel biodegradable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 dicho método que comprende hacer reaccionar polímero(s) con un agente reticulante escindible cuyo agente reticulante comprende al menos dos grupos funcionales separados por una porción que se escinde mediante eliminación β en condiciones fisiológicas, en donde dichos grupos funcionales reaccionan con dicho(s) polímero(s) para formar dicho hidrogel biodegradable.

50

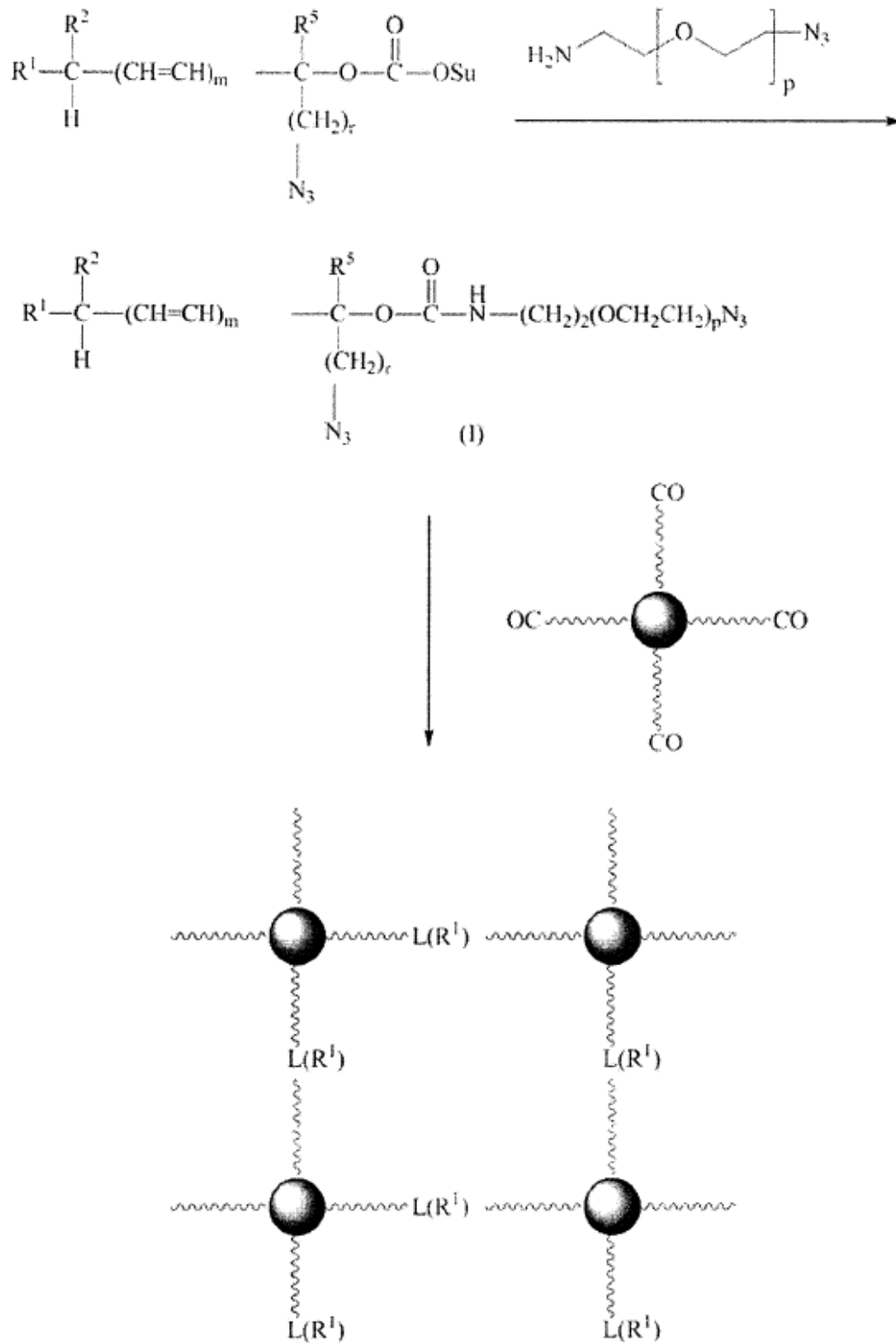


Figura 1

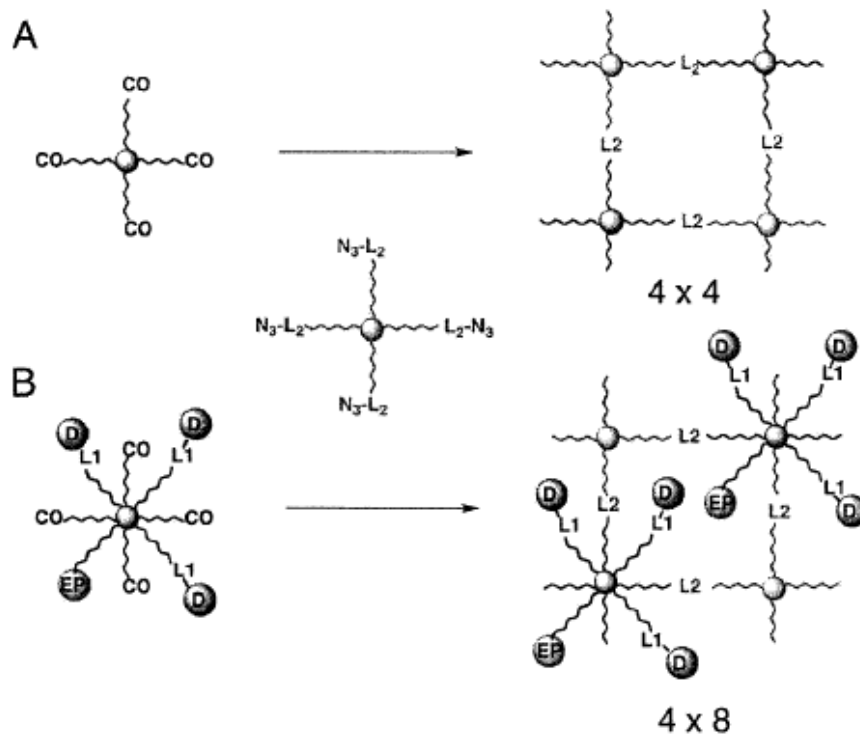


Figura 2

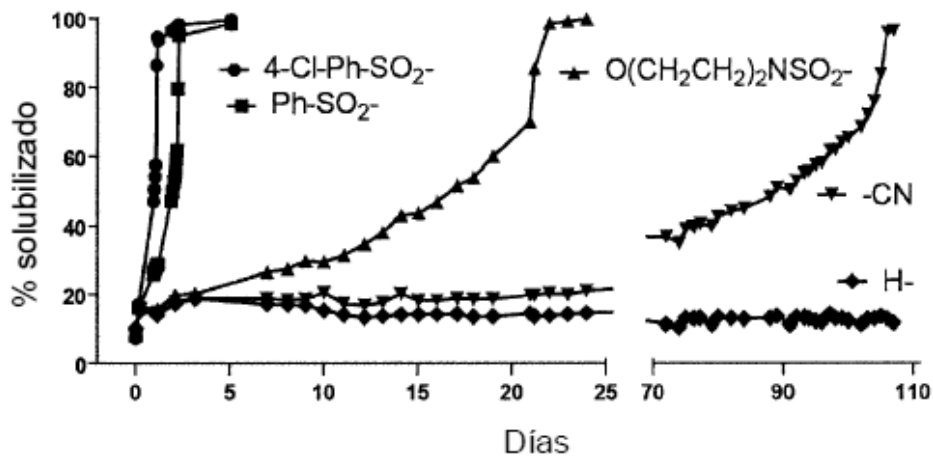


Figura 3

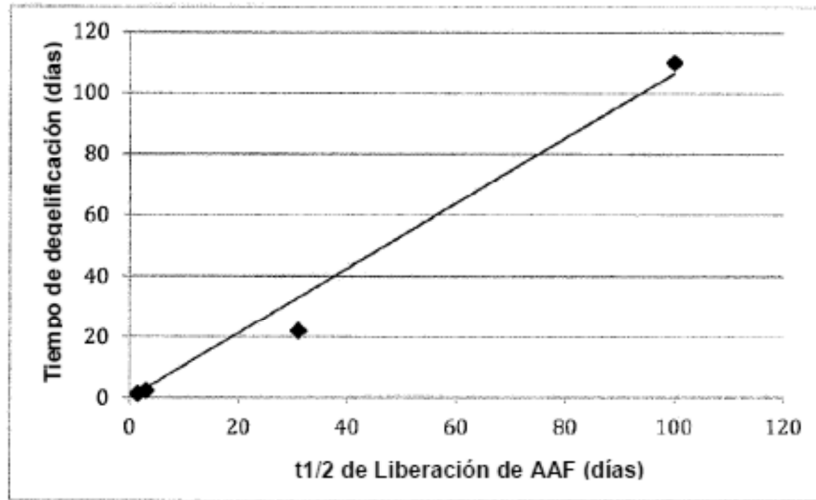


Figura 4

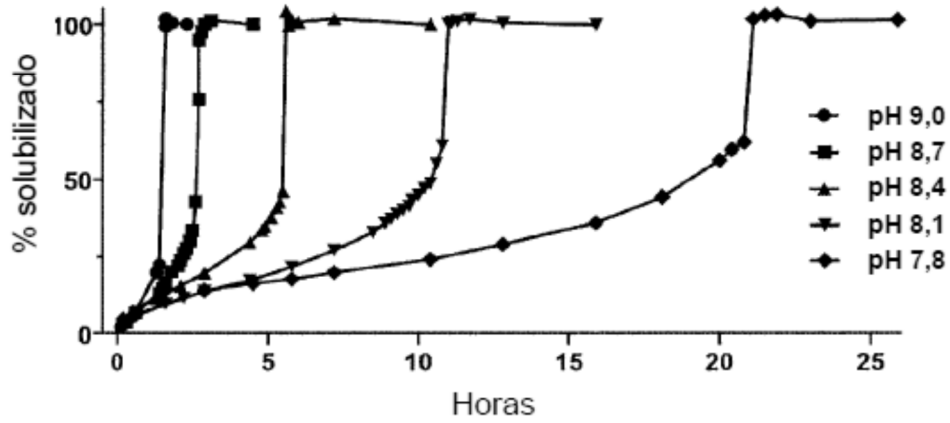


Figura 5

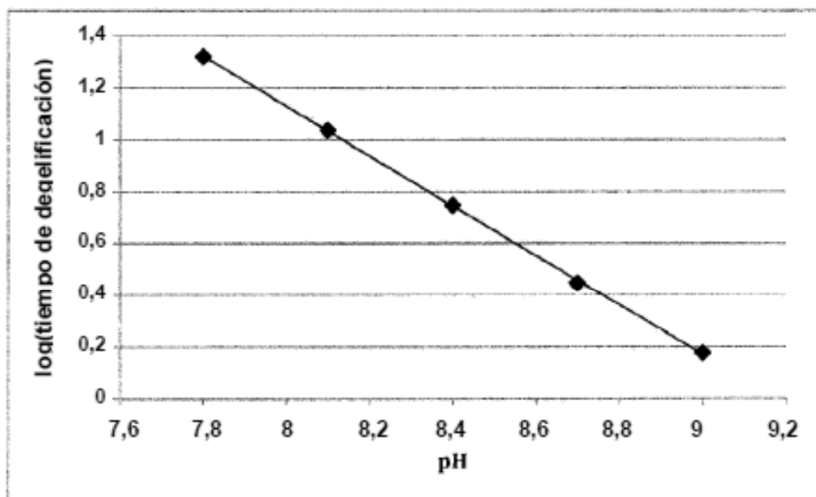


Figura 6

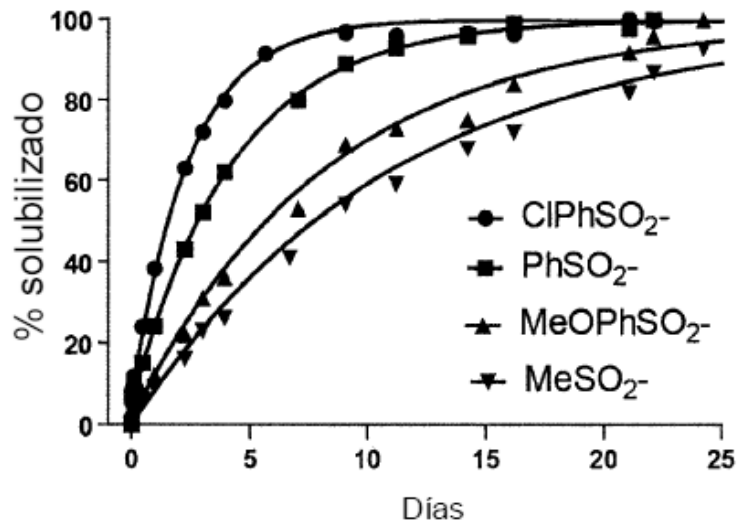


Figura 7

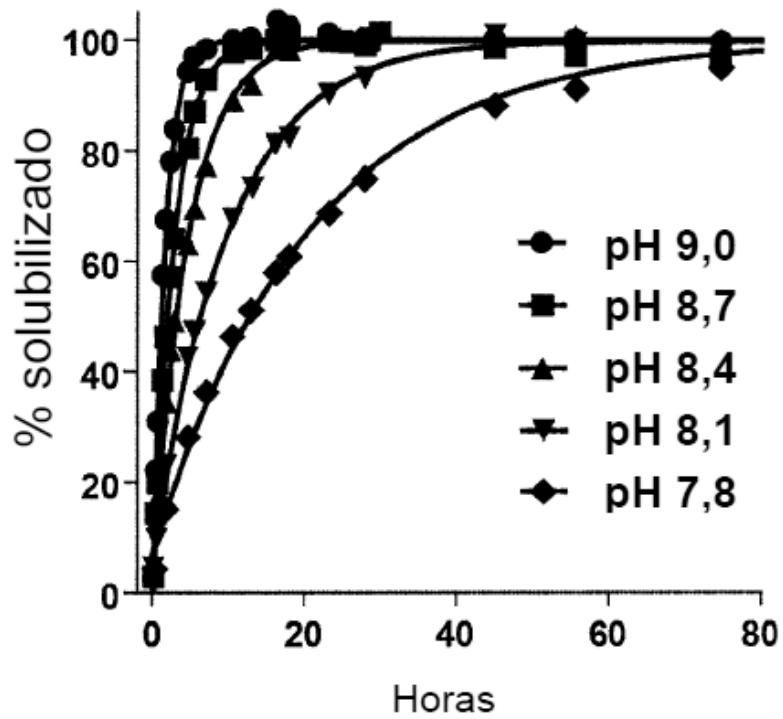


Figura 8

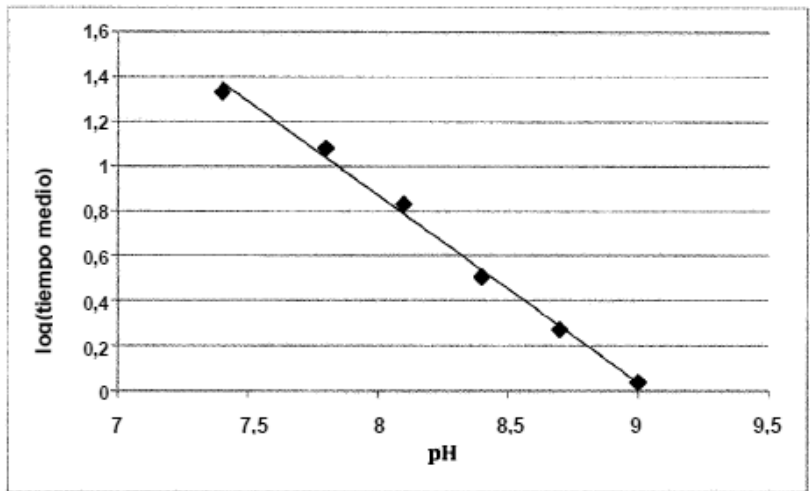


Figura 9

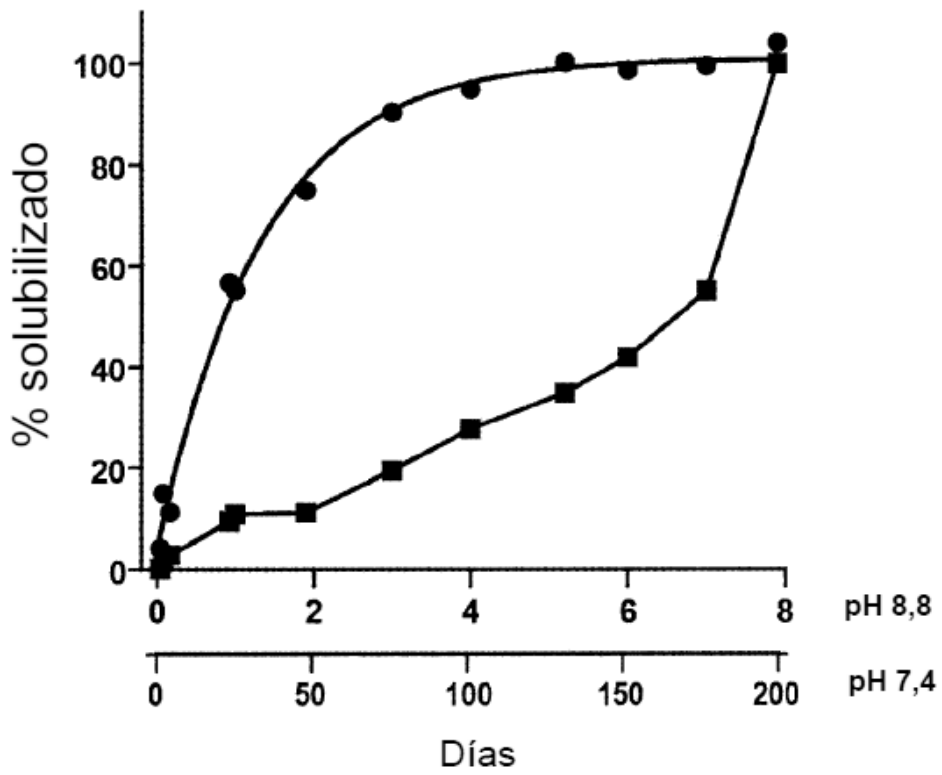


Figura 10

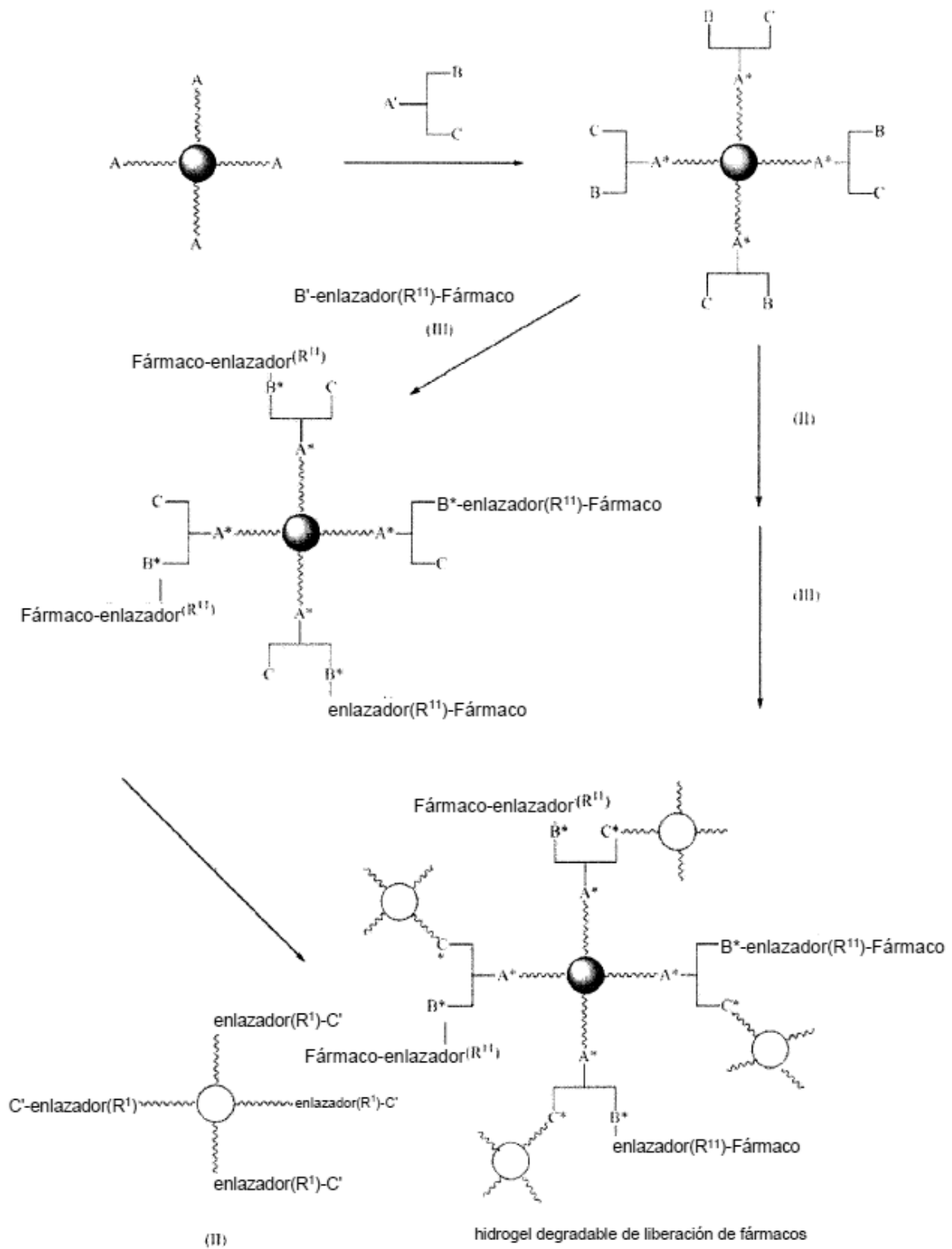


Figura 11