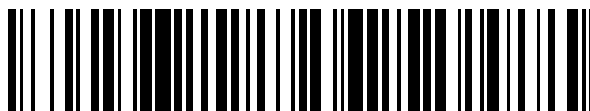


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 524**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/59 (2007.01)
A61K 47/58 (2007.01)
A61K 47/61 (2007.01)
A61K 47/64 (2007.01)
A61K 47/69 (2007.01)
C07D 207/46 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2005** **PCT/EP2005/003061**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2005** **WO05099768**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2005** **E 05716306 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 1732607**

54 Título: **Profármaco polimérico con un enlazador autoinmolador**

30 Prioridad:

23.03.2004 EP 04075892
05.07.2004 GB 0415043
13.08.2004 EP 04019293

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 741 524 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

Profármaco polimérico con un enlazador autoinmolador

Campo

- 5 La presente invención está dirigida a profármacos poliméricos que tienen enlaces temporales a grupos amino de entidades biológicamente activas tales como péptidos, proteínas, productos naturales o compuestos químicos sintéticos.

Antecedentes

- 10 Normalmente, los polímeros se usan de forma no covalente, con el compuesto del fármaco formulado de forma fisicoquímica en una mezcla de disolvente-polímero, o mediante la unión covalente permanente de un reactivo polimérico a uno de los grupos funcionales del fármaco.

- 15 La encapsulación de fármacos no covalentes se ha aplicado a formulaciones de deposición para perfiles de liberación de acción prolongada. Normalmente, el fármaco se mezcla con material polimérico y se procesa de tal manera que el fármaco se distribuye por todo el material polimérico a granel. Dichos agregados polímero-proteína pueden tener la forma de micropartículas que se administran como una suspensión inyectable o se formulan como geles que se administran en una sola inyección de bolos. La liberación del fármaco se produce cuando el polímero se hincha o la degradación del polímero permite la difusión del fármaco hacia el exterior. Tales procesos de degradación pueden ser autohidrolíticos o catalizados por enzimas. Un ejemplo de un medicamento comercializado basado en la administración en bolo de un gel de polímero-fármaco es Lupron Depot. Un ejemplo de un medicamento comercializado basado en micropartículas suspendidas es Nutropin Depot.

- 20 Una desventaja de la metodología no covalente es que, para evitar la liberación descontrolada y no controlada del fármaco, la encapsulación debe ser altamente eficiente al crear un entorno muy saturado estéricamente. La restricción de la difusión de una molécula de fármaco soluble en agua no unida requiere fuertes contactos de van der Waals, a menudo mediados por unidades estructurales hidrófobas. Muchos agentes terapéuticos conformacionalmente sensibles tales como proteínas o péptidos se vuelven disfuncionales durante el proceso de encapsulación y/o durante el almacenamiento posterior. Además, tales compuestos farmacológicos que contienen amino experimentan fácilmente reacciones secundarias con productos de degradación de polímeros (D.H. Lee et al., J. Contr. Rel., 2003, 92, 291-299). Además, la dependencia del mecanismo de liberación de la biodegradación puede causar variabilidad entre pacientes.

- 30 Como alternativa, los fármacos pueden conjugarse con polímeros a través de enlaces covalentes permanentes. Esta metodología se aplica a diversas clases de moléculas, desde las llamadas moléculas pequeñas, pasando por productos naturales hasta proteínas más grandes.

- 35 Muchos agentes medicinales de moléculas pequeñas, como los alcaloides y los agentes antitumorales, muestran baja solubilidad en fluidos acuosos. Una forma era solubilizar estos compuestos de moléculas pequeñas para conjugarlos con polímeros hidrófilos. Una variedad de polímeros solubles en agua, como la albúmina de suero humano, dextrano, lectinas, poli(etilenglicol) (PEG), poli(estireno-co-anhídrido maleico), poli(N-hidroxipropilmetacrilamida), poli(divinil éter-co-anhídrido maleico), ácido hialurónico, se han descrito para este propósito (R. Duncan, Nature Rev. Drug Disc., 2003, 2, 347-360).

- 40 Un reto importante en la terapia del cáncer es dirigir selectivamente agentes citotóxicos a células tumorales. Un método prometedor para acumular agentes anticancerígenos de moléculas pequeñas en el tejido tumoral y disminuir los efectos secundarios indeseables de estos agentes es la unión de la citotoxina a un portador macromolecular. La orientación pasiva de los conjugados de fármacos poliméricos a los tumores se basa en el llamado efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) descrito por Matsumura, Y. y Maeda, H., en Cancer Res., 1986, vol. 6, páginas 6387-6392. Como resultado, varios conjugados polímero-fármaco han entrado en ensayos clínicos como agentes anticancerígenos.

- 45 La modificación covalente de las moléculas biológicas con poli(etilenglicol) ha sido ampliamente estudiada desde fines de los años setenta. Las llamadas proteínas PEGiladas han demostrado una eficacia terapéutica mejorada al aumentar la solubilidad, reducir la inmunogenicidad y aumentar la vida media de la circulación in vivo debido a la reducción de la eliminación renal y la proteólisis por enzimas (véase, por ejemplo, Caliceti P., Veronse F.M., Adv. Drug. Deliv. Rev. 2003, 55, 1261-1277).

- 50 Sin embargo, muchos agentes medicinales como INFalpha2, saquinavir o somatostatina son inactivos o muestran una actividad biológica disminuida cuando un polímero se conjuga covalentemente con la molécula del fármaco (T. Peleg-Shulman et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 4897-4904).

- 55 Con el fin de evitar las deficiencias impuestas por las mezclas de polímeros no covalentes o la unión covalente permanente, puede ser preferible emplear una metodología profármaco para la conjugación química del fármaco al vehículo polimérico. En tales profármacos poliméricos, las unidades estructurales biológicamente activas están unidas

típicamente a la unidad estructural portador polimérica mediante un enlace temporal formado entre la unidad estructural portadora y un grupo hidroxilo, amino o carboxi de la molécula de fármaco (tal como se muestra en la Figura 1).

Los profármacos son agentes terapéuticos que son casi inactivos per se, pero se transforman de manera predecible en metabolitos activos (véase B. Testa, J.M. Mayer en *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Wiley-VCH, 2003, página 4). La metodología del profármaco portador se puede aplicar de tal manera que el agente medicinal se libere in vivo del polímero para recuperar su actividad biológica. La actividad biológica reducida del profármaco en comparación con el fármaco liberado es ventajosa si se desea una liberación lenta o controlada del fármaco. En este caso, se puede administrar una cantidad relativamente grande de profármaco sin efectos secundarios concomitantes y el riesgo de sobredosis. La liberación del fármaco ocurre con el tiempo, lo que reduce la necesidad de una administración repetida y frecuente del fármaco.

La activación del profármaco puede producirse por escisión enzimática o no enzimática del enlace temporal entre el vehículo y la molécula de fármaco, o una combinación secuencial de ambos, es decir, una etapa enzimática seguida de un reordenamiento no enzimático. En un entorno in vitro libre de enzimas, como una solución reguladora acuosa, un enlace temporal como un éster o una amida puede sufrir hidrólisis, pero la rata correspondiente de hidrólisis puede ser demasiado lenta y no es terapéuticamente útil. En un ambiente in vivo, las esterasas o las amidas están típicamente presentes y pueden causar una aceleración catalítica significativa de la cinética de la hidrólisis desde dos hasta varios órdenes de magnitud (véase, por ejemplo, R.B. Greenwald et al. *J. Med. Chem.* 1999, 42(18), 3857-3867).

Definiciones basadas en IUPAC

(como se indica en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/> (consultado el 8 de marzo de 2004).

Profármaco

Un profármaco es cualquier compuesto que experimenta biotransformación antes de mostrar sus efectos farmacológicos. Por lo tanto, los profármacos pueden verse como medicamentos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados que se usan de manera transitoria para alterar o eliminar propiedades indeseables en la molécula original.

Profármaco ligado a portador (profármaco portador)

Un profármaco ligado a un portador es un profármaco que contiene un enlace temporal de una sustancia activa dada con un grupo portador transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y que puede eliminarse fácilmente in vivo, generalmente por una escisión hidrolítica. Esto se muestra gráficamente en la Figura 1.

Profármaco en cascada

Un profármaco en cascada es un profármaco portador para el cual la escisión del grupo portador se hace efectiva solo después de desenmascarar un grupo activador.

Profármaco polimérico en cascada

Un profármaco polimérico en cascada es un profármaco portador que contiene un enlace temporal de una sustancia activa dada con un grupo portador polimérico transitorio para el cual la escisión del portador se hace efectiva solo después de desenmascarar un grupo activador.

Profármaco bioprecursor

Un profármaco bioprecursor es un profármaco que no implica el enlace a un grupo portador, sino que resulta de una modificación molecular del principio activo en sí. Esta modificación genera un nuevo compuesto, que se puede transformar metabólicamente o químicamente, y el compuesto resultante es el principio activo.

Biotransformación

La biotransformación es la conversión química de sustancias por organismos vivos o preparaciones de enzimas.

Los profármacos se clasifican en dos clases, bioprecursores y profármacos ligados a portadores. Los bioprecursores no contienen un grupo portador y se activan mediante la creación metabólica de un grupo funcional. En profármacos ligados a portadores, la sustancia activa está enlazada a una unidad estructural portadora por un enlace temporal. Esta invención se refiere a profármacos poliméricos unidos a portadores o profármacos macromoleculares, en los que el propio portador es una macromolécula tal como una proteína portadora o polisacárido o polietilenglicol. Específicamente, la invención se refiere a profármacos unidos a un vehículo polimérico para los cuales esta división entre el polímero y el fármaco se realiza en dos etapas de acuerdo con un mecanismo en cascada.

La escisión de un profármaco portador genera una entidad molecular (fármaco) de bioactividad incrementada y al menos un producto secundario, el portador. Este producto secundario puede ser biológicamente inerte (por ejemplo,

PEG) o puede tener propiedades de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpos). Después de la escisión, la entidad bioactiva revelará al menos un grupo funcional previamente conjugado y, por lo tanto, protegido, y la presencia de este grupo contribuye típicamente a la bioactividad del fármaco.

- 5 Para implementar una estrategia de profármaco, se emplea al menos un cierto grupo funcional en la molécula de fármaco para la unión del polímero portador. Los grupos funcionales preferidos son grupos hidroxilo o amino. En consecuencia, tanto la química de unión como las condiciones de hidrólisis varían mucho entre estas dos funcionalidades.

- 10 En un mecanismo simple de un solo paso, el enlace temporal del profármaco se caracteriza por una labilidad intrínseca o dependencia de la enzima. La susceptibilidad de este enlace a la hidrólisis en un ambiente acuoso con o sin catálisis enzimática controla la cinética de escisión entre el vehículo polimérico y el fármaco. Numerosos profármacos macromoleculares se describen en la literatura donde el enlace temporal es un enlace éster lábil. En estos casos, el grupo funcional proporcionado por la entidad bioactiva es un grupo hidroxilo o un ácido carboxílico (por ejemplo, Y. Luo, MR Ziebell, GD Prestwich, "A Hyaluronic Acid-Taxol Antitumor Bioconjugate Targeted to Cancer Cells", *Biomacromolecules* 2000, 1, 208-218, J Cheng et al, Synthesis of Linear, betaCyclodextrin Based Polymers and Their Camptothecin Conjugates, *Bioconjugate Chem.* 2003, 14, 1007-1017, R. Bhatt et al, Synthesis and in Vivo Antitumor Activity of Poly(L-glutamic acid) Conjugates of 20(S)-Camptothecin, *J. Med. Chem.* 2003, 46, 190-193; R.B. Greenwald, A. Pendri, C.D. Conover, H. Zhao, Y.H. Choe, A. Martinez, K. Shum, S. Guan, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3657-3667; B. Testa, J.M. Mayer in *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Wiley-VCH, 2003, Capítulo 8).

- 20 Especialmente para biomacromoléculas terapéuticas, pero también para ciertos fármacos de molécula pequeña, puede ser deseable vincular el portador macromolecular a grupos amino de la entidad bioactiva (es decir, grupos amino de N-terminal o lisina amino de proteínas). Este será el caso si el enmascaramiento de la bioactividad del medicamento requiere la conjugación de un cierto grupo amino de la entidad bioactiva, por ejemplo, un grupo amino ubicado en un centro activo o una región o epítipo involucrado en la unión del receptor. Además, durante la preparación del profármaco, los grupos amino pueden dirigirse de manera más quimioselectiva y servir como un mejor
- 25 manejo para conjugar el vehículo y el fármaco debido a su mayor nucleofilicidad en comparación con los grupos hidroxílicos o fenólicos. Esto es particularmente cierto para proteínas que pueden contener una gran variedad de funcionalidades reactivas diferentes, donde las reacciones de conjugación no selectivas conducen a mezclas de productos no deseados que requieren una caracterización o purificación extensas y pueden disminuir el rendimiento de la reacción y la eficacia terapéutica del producto.

- 30 Los enlaces amida, así como los carbamatos alifáticos, son mucho más estables a la hidrólisis que los enlaces éster, y la rata de aumento sería demasiado lenta para la utilidad terapéutica en un profármaco ligado a un vehículo. Por lo tanto, es ventajoso añadir componentes químicos estructurales tales como grupos vecinos para ejercer control sobre la escisión del enlace amida del profármaco. Dichas estructuras químicas adicionales que controlan la escisión que no son proporcionadas por la entidad portadora ni por el medicamento se denominan enlazadores. Los enlazadores de profármacos pueden tener un fuerte efecto en la velocidad de hidrólisis de un enlace temporal dado. La variación de la naturaleza química de estos enlazadores permite diseñar las propiedades del enlazador en gran medida.

Por ejemplo, los enlazadores de profármacos pueden diseñarse para la selectividad enzimática. El requisito previo para la dependencia enzimática es que la estructura del enlazador muestre un motivo estructural que sea reconocido como un sustrato por una enzima endógena correspondiente (Figura 2).

- 40 La aceleración catalizada por enzimas de la escisión del profármaco es una característica deseable para aplicaciones de selección de órganos o celulares. La liberación dirigida de la entidad bioactiva se efectúa, si una enzima, que corta selectivamente el enlace está específicamente presente en el órgano o tipo de célula elegido para el tratamiento.

- 45 Una propiedad típica de un enlace temporal dependiente de enzimas es su estabilidad con respecto a la hidrólisis. El enlace temporal en sí no sufrirá autohidrólisis a una velocidad que liberaría el fármaco en tal medida que se pudiera inducir un efecto terapéutico en un régimen de dosificación normal. Es solo en presencia de la enzima, que el ataque de la enzima en el enlace provoca una aceleración significativa de la escisión y, concomitantemente, un aumento de la concentración de fármaco libre.

- 50 Se han publicado varios ejemplos para la activación de profármacos de unidades estructurales biológicamente activas que contienen amina por enzimas específicas para la liberación dirigida. En estos casos, la escisión se produce en un proceso de un solo paso que es catalizado por la enzima. G. Cavallaro et al., *Bioconjugate Chem.* 2001, 12, 143-151 describen la liberación enzimática de un agente antitumoral por la proteasa plasmina. La citarabina se acopla a través de la secuencia tripeptídica D-Val-Leu-Lys al polímero alfa, beta-poli(N-hidroxietil)-DL-aspartamida (PHEA). La liberación enzimática de citarabina se efectúa por la proteasa plasmina, cuya concentración es relativamente alta en varios tipos de masa tumoral.

- 55 Otros ejemplos de profármacos antitumorales poliméricos activados por enzimas específicas como la beta lactamasa (R. Satchi-Fainaro et al., *Bioconjugate Chem.* 2003, 14, 797-804) y cisteína proteasas como la cathepsina B (R. Duncan et al. *J. Contr. Release* 2001, 74, 135-146) han sido descritos. Wiwattanapatapee et al. (2003) esbozan un profármaco dendrímero para el suministro colónico de ácido 5-aminosalicílico. La molécula de fármaco se conjuga mediante un

enlace azo al dendrímero PAMAM de la "generación 3". El ácido 5-aminosalicílico se libera en el colon por una enzima bacteriana llamada azo reductasa (W. R. Wiwattanapatapee, L. Lomlim, K. Saramunee, J. Controlled Release, 2003, 88: 1-9).

A.J. Garman et al. (A.J. Garman, S.B. Kalindjian, FEBS Lett. 1987, 223(2), 361-365 1987) usa PEG5000-anhídrido maleico para la modificación reversible de grupos amino en el activador del plasminógeno de tipo tisular y la uroquinasa. La regeneración de la enzima funcional a partir del conjugado PEG-uPA después de la incubación a pH 7.4 de regulador por escisión del enlace de ácido maléico sigue una cinética de primer orden con una vida media de 6.1 h. La escisión del profármaco no se investigó en presencia de enzimas, y se puede esperar, como se explicó anteriormente, que las proteasas presentes en el entorno in vivo contribuirán significativamente a la escisión del enlace amida temporal. Una desventaja adicional de este enlace es la falta de estabilidad del conjugado a valores de pH más bajos. Esto limita la aplicabilidad del enlazador a los agentes activos que son estables a valores de pH básicos, ya que la purificación del conjugado polimérico del agente activo se debe realizar en condiciones básicas para prevenir la escisión prematura del profármaco.

Los mecanismos de cascada han demostrado ser particularmente útiles en la liberación controlada de fármacos que contienen funcionalidades de grupos amino debido a que las características de división del enlazador pueden optimizarse con mayor flexibilidad que en los profármacos simples de un solo paso.

La división en cascada está habilitada por compuestos enlazadores que se componen de una combinación estructural de un grupo de enmascaramiento y un grupo activador. El grupo de enmascaramiento se une al grupo de activación por medio de un primer enlace temporal, como un éster o un carbamato. El grupo activador está unido a un grupo amino de la molécula de fármaco a través de un segundo enlace temporal, por ejemplo, un carbamato. La estabilidad o susceptibilidad a la hidrólisis del segundo enlace temporal depende de la presencia o ausencia del grupo de enmascaramiento. En presencia del grupo de enmascaramiento, el segundo enlace temporal es altamente estable y es poco probable que libere el fármaco con una cinética terapéuticamente útil. En ausencia del grupo de enmascaramiento, este enlace se vuelve altamente lábil, causando una rápida escisión y liberación del fármaco.

La escisión del primer enlace temporal es el paso limitante de la velocidad en el mecanismo en cascada. Este primer paso puede inducir un reordenamiento molecular del grupo activador, como una eliminación de 1,6. El reordenamiento hace que el segundo enlace temporal sea mucho más lábil que se induce su escisión. Idealmente, la rata de escisión del primer enlace temporal es idéntica a la rata de liberación deseada para la molécula de fármaco en un escenario terapéutico dado. Además, es deseable que la escisión del segundo enlace temporal sea instantánea después de que se haya inducido su labilidad por la escisión del primer enlace temporal.

Existe una variedad de ejemplos para profármacos portadores en cascada en los que la funcionalidad del grupo de enmascaramiento es realizada por el propio polímero portador como se muestra esquemáticamente en la Figura 3. En los sistemas que se describen a continuación, el grupo de enmascaramiento no es solo parte del portador, sino que también se ha diseñado para la dependencia de enzimas (Figura 4). Solo en presencia de una enzima correspondiente es la velocidad de escisión del primer enlace temporal suficientemente acelerada para uso terapéutico.

R. B. Greenwald, A. Pendri, C.D. Conover, H. Zhao, Y.H. Choe, A. Martínez, K. Shum, S. Guan, J. Med. Chem., 1999, 42, 3657-3667 y la Solicitud de Patente PCT WO-A-99/30727 describen una metodología para sintetizar profármacos de poli(etilenglicol) de compuestos de moléculas pequeñas que contienen amino basados en la eliminación de 1,4- o 1,6-bencilo. En este enfoque, el poli(etilenglicol) como vehículo polimérico se une al grupo bencilo por medio de un primer enlace temporal, como un enlace éster, carbonato, carbamato o amida. El grupo bencilo sirve como grupo activador, y el polímero PEG también tiene la función del grupo de enmascaramiento en este mecanismo de escisión en cascada. El grupo amino de la molécula de fármaco está unido a través de un segundo enlace temporal, que contiene un grupo carbamato, a la unidad estructural bencilo. La liberación de PEG de la molécula de fármaco se inicia mediante la escisión enzimática del primer enlace temporal seguida de una eliminación rápida de 1,4- o 1,6-bencilo, iniciando la escisión del segundo enlace temporal.

El mismo sistema enlazador también se usa para conjugados de poli(etilenglicol) liberables de proteínas (S. Lee, R. B. Greenwald et al., Bioconj. Chem. 2001, 12(2), 163-169). La lisozima se usa como proteína modelo porque pierde su actividad cuando la PEGilación tiene lugar en el grupo épsilon-amino de los residuos de lisina. Se conjugaron diversas cantidades de enlazador de PEG con la proteína. La regeneración de la proteína nativa a partir de los conjugados de PEG se produce por escisión enzimática en plasma de rata o en regulador no fisiológico de pH alto.

Greenwald et al., publicó en 2000 un sistema de administración de fármacos de poli(etilenglicol) de profármacos que contienen amino basados en la lactonización con bloqueo de trimetilo (R.B. Greenwald et al. J. Med. Chem. 2000, 43(3), 457-487; Solicitud de Patente PCT No. WO-A-02/089789). En este sistema de profármacos, el ácido o-hidroxifenil-dimetilpropiónico sustituido está unido a PEG por un grupo éster, carbonato o carbamato como primer enlace temporal y a grupos amino de moléculas de fármaco por medio de un enlace amida como segundo enlace temporal. El paso determinante de la velocidad en la liberación del fármaco es la escisión enzimática del primer enlace. Este paso es seguido por la rápida escisión de la amida por la lactonización, liberando un producto secundario de lactona aromática potencialmente tóxico.

Sistemas de profármacos similares fueron descritos por F.M.H. DeGroot et al. (WO02083180 y WO04043493A1) y D. Shabat et al. (WO04019993A1). El documento WO02083180 describe un sistema de profármacos con enlaces alargados y múltiples basados en 1,(4+2n) eliminación. Las unidades estructurales de enmascaramiento en estos ejemplos se diseñaron específicamente para la escisión enzimática. Este enfoque se extendió al sistema de profármacos dendríticos donde un evento de activación enzimática desencadenó la liberación de más de una molécula de fármaco (documento WO04043493A1). El documento WO04019993A1 describe un sistema de profármaco similar basado en un dendrímero autoinmolativo que libera muchas unidades estructurales de fármaco en un único evento de activación enzimática. Estos sistemas se caracterizan por la ausencia de un portador polimérico. En cambio, la oligomerización de los componentes del enlazador del profármaco proporciona un alto peso molecular del profármaco, y la escisión del profármaco genera residuos del enlazador y el fármaco libre, pero no se libera ninguna entidad polimérica.

La desventaja en los sistemas de profármacos mencionados anteriormente descritos por Greenwald, DeGroot and Shabat es la liberación de productos secundarios de moléculas pequeñas aromáticas potencialmente tóxicas, como los metiuros de quinona, después de la escisión del enlace temporal. Las entidades potencialmente tóxicas se liberan en una estequiometría 1:1 con el medicamento y pueden asumir altas concentraciones in vivo. Este factor de riesgo es aún mayor si se emplean estructuras dendríticas autoinmolables basadas en oligómeros del grupo activador y se liberan más productos secundarios aromáticos que moléculas de fármaco.

Más recientemente, R. B. Greenwald et al. (Greenwald et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 726-734) describieron un sistema de profármaco PEG basado en el enlazador de amida de bis-(N-2-hidroxietil)glicina (amina de bicina). En este sistema, dos moléculas de PEG están conectadas a una molécula de bicina acoplada a un grupo amino de la molécula de fármaco. Los dos primeros pasos en la activación de profármacos es la escisión enzimática de ambas moléculas de PEG. Se describen diferentes enlaces entre PEG y bicina que dan como resultado diferentes cinéticas de activación de profármacos. La principal desventaja de este sistema es la lenta rata de hidrólisis de la amina de bicina conjugada con la molécula del fármaco ($t_{1/2} = 3$ h en regulador fosfato), lo que resulta en la liberación de un producto intermedio profármaco modificado con bicina que puede mostrar diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. en comparación con la molécula de fármaco original.

Los profármacos en cascada con grupos de enmascaramiento que forman parte del polímero portador están limitados en el control de la cinética de liberación del fármaco. Dado que la división del grupo de enmascaramiento es el paso limitante de la velocidad en el mecanismo en cascada, su estructura molecular gobierna la cinética. Si el polímero portador es idéntico al grupo de enmascaramiento, la flexibilidad estructural está restringida a las características de los polímeros. Alternativamente, si el polímero requiere una modificación estructural para cumplir los requisitos de escisión controlada, la síntesis de las estructuras correspondientes puede ser más difícil. Además, la incorporación de las características del grupo de enmascaramiento en un polímero puede cambiar su perfil de seguridad.

Por lo tanto, se prefiere separar estructuralmente el grupo de enmascaramiento y el portador. Esto se puede lograr empleando un enlace permanente entre el polímero transportador y el grupo activador. Este enlace estable no participa en el mecanismo de escisión en cascada. Si el portador no sirve como grupo de enmascaramiento y el grupo activador se acopla al portador por medio de un enlace estable, se evita la liberación de productos secundarios potencialmente tóxicos, como el grupo activador. La unión estable del grupo activador y el polímero también suprime la liberación de intermediarios de fármacos con farmacología indefinida.

Se han desarrollado sistemas para la administración dirigida de agentes terapéuticos haciendo que el grupo de enmascaramiento dependa de la enzima. Solo en presencia de una enzima correspondiente es la velocidad de escisión del primer enlace temporal que conecta el grupo de enmascaramiento con el grupo activador lo suficientemente acelerado para uso terapéutico.

Antczak et al. (Bioorg Med Chem 9 (2001) 2843-48) describe un reactivo que forma la base de un sistema de profármaco en cascada macromolecular para moléculas de fármaco que contienen amina. En esta metodología, un anticuerpo sirve como portador, un enlace estable conecta el anticuerpo a una unidad estructural activadora, que lleva un grupo de enmascaramiento enzimáticamente escindible. Tras la eliminación enzimática del grupo de enmascaramiento unido a éster, un segundo enlace temporal se escinde y libera el compuesto del fármaco, como se muestra en la Figura 6.

D. Shabat et al. (Chem. Eur. J. 2004, 10, 2626-2634) describe un sistema de profármaco polimérico basado en una unidad estructural activadora de ácido mandélico. En este sistema, el grupo de enmascaramiento está vinculado a la unidad estructural activadora por un enlace carbamato. La unidad estructural activadora se conjuga permanentemente con un polímero de poliácridamida a través de un enlace amida. Después de la activación enzimática del grupo de enmascaramiento por un anticuerpo catalítico, el grupo de enmascaramiento se escinde por ciclización y se libera el fármaco. La unidad estructural activadora todavía está conectado al polímero de poliácridamida después de la liberación del fármaco.

M.-R. Lee et al. describe (Angew. Chem. 2004, 116, 1707-1710) un sistema de profármaco similar basado en una unidad estructural activadora de ácido mandélico y un grupo de enmascaramiento unido a éster enzimáticamente escindible.

En todos estos sistemas profármaco-polímero descritos, el grupo de enmascaramiento está diseñado específicamente para ser sustrato de una enzima, y la escisión del grupo de enmascaramiento dependerá casi completamente de la catálisis enzimática con las desventajas de la variabilidad entre pacientes, la variabilidad del sitio de inyección y la pobre correlación in vitro-in vivo.

- 5 Un inconveniente importante de la escisión predominantemente enzimática es la variabilidad entre pacientes. Los niveles de enzima pueden diferir significativamente entre los individuos, lo que resulta en una variación biológica de la activación del profármaco por escisión enzimática. Los niveles de enzima también pueden variar según el lugar de administración, por ejemplo, se sabe que, en el caso de la inyección subcutánea, ciertas áreas del cuerpo producen efectos terapéuticos más predecibles que otras. Para reducir este efecto impredecible, el corte no enzimático o la
- 10 catálisis intramolecular son de particular interés (véase, por ejemplo, B. Testa, J.M: Mayer in Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism, Wiley-VCH, 2003, página 5).

Además, es difícil establecer una correlación in vivo-in vitro de las propiedades farmacocinéticas para tales profármacos ligados a portadores dependientes de enzimas. En ausencia de una sólida correlación in vivo-in vitro, la optimización de un perfil de liberación se convierte en una tarea incómoda.

- 15 Además, la necesidad de selectividad enzimática impone una severa limitación en las características estructurales que se pueden usar en el enlazador de profármaco. Esta restricción dificulta en gran medida el desarrollo de una sólida relación estructura-actividad y, en consecuencia, la optimización de la cinética de escisión del enlazador.

- Por estas razones, existe la necesidad de proporcionar nuevas tecnologías de enlazador y/o portador para formar profármacos poliméricos de agentes activos que contienen amina para superar las limitaciones de los profármacos poliméricos descritos.
- 20

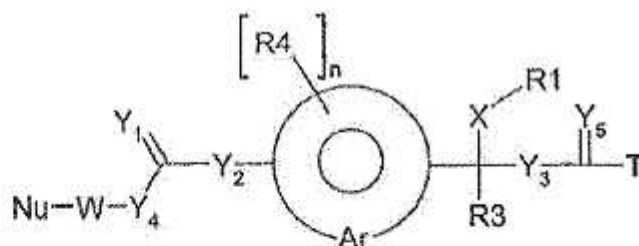
Descripción detallada de la invención

La presente invención aborda las desventajas descritas anteriormente. La invención proporciona profármacos poliméricos en cascada caracterizados por un grupo de enmascaramiento que contiene un nucleófilo y que es distinto del portador.

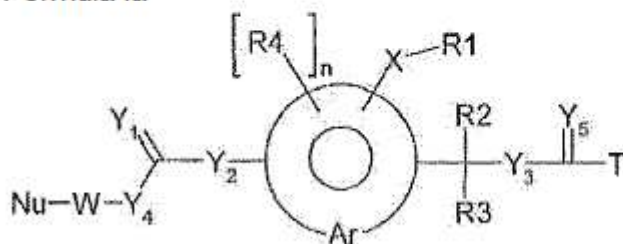
- 25 El nucleófilo está a una distancia adecuada para un primer enlace temporal con un grupo activador aromático capaz de experimentar una reacción de eliminación 1,(4+2p) (con p=0, 1, 2, 3, 4, ...) después de la escisión del primer enlace temporal. La invención se caracteriza además porque el grupo activador está conectado al grupo amino de una molécula de fármaco a través de un segundo enlace temporal que se escinde como consecuencia de la eliminación 1, (4+2p). Una característica estructural adicional es la unión de un portador polimérico al grupo activador por medio
- 30 de un enlace permanente.

Los grupos de enmascaramiento de acuerdo con la presente invención contienen al menos un nucleófilo Nu. Este nucleófilo, que puede ser, por ejemplo, un grupo amino primario, secundario o terciario puede ayudar a la escisión del grupo de enmascaramiento de la unidad estructural activadora mediante catálisis o ciclización intramolecular.

- 35 La invención proporciona profármacos poliméricos en cascada de Fórmula Ia o Ib. También se describen los correspondientes reactivos enlazadores de profármacos en cascada poliméricos de Fórmula Ia o Ib.



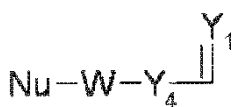
Fórmula Ia



Fórmula Ib

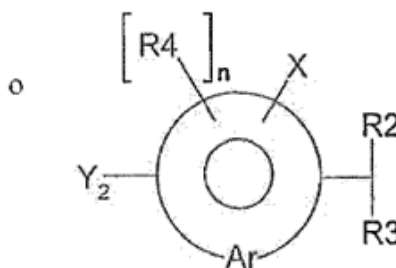
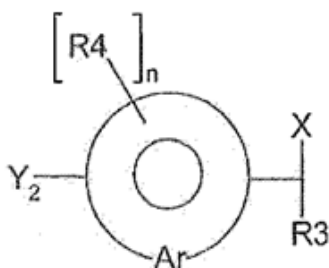
en donde Y₁ a Y₅, R₁ a R₄, T, X, W, Nu y Ar se definen a continuación:

La liberación de drogas nativas se efectúa por un mecanismo de dos pasos. El primer paso es la división determinante de la velocidad del primer enlace temporal entre el grupo de enmascaramiento



5

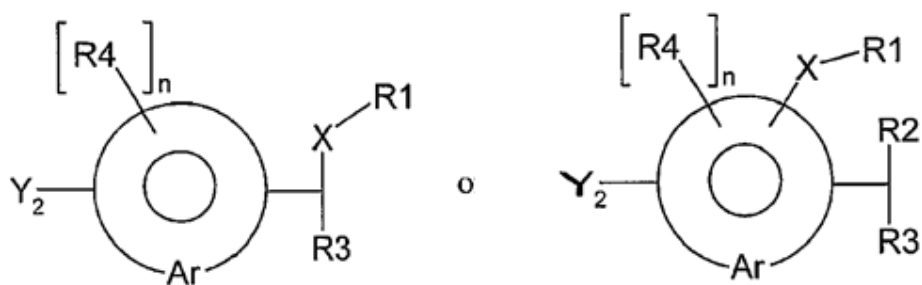
y la porción activadora



del profármaco polimérico in vivo.

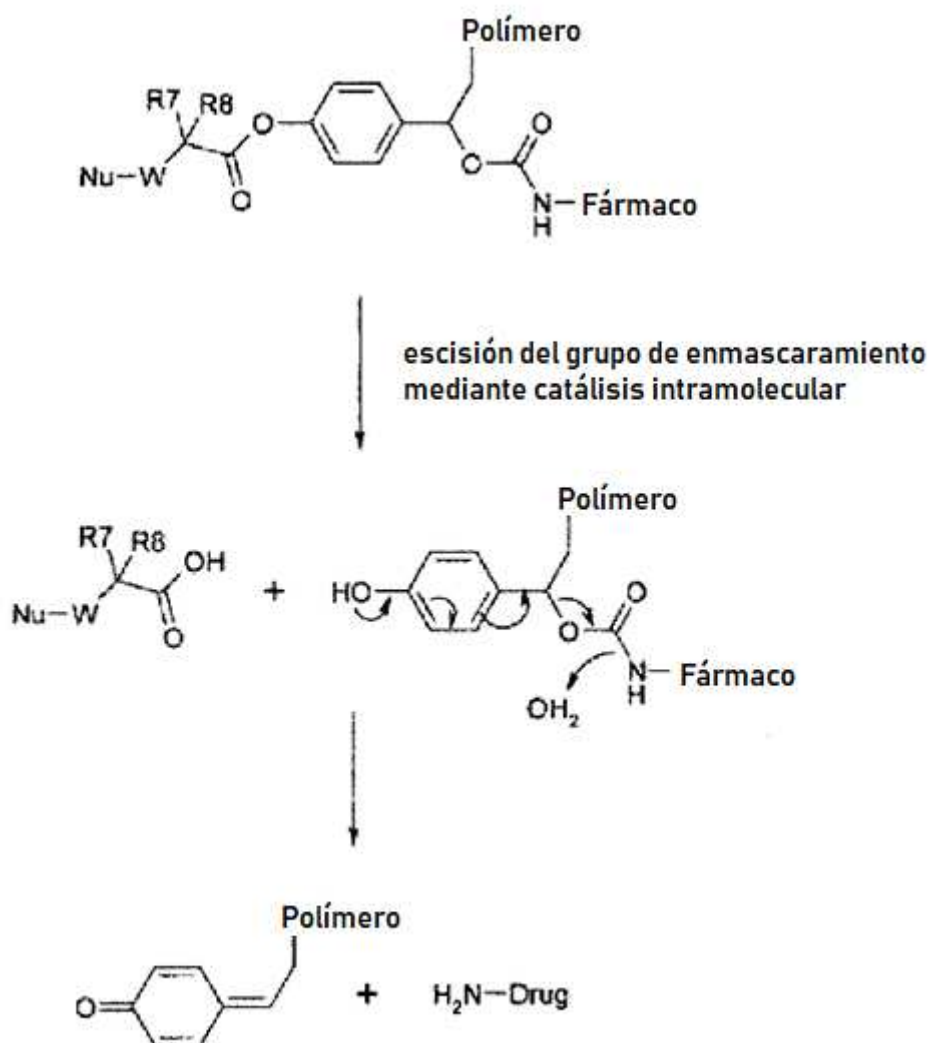
10 Como se describió anteriormente, la escisión del grupo de enmascaramiento puede estar mediada por una etapa enzimática o no enzimática, tal como hidrólisis dependiente del pH o ciclización intramolecular. En la realización preferida de la invención, la escisión se efectúa no enzimáticamente mediante ciclización o catálisis intramolecular. La vida media de la cinética de escisión en un regulador acuoso de pH 7.4 a 37°C del grupo de enmascaramiento según la presente invención es preferiblemente entre 1 hora y 6 meses, más preferiblemente entre 1 día y 3 meses, y lo más preferiblemente entre 1 día y 2 meses.

15 El segundo y último paso en la liberación del fármaco nativo regenerado es el llamado, rápido, espontáneo e irreversible, llamado 1,4 o 1,6 o 1,(4+2p) (en donde p=2, 3, 4 o superior) eliminación de la unidad estructural



del profármaco polimérico restante de fórmula Ia o fórmula Ib, respectivamente.

Este mecanismo de liberación de fármaco nativo a partir de un profármaco polimérico desencadenado por escisión hidrolítica del grupo de enmascaramiento seguido por una etapa de eliminación 1,6 del grupo activador se ejemplifica mediante un profármaco polimérico de acuerdo con la presente invención.



Definición de Y₁ a Y₅, R₁ a R₄, T, X, W, Nu y Ar en la fórmula Ia o Ib

T es D. También se describe, T es A.

Se describe un reactivo enlazador de profármaco en cascada polimérico, donde T es A y A es un grupo saliente. Ejemplos de grupos salientes A adecuados incluyen cloruro, bromuro, fluoruro, nitrofenoxi, imidazolilo, N-

hidroxisuccinimidilo, N-hidroxibenzotriazolilo, N-hidroxiazobenzotriazolilo, pentafluorfenoxi, N-hidroxisulfosuccinimidilo, o cualquier otro grupo saliente conocido por los expertos en la técnica.

La estructura de la invención es un profármaco polimérico en cascada, T es D, y

- 5 D es un residuo de una unidad estructural biológicamente activa que contiene amina, que está conectada a la unidad estructural de la molécula a través de un grupo amina. Preferiblemente, D se selecciona del grupo de unidades estructurales biológicamente activas que consisten en agentes bioactivos y biopolímeros de moléculas pequeñas. Los biopolímeros se seleccionan del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos, oligonucleótidos (ARN, ADN) y ácidos nucleicos peptídicos (ANP).

- 10 Nótese que en esta descripción a menudo se hace referencia a profármacos. Un verdadero profármaco se encuentra cuando T es el residuo del material o unidad estructural biológicamente activa que contiene amina. Si T es un grupo saliente A, entonces la fórmula representa un reactivo enlazador de profármaco en cascada polimérico. Por simplicidad, estos serán referidos a profármacos en esta descripción. Se entenderá a partir del contexto si indica un profármaco verdadero o un reactivo como precursor.

- 15 Las unidades estructurales bioactivas de moléculas pequeñas orgánicas adecuadas incluyen unidades estructurales tales como agentes activos para el sistema nervioso central, antiinfecciosos, antineoplásicos, agentes antibacterianos, antifúngicos, analgésicos, anticonceptivos, antiinflamatorios, esteroideos, vasodilatadores, vasoconstrictores y cardiovasculares con al menos un grupo amino primario o secundario. Ejemplos de tales compuestos son daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitoxantrona, aminoglutetimida, amantadina, diafenilsulfona, etambutol, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxazol, sulfaleno, clinafloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina, neomicina B, espectinomycin, kanamicina A, meropenem, dopamina, dobutamina, lisinopril, serotonina, carbutamida y acivicina.

- 25 Las proteínas y polipéptidos adecuados que tienen al menos un grupo amino libre incluyen ACTH, adenosina desaminasa, agalsidasa, albúmina, alfa-1 antitripsina (AAT), inhibidor de la alfa-1 proteinasa (API), alteplasa, anistreplasa, anrod serina proteasa, anticuerpos (monoclonales o policlonales, y fragmentos o fusiones), antitrombina III, antitripsina, aprotinina, asparaginasas, bifalina, proteínas morfogénicas óseas, calcitonina (salmón), colagenasa, ADNasa, endorfinas, enfuvirtida, encefalinas, eritropoyetinas, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisis, proteínas de fusión, hormonas estimulantes de folículos, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), galactosidasa, glucagón, péptidos similares al glucagón como GLP-1, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), proteína activadora de fosfolipasa (PLAP), gonadotropina coriónica (hCG), hemoglobinas, vacunas contra la hepatitis B, hirudina, hialuronidasas, iduronidasas, inmunoglobulinas, vacunas contra la influenza, interleucinas (1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12), antagonista del receptor IL-1 (rhIL-1ra), insulinas, interferones (alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a, gamma 1b), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factores de crecimiento transformantes, lactasa, leuprolida, levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna para Lyme, péptido natriurético, pancrelipasa, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH), prolactina, proteína C, octreotida, secretina, sermorelina, superóxido dismutasa (SOD), somatropinas (hormona de crecimiento), somatostatina, estreptoquinasa, sucrasa, fragmento de toxina tetánica, tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tiotropina, factor de necrosis tumoral (TNF), receptor de TNF-IgG Fc, activador del plasminógeno tisular (tPA), TSH, urato oxidasa,

- 40 uroquinasa, vacunas y proteínas vegetales como las lectinas o las ricinas.

En este documento también se incluye cualquier polipéptido sintético o cualquier porción de un polipéptido con bioactividad in vivo. Además, se incluyen proteínas preparadas por tecnología de ADN recombinante que incluyen versiones mutantes de proteínas mencionadas anteriormente, fragmentos de anticuerpos, proteínas de unión de cadena simple, anticuerpos catalíticos y proteínas de fusión.

- 45 Las proteínas preferidas son anticuerpos, calcitonina, G-CSF, GM-CSF, eritropoyetinas, hemoglobinas, interleucinas, insulinas, interferones, SOD, somatropina, TNF, TNF-receptor-IgG Fc y péptidos similares al glucagón como GLP-1.

X es una unidad estructural espaciadora tal como R5-Y6.

Y₁, Y₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O y S;

Y₃, Y₅ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O y S;

- 50 Y₄ es O, NR₆ o -C(R₇)(R₈)-;

Y₆ es O, S, NR₆, succinimida, maleimida, un enlace carbono-carbono insaturado, cualquier heteroátomo que contenga un par de electrones libres, o está ausente.

R2 y R3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; heteroarilos sustituidos o no sustituidos; ciano; nitro; halógeno; carboxi; carboxialquilo; alquilcarbonilo y carboxamidoalquilo.

5 El término "heteroalquilo" en el contexto de la presente invención denota cadenas de alquilo (lineales, cíclicas o ramificadas) en las que las cadenas de alquilo contienen o están sustituidas en cualquier posición uno o más heteroátomos, seleccionados independientemente de O, S, N, P, Si, Cl, F, Br, I o grupos, seleccionados independientemente de carboxamida, éster carboxílico, éster de fosfonato, éster de fosfato, enlaces dobles o triples, carbamato, urea, tiourea, tiocarbamato, oxima, ciano, carboxilo y carbonilo.

10 Cada sustitución de R4 en Ar puede ser igual o diferente y se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilo; arilo sustituido; heteroarilo sustituido o no sustituido; alcoxi sustituido, no sustituido, lineal, ramificado o cíclico; heteroalquiloxi lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; ariloxi; heteroariloxi; ciano y halógeno.

R4 se selecciona preferiblemente de sustituyentes pequeños tales como hidrógeno, metilo, etilo, etoxi, metoxi y otros alquilos y heteroalquilos lineales, cíclicos o ramificados de C1 a C6.

15 n es cero o un entero positivo.

R7 y R8 se seleccionan independientemente de hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico, arilo, arilo sustituido o no sustituido; heteroarilos sustituidos o no sustituidos; carboxialquilo; alquilcarbonilo; carboxamidoalquilo; ciano y halógeno.

20 R5 se selecciona del grupo que consiste en alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; y heteroarilos sustituidos o no sustituidos.

R6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; y heteroarilos sustituidos o no sustituidos.

R1 es un polímero.

25 Ejemplos de polímeros adecuados son polímeros basados en polialquiloxi como poli(propilenglicol) o poli(etilenglicol); dextrano, quitosano, ácido hialurónico, alginato, xilano, manano, carragenano, agarosa, celulosa, almidón, hidroxietil almidón (HES) y otros polímeros a base de carbohidratos; poli(alcoholes vinílicos); poli(oxazolininas); poli(anhídridos); poli(ortoésteres); poli(carbonatos); poli(uretanos); poli(ácidos acrílicos); poli(acrilamidas) tales como poli(hidroxipropilmetacrilamida) (HMPA); poli(acrilatos); poli(metacrilatos) como poli(metacrilato de hidroxietilo); poli(organofofosfazenos); poli(siloxanos); poli(vinilpirrolidona); poli(cianoacrilatos); poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o poli(ácidos glicólicos); poli(iminocarbonatos); poli(aminoácidos) tales como poli(ácido glutámico), colágeno, gelatina; copolímeros; copolímeros injertados; polímeros reticulados; hidrogeles y copolímeros de bloque de los polímeros enumerados anteriormente.

35 Los hidrogeles pueden definirse como redes poliméricas tridimensionales, hidrófilas o anfífilas que contienen grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas de homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de enlaces químicos covalentes o físicos (interacciones iónicas, hidrófobas, enredos). Los enlaces cruzados proporcionan la estructura de red y la integridad física. Los hidrogeles exhiben una compatibilidad termodinámica con el agua que les permite hincharse en medios acuosos (véase: N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000, 50, 27-46). Las cadenas de la red están conectadas de tal manera que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros tienen dimensiones de entre 40 1 y 1000 nm. Seleccionando ciertas condiciones de polimerización, el hidrogel se puede obtener en forma de un gel amorfo o como resina en perlas. Tales perlas blandas pueden tener un diámetro de entre 1 y 1000 micrómetros.

45 Los hidrogeles se pueden sintetizar a partir de los polímeros y copolímeros enumerados anteriormente y físicamente reticulados o químicamente reticulados por polimerización radical, aniónica o catiónica, por reacciones químicas como las reacciones de condensación o adición como se describe en W.E. Hennink and C.F. van Nostrum, Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 13-36.

Otros ejemplos incluyen polímeros ramificados e hiperramificados. Ejemplos de tales polímeros incluyen dendrímeros y otros polímeros en estrella densa. (R. Esfand, D.A. Tomalia, Drug Discov Today, 2001, 6(8), 427-436; P.M. Heegaard, U. Boas, Chem. Soc. Rev. 2004 (33(1), 43-63; S.M. Grayson, J.M. Frechet, Chem. Rev. 2001, 101(12), 3819-3868).

50 R1 también puede ser un biopolímero como una proteína. Ejemplos de tales proteínas incluyen albúmina, anticuerpos, fibrina, caseína y otras proteínas plasmáticas.

Cada polímero R1 puede transportar una o más sustancias biológicamente activas unidas al polímero por conjugación con un segundo enlazador de profármaco como se describe en el presente documento o cualquier otro enlazador conocido por el experto en la materia. Los polímeros pueden tener otros sustituyentes y pueden funcionalizarse para unirse a la unidad estructural espaciadora X. R1 tiene al menos un grupo funcional para la unión a X y se selecciona

del grupo que consiste en ácido carboxílico, amino, maleimida, tiol, ácido sulfónico y derivados, carbonato, carbamato, hidroxilo, aldehído, cetona, hidracina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico, ácido fosfónico, haloacetilo, haluros de alquilo, acrililo, agentes de arilación como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros como disulfuro de piridilo, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, epóxido, oxirano y aziridina.

- 5 Los grupos funcionales preferidos para el polímero R1 incluyen tiol, maleimida, amino, ácido carboxílico, carbonato, carbamato, aldehído y haloacetilo.

Los grupos funcionales especialmente preferidos incluyen tiol, maleimida, amino, ácido carboxílico y derivados, carbamato y derivados, y carbonato y derivados de los mismos.

- 10 Ejemplos de un enlace o grupo adecuado formado entre X y R1 se seleccionan del grupo que consiste en disulfuro, S-succinimida, amida, amino, éster carboxílico, sulfonamida, carbamato, carbonato, éter, oxima, hidrazona, urea, tiourea, fosfato y fosfonato.

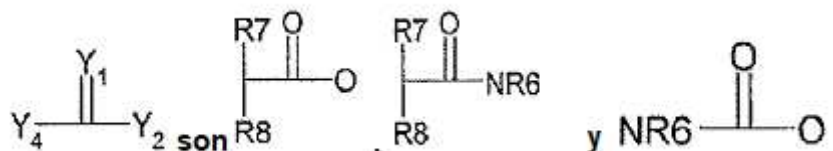
Un enlace o grupo preferido formado entre X y R1 se selecciona del grupo que consiste en S-succinimida, amida, carbamato y urea.

- 15 Preferiblemente, los polímeros R1 son bien hidratados, degradables o excretables, no tóxicos y no inmunogénicos en mamíferos. Los polímeros R1 preferidos incluyen polímeros basados en polialcoxi como polietilenglicol y reactivos de polietilenglicol como los descritos en el catálogo Nektar Inc. 2003 "Nektar Molecule Engineering-Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation" y polímeros e hidrogeles ramificados, hiperramificados y reticulados, y proteínas como la albúmina.

- 20 W se selecciona del grupo que consiste en alquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; y heteroarilos sustituidos o no sustituidos.

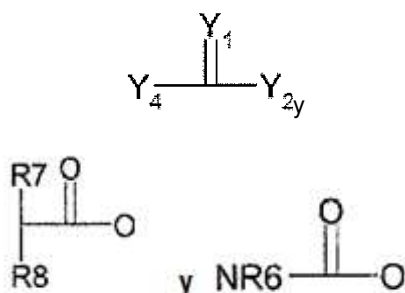
W se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alquilos o heteroalquilos lineales, ramificados o cíclicos, no tóxicos, sustituidos o no sustituidos.

Variaciones preferidas de

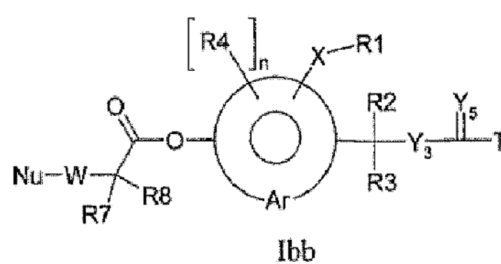
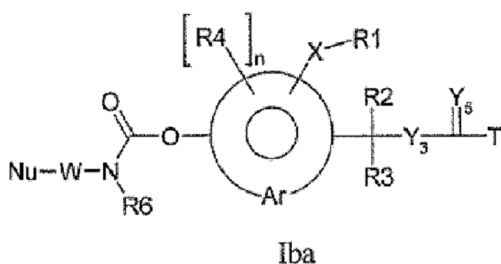
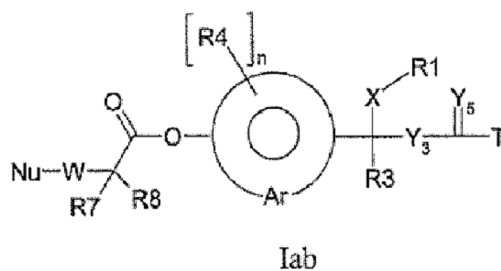
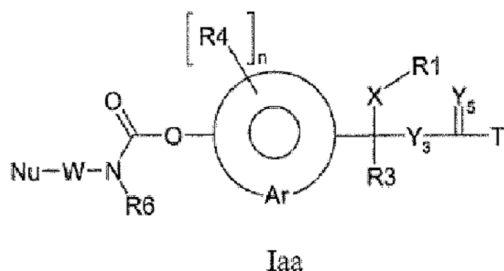


25

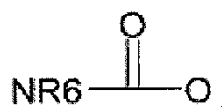
Variaciones especialmente preferidas de



que forman profármacos poliméricos de las siguientes fórmulas



La variación más preferida es

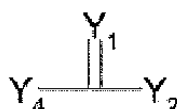


5

En la fórmula Iaa y Iba R6 también puede ser Nu-W.

Al menos un Nu está presente en Nu-W.

Nu es un nucleófilo que puede realizar un ataque nucleófilo en el carbono carbonílico de



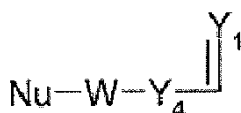
- 10 y así catalizar la escisión del grupo de enmascaramiento por catálisis intramolecular o ciclización (Figura 8). La Figura 8 muestra un ejemplo de acuerdo con la fórmula Ia o Ib en donde la escisión del grupo de enmascaramiento es por ciclización intramolecular. En los casos en que Nu solo cataliza la escisión del grupo de enmascaramiento por catálisis intramolecular, no se forma ningún producto cíclico del grupo de enmascaramiento.

- 15 Nu es un nucleófilo seleccionado del grupo que consiste en grupos amino primarios, secundarios y terciarios, tiol, ácido carboxílico, hidroxilamina e hidrazina. Los nucleófilos también descritos son heteroarilos que contienen nitrógeno.

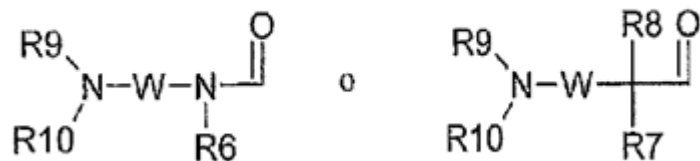
Los nucleófilos especialmente preferidos incluyen grupos amino primarios, secundarios y terciarios. Con el fin de catalizar eficazmente la escisión del grupo de enmascaramiento, el espaciado entre el nucleófilo Nu y Y2 está preferiblemente entre tres y quince átomos.

- 20 Más preferiblemente, el espaciado entre Nu e Y2 está entre cuatro y diez átomos. El al menos un nucleófilo Nu puede estar unido en cualquier lugar a W (por ejemplo, en el extremo o en medio de W) o puede ser parte de W.

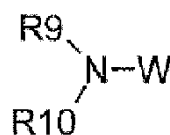
Variaciones preferidas para el grupo de enmascaramiento.



son seleccionados independientemente de

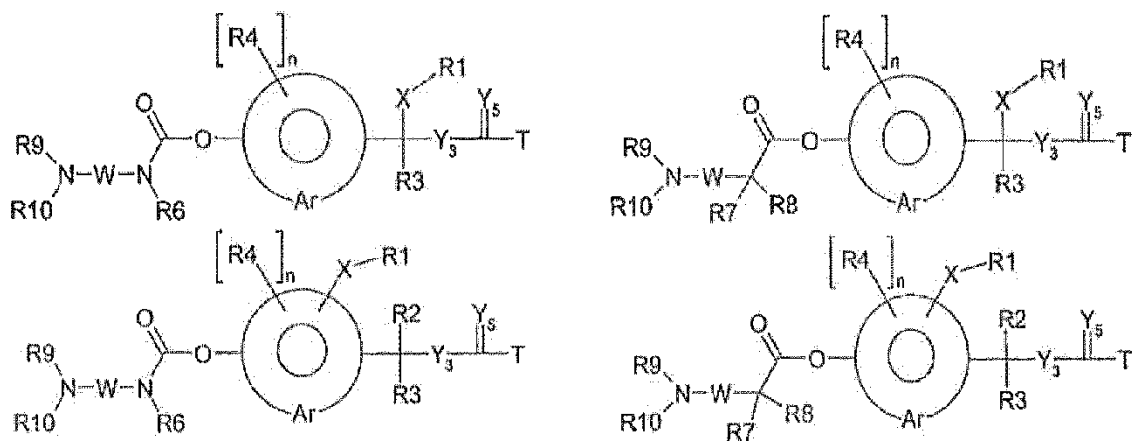


en donde



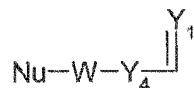
- 5 forma una amina primaria, secundaria o terciaria nucleófila Nu.

Estas variaciones preferidas dan como resultado profármacos poliméricos de acuerdo con las siguientes fórmulas:

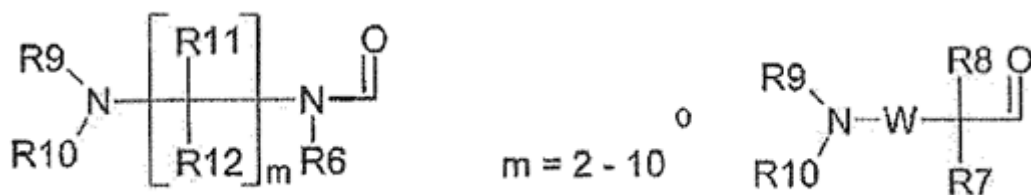


- 10 R₉, R₁₀ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo o heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

Variaciones especialmente preferidas para el grupo de enmascaramiento.



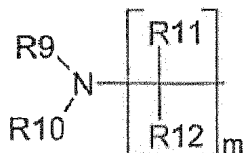
son seleccionados de



- 15 R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo y heteroarilo sustituido o no sustituido.

Preferiblemente, R9, R10, R11 y R12 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido y R7 y/o R8 no son hidrógeno.

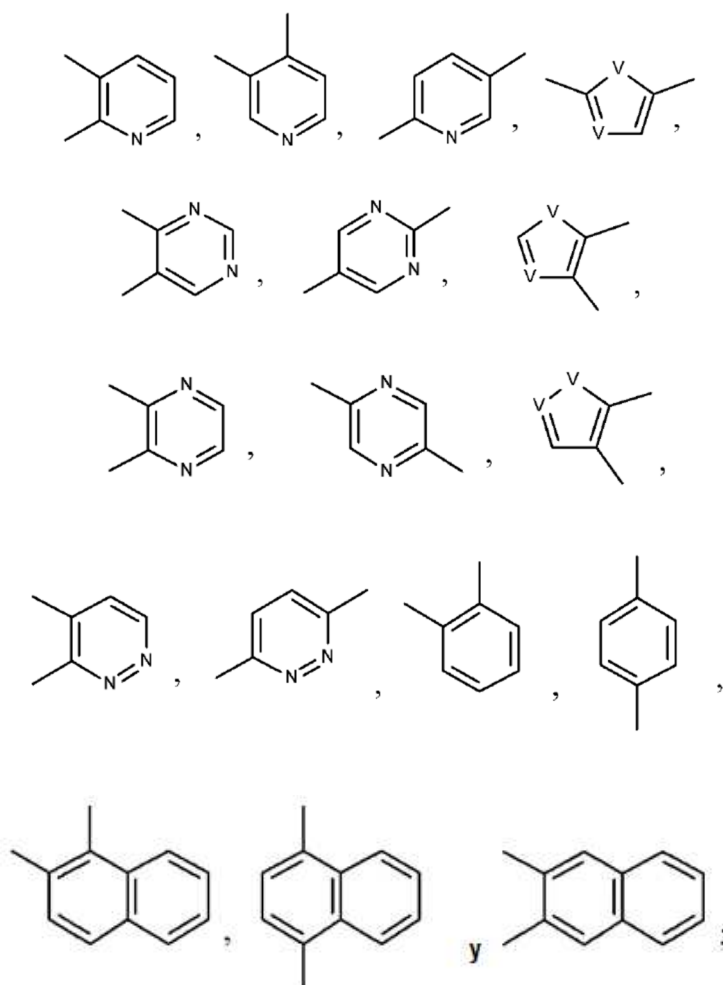
R6 también puede ser



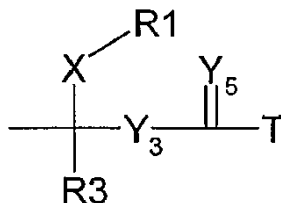
5 y preferiblemente no es hidrógeno.

10 Sorprendentemente, se encontró que el grupo de enmascaramiento puede modificar de manera irreversible la amina que contiene la unidad estructural biológicamente activa cuando el nucleófilo Nu está ausente en el grupo de enmascaramiento. Como se muestra en la sección del ejemplo, durante la liberación del grupo bioactivo de insulina de un profármaco polimérico con un grupo de enmascaramiento de pentanoilo que no forma parte de la presente invención (ya que no contiene un nucleófilo), aproximadamente el 30% de la molécula de insulina se modificó con el grupo de enmascaramiento por transferencia de acilo. El mecanismo de un ejemplo de esta modificación donde D contiene un grupo amino libre adicional que sirve como nucleófilo para la transferencia de acilo del grupo de enmascaramiento se muestra en la Figura 9.

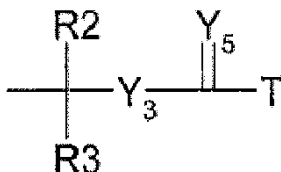
15 Ar de fórmula Ia o Ib es un hidrocarburo aromático multisustituido o un heterociclo aromático multisustituido. Para ser aromático, el número de electrones pi debe satisfacer la regla de Hückel ($4n+2$) y el ciclo debe ser plano. Una gran variedad de compuestos satisface estos criterios y, por lo tanto, son adecuados como Ar en la fórmula Ia o Ib. Ar se selecciona del grupo que consiste en:



en donde cada V se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, N y S. Y₂ y



en la fórmula Ia o Y₂ y



- 5 en la fórmula Ib tienen que estar dispuestos en el anillo aromático de tal manera que puede tener lugar una eliminación 1,4- o 1,6- o 1, (4+2p), con p=2, 3, 4 y superior, (véase más arriba).

Por ejemplo, en el caso de un anillo de 6 miembros, los sustituyentes deben estar dispuestos orto o para.

Las unidades estructurales preferidas para Ar son hidrocarburos aromáticos mono- y dicíclicos o heterociclos aromáticos.

- 10 Las unidades estructurales especialmente preferidas son hidrocarburos aromáticos monocíclicos de cinco o seis miembros o heterociclos aromáticos.

Procedimientos generales de síntesis de los profármacos poliméricos.

La síntesis de ejemplos representativos de profármacos poliméricos de acuerdo con la presente invención se describe en la sección de Ejemplos.

- 15 Los profármacos de la presente invención se pueden preparar de varias formas diferentes. La Figura 10 muestra rutas generales para la síntesis de los profármacos poliméricos de la presente invención de acuerdo con la fórmula Ia.

En un primer método, el intermedio (III) se proporciona mediante la acilación de Y₂ del material de partida (II) con el grupo de enmascaramiento.



- 20 Para esto, X o Nu pueden tener que estar protegidos con un grupo protector reversible PG₁. Los grupos protectores adecuados se describen en TW Greene, P.G.M. Wuts, Protective groups in organic synthesis, 1999, John Wiley & Sons, 3ª ed. Desde el intermedio (III) se pueden utilizar dos rutas alternativas para producir (Iaa). En una primera ruta, el intermedio (III) se activa mediante un agente activador tal como cloroformiato de 4-nitrofenilo o carbonato de disuccinilo para obtener (IV). La molécula de fármaco que contiene amina se une a (IV) para producir (V) desplazando el grupo saliente del compuesto intermedio activado (IV). Después de la desprotección de X, por ejemplo, tratando el intermedio (V) con reactivos como el ácido trifluoroacético o el intermedio desprotegido con DTT (donde corresponda), se hace reaccionar con el polímero R1 para producir el profármaco polimérico (Iaa).

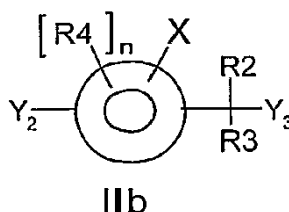
- 25 En una segunda ruta, el polímero R1 se une primero al intermedio (III) después de la desprotección de X (donde sea aplicable) para formar el intermedio (VI). Después de un paso de activación se forma el intermedio (VII). (VII) se hace reaccionar con la molécula de fármaco que contiene amina para formar el profármaco polimérico (Iac). En un segundo método, el intermedio (VIII) se proporciona activando el material de partida (II) mediante un agente activador tal como cloroformiato de 4-nitrofenilo. Para esto, Y₂ y/o X pueden tener que estar protegidos con un grupo protector PG₂ y/o PG₁. El fármaco que contiene amina se hace reaccionar con el intermedio (VIII) para formar (IX). En una primera ruta, Y₂ de (IX) se desprotege selectivamente y se acila para formar el intermedio (V) que se procesa adicionalmente a (Iaa) como se describe anteriormente. En una segunda ruta, X se desprotege selectivamente y se hace reaccionar con el polímero R1 para formar el intermedio (X). Y₂ de (X) se desprotege y acila para formar el profármaco polimérico (Iac).

En un tercer método, el material de partida (II) se hace reaccionar con el polímero R1 para formar el intermedio (XI). En una ruta, el intermedio (XI) se puede acilar para formar el intermedio (VI) que se procesa como se describe anteriormente para formar un profármaco polimérico (Iaa). En una segunda ruta, Y₂ está protegido por el grupo

protector PG₂, se activa y reacciona con la molécula de fármaco que contiene amina para formar (X). El intermedio (X) luego se procesa como se describe anteriormente para formar el profármaco polimérico (Iac).

Para todos los métodos descritos, los grupos funcionales adicionales tales como Y₃ o nucleófilos presentes en Nu-W pueden tener que estar protegidos con grupos protectores adecuados.

- 5 Los profármacos poliméricos de acuerdo con la fórmula Ib se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente para profármacos de acuerdo con la fórmula Ia usando el material de partida IIb en lugar de II en la figura 10.



- 10 Se entiende que las estructuras enlazadoras de acuerdo con la invención descrita y que llevan grupos protectores o grupos salientes como se describe y se usa en la síntesis de profármacos poliméricos correspondientes se consideran dentro del alcance de la invención.

Aplicación de los profármacos poliméricos en terapia molecular

- 15 Para los profármacos poliméricos en cascada, es deseable que la cinética de escisión del primer enlace temporal se desarrolle en las condiciones presentes en la circulación sanguínea del cuerpo humano (pH 7.4, 37°C). Un método para hidrolizar los profármacos poliméricos en cascada comprende una etapa de colocar el profármaco en solución con un pH de aproximadamente 7.4. Lo más importante es que la escisión del primer enlace temporal debe basarse en la hidrólisis y exhibir una dependencia nula o muy limitada de las entidades químicas o bioquímicas o fisicoquímicas presentes en la circulación sanguínea humana, como enzimas, sales o proteínas de unión.

- 20 Se encontró ahora sorprendentemente que la velocidad de escisión del primer enlace temporal que conecta el grupo de enmascaramiento con el grupo activador, así como su dependencia de los componentes sanguíneos, se puede controlar por los efectos de los grupos vecinos mediados por los grupos funcionales nucleofílicos (tales como, aminas secundarias o terciarias) presentes en el grupo de enmascaramiento y ubicadas a una distancia del enlace temporal correspondiente. Si el grupo de enmascaramiento está estructurado de esta manera, una reacción intramolecular con contribución del nucleófilo gobierna la cinética del enlace (Figura 5 y Figura 8).

- 25 La ventaja clave de los profármacos poliméricos de la presente invención es su escisión predominantemente no enzimática: la vida media del profármaco en plasma sanguíneo humano adecuadamente tamponado de pH 7.4 (con una concentración de regulador acuoso <50%) es al menos el 50% de la vida media del profármaco en regulador libre de enzimas pH 7.4.

- 30 Esta característica permite una mejor previsibilidad y control de las tasas de liberación después de la administración a un organismo vivo y reduce la variabilidad entre pacientes.

En contraste con la dependencia enzimática de la eliminación del grupo de enmascaramiento como se describe en los ejemplos mencionados anteriormente de Antczak et al., Shabat et al., y Lee et al., se puede lograr un mayor nivel de control sobre las tasas de liberación si el grupo de enmascaramiento tiene propiedades de autoeliminación independientes de la enzima.

- 35 Los grupos de enmascaramiento de acuerdo con la presente invención contienen al menos un nucleófilo Nu. Las características estructurales de este grupo de enmascaramiento, como la nucleofilicidad del grupo amina y la capacidad de formación de anillos, pueden optimizarse sistemáticamente para ajustar con precisión la tasa de escisión del profármaco. Dichas reacciones intramoleculares que resultan en el desenmascaramiento y el reordenamiento subsiguiente son altamente independientes de las enzimas debido al hecho de que las reacciones intramoleculares generalmente se prefieren a las reacciones intermoleculares como se muestra esquemáticamente en la Figura 8.

- 40 En otra realización de la invención, la independencia de la escisión del profármaco a partir de los niveles de enzima se logra proporcionando un profármaco que contiene un grupo portador estéricamente exigente como se muestra en la Figura 7.

- 45 Dicha encapsulación o protección estérica por el grupo portador estéricamente exigente puede ser conferida por una estructura ramificada, hiperramificada, reticulada o autoensamblada del polímero portador. Tales polímeros tienden a formar un volumen molecular densamente empaquetado, como se ejemplifica, por ejemplo, en dendrímeros, polímeros en estrella densa o nanopartículas y micropartículas en forma de perlas o geles amorfos. Si el enlace del portador de polímero al fármaco se ubica en el interior del portador de polímero, el fármaco enlazado se encapsulará y protegerá

de manera eficiente del ataque enzimático. En este caso, el impedimento estérico del polímero impide que las enzimas accedan y rompan los enlaces temporales.

En otra realización más, la escisión del profármaco independiente de la enzima se logra combinando un grupo de enmascaramiento autoeliminatorio intramolecular con un vehículo encapsulado hiperramificado o reticulado o autoensamblado.

Una ventaja adicional de la presente invención es la liberación de una unidad estructural biológicamente activa no modificada. En los casos en los que la unidad estructural biológicamente activa contiene otros grupos funcionales reactivos, como los grupos amino de residuos de lisina en proteínas, puede ocurrir una reacción secundaria no deseada entre el grupo de enmascaramiento y la unidad estructural biológicamente activa. Los grupos funcionales reactivos de la unidad estructural biológicamente activa pueden reaccionar con el grupo de enmascaramiento, formando un enlace covalente estable y dando como resultado la liberación de una unidad estructural biológicamente activa modificada. Esta posible reacción secundaria se muestra esquemáticamente en la Figura 9. La aparición de tales reacciones secundarias se muestra en la sección de ejemplos utilizando profármacos poliméricos que no forman parte de la presente invención con grupos de enmascaramiento simples como un residuo de pentanoilo sin un nucleófilo Nu presente en el grupo de enmascaramiento y como se describe por Antczak et al. o Lee et al. La reacción secundaria en este sistema enlazador se suprime utilizando profármacos poliméricos de acuerdo con la presente invención con grupos de enmascaramiento activados intramolecularmente que contienen nucleófilos Nu (véase sección de ejemplo).

El control de liberación independiente de la enzima permite formulaciones de depósito sin la necesidad de encapsulación. Hasta ahora, muchos materiales biocompatibles, como los hidrogeles con tamaños de poros grandes, no podían usarse para formulaciones de depósito debido a su falta de propiedades de encapsulación. A partir de dichos materiales biocompatibles bien hidratados y mecánicamente blandos, se liberará una unidad estructural biológicamente activa demasiado rápido para la mayoría de las aplicaciones terapéuticas. En combinación con los enlazadores de profármacos descritos en esta invención, el material portador puede optimizarse por sus propiedades de biocompatibilidad ya que la liberación está gobernada únicamente por la cinética de escisión del enlazador y no requiere degradación química o enzimática del propio polímero.

Las velocidades de liberación se rigen por una reacción química sustancialmente no enzimática que a su vez depende de la estructura molecular del enlazador. Las modificaciones sistemáticas o aleatorias de la estructura química, por ejemplo, al cambiar los sustituyentes en una o más posiciones, por ejemplo, un grupo de enmascaramiento en un profármaco en cascada, permite la generación de enlazadores de profármacos con diferentes tasas de liberación. Por lo tanto, es posible crear una variedad de enlazadores de profármacos y seleccionar aquellos enlazadores de profármacos de escisión rápida o lenta de acuerdo con las demandas planteadas por una aplicación terapéutica o medicinal determinada.

Otra característica ventajosa que forma parte de esta invención es la unión del soporte polimérico a través de un enlace covalente estable a una unidad estructural activadora involucrada en un mecanismo de liberación de profármaco doble o en cascada. Como parte de esta invención, la unidad estructural activadora permanece unida al vehículo polimérico después de la liberación del fármaco y, por lo tanto, no puede difundirse al medio ambiente. El enlace permanente del portador de polímero al grupo activador reduce en gran medida la reactividad lateral de la unidad estructural activadora y la probabilidad de efectos tóxicos no deseados. En otros profármacos poliméricos en cascada conocidos en la técnica, la unidad estructural activadora se libera además del fármaco. Debido a los mecanismos de reordenamiento molecular utilizados en los profármacos en cascada, la unidad estructural activadora se libera en una forma altamente reactiva y puede causar daño directo a las biomoléculas circundantes, o se pueden formar derivados potencialmente tóxicos de la unidad estructural activadora in vivo.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un profármaco unido a portador.

La Figura 2 muestra un profármaco unido a un portador dependiente de enzima.

La Figura 3 muestra un profármaco en cascada donde el grupo de enmascaramiento es parte del portador.

La Figura 4 muestra un profármaco en cascada dependiente de la enzima donde el grupo de enmascaramiento es parte del portador.

La Figura 5 muestra un profármaco en cascada de autoescisión en donde el grupo de enmascaramiento está separado del portador.

La Figura 6 muestra un profármaco en cascada dependiente de la enzima donde el grupo de enmascaramiento está separado del portador.

La Figura 7 muestra un profármaco en cascada donde el portador está protegiendo estéricamente del grupo de enmascaramiento.

La Figura 8 muestra la escisión del grupo de enmascaramiento por ciclización intramolecular.

La Figura 9 muestra una posible reacción lateral de la activación del profármaco polimérico.

La Figura 10 muestra los métodos generales de síntesis.

La Figura 11 muestra los espectros de masas de las moléculas de insulina liberadas de profármacos.

5 Ejemplos

Materiales

Los Fmoc-aminoácidos, resinas y PyBOP se adquirieron de Novabiochem y se nombran de acuerdo con el catálogo. El Fmoc-Ado-OH se obtuvo de Neosystem. Todos los productos químicos adicionales fueron comprados de Sigma Aldrich. La insulina humana recombinante era de ICN Biomedicals (Estados Unidos). La maleimida-PEG5k se obtuvo de Nektar (Estados Unidos). El éster succinimidílico de 5-(y -6)-carboxifluoresceína (isómeros mixtos) se obtuvo de Molecular Probes.

Medio de reacción de síntesis en fase sólida

La síntesis en fase sólida se realizó en resina de amida NovaSyn TG Sieber con una carga de 0.17 mmol/g o resina de cloruro de 2-clorotritilo con una carga de 1.4 mmol/g. Se utilizaron jeringas equipadas con fritas de polipropileno como recipientes de reacción.

Ciclo de acoplamiento estándar para aminoácidos protegidos por fmoc

Para la eliminación del grupo protector fmoc, la resina se agitó repetidamente (tres veces, 4 minutos cada una) con 2/2/96 (v/v/v) de piperidina/DBU/DMF y se lavó repetidamente (seis veces) con DMF.

El acoplamiento de aminoácidos protegidos con fmoc a grupos amino libres en la resina se logró agitando la resina con 3 equivalentes (eq) de fmoc-aminoácido, 3 eq PyBOP y 6 eq DIEA en relación con los grupos amino libres en DMF para 60 min.

Finalmente, la resina se lavó repetidamente (cinco veces) con DMF.

Protocolo de escisión estándar para la resina de amida TentaGel Sieber

Una vez completada la síntesis, la resina se lavó con DCM, se secó al vacío y se trató repetidamente (cinco veces) con 97/2/1 (v/v) DCM/TES/TFA. Después de la evaporación, los compuestos se purificaron por RP-HPLC preparativa (Waters 600).

Protocolo estándar de escisión para la resina de cloruro de 2-clorotritilo

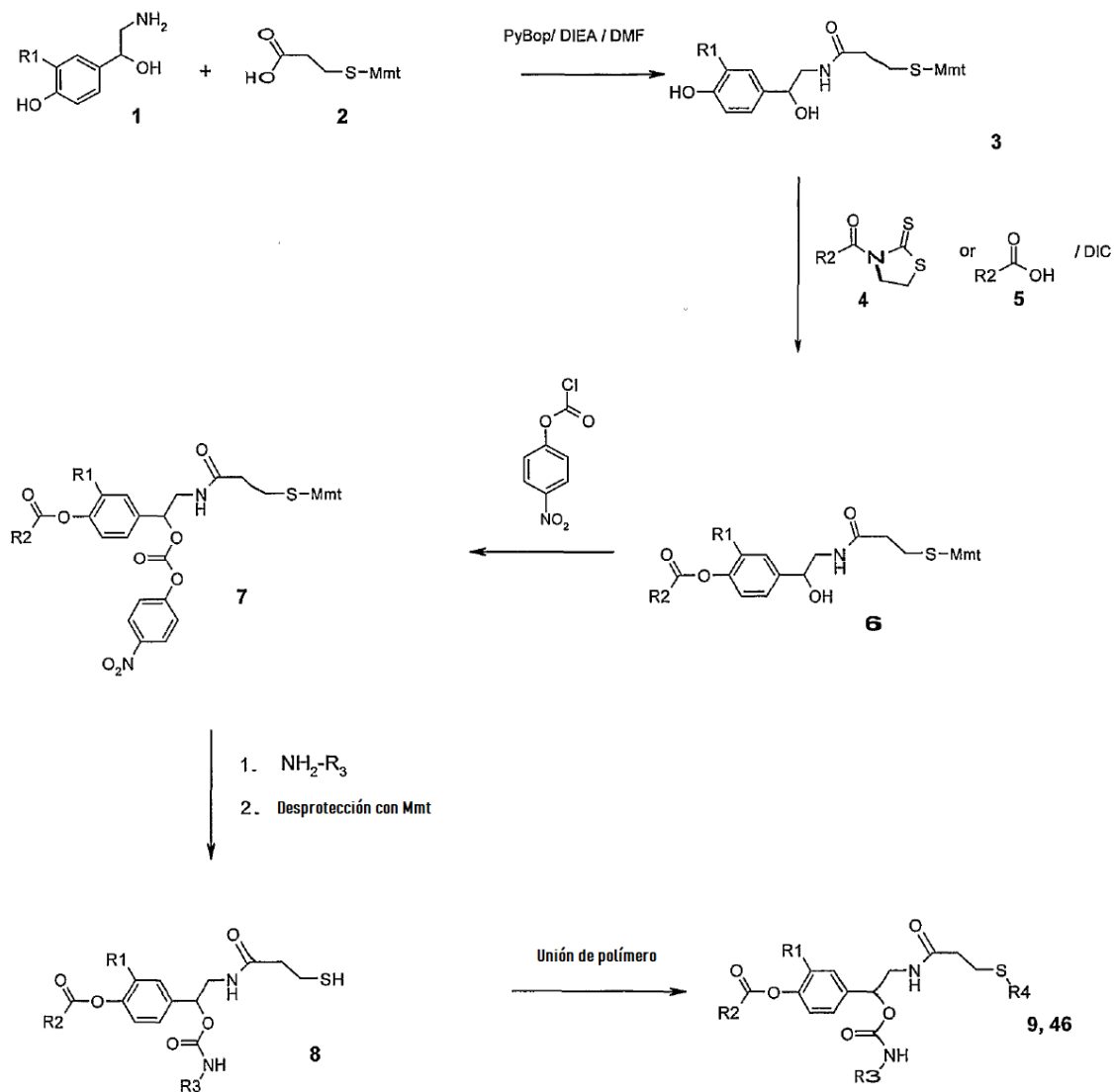
Una vez completada la síntesis, la resina se lavó con DCM, se secó al vacío y se trató dos veces durante 30 minutos con 65/35 (v/v) HFIP/DCM. Después de combinar los eluidos, se evaporaron los componentes volátiles.

30 Análisis

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

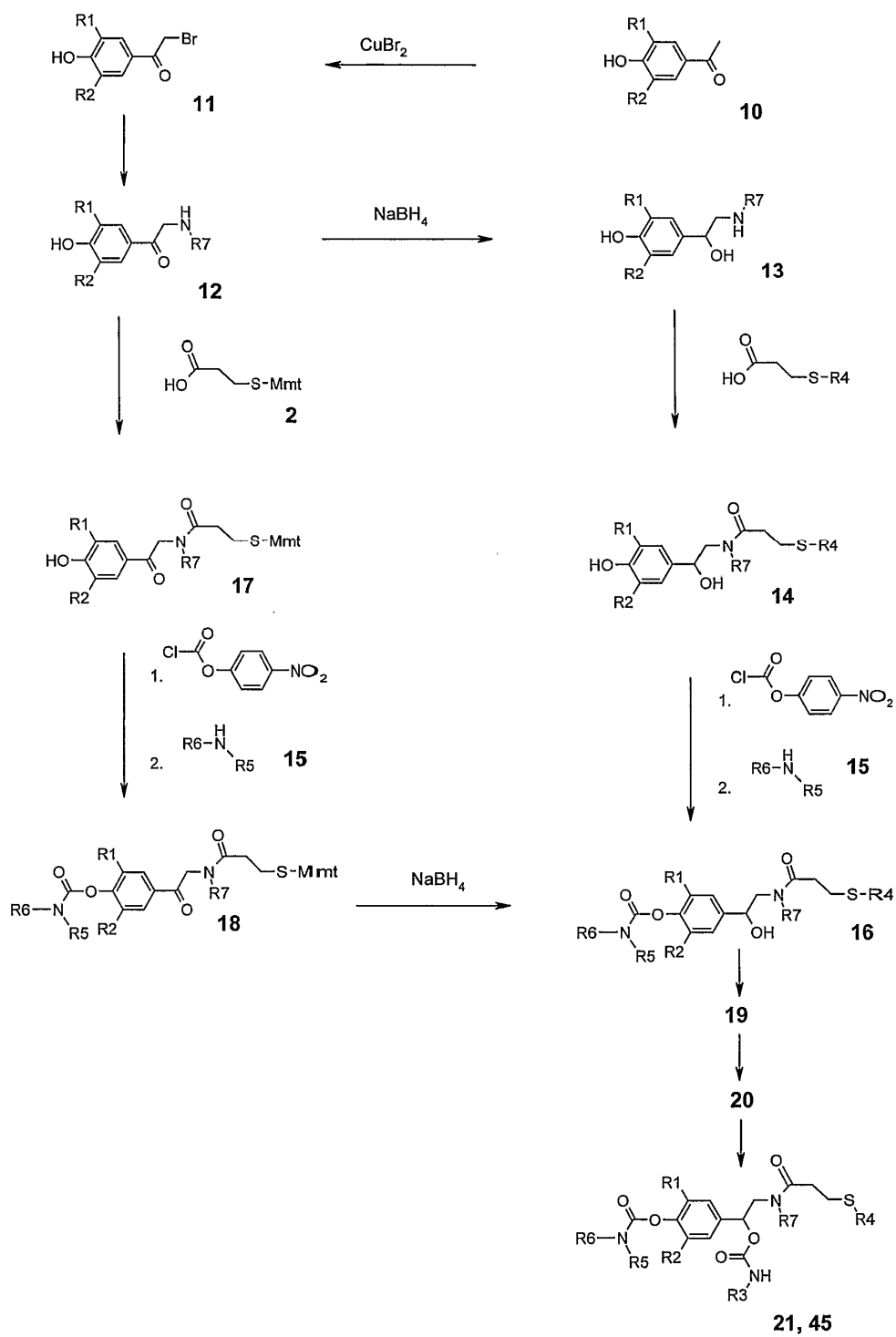
La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó usando un sistema básico Amersham Bioscience AEKTA equipado con una columna Superdex 200 (Amersham Bioscience). Los espectros de RMN se registraron en un Bruker AC300.

Visión general - síntesis de profármacos poliméricos de acuerdo con la fórmula la con grupos de enmascaramiento unidos a éster

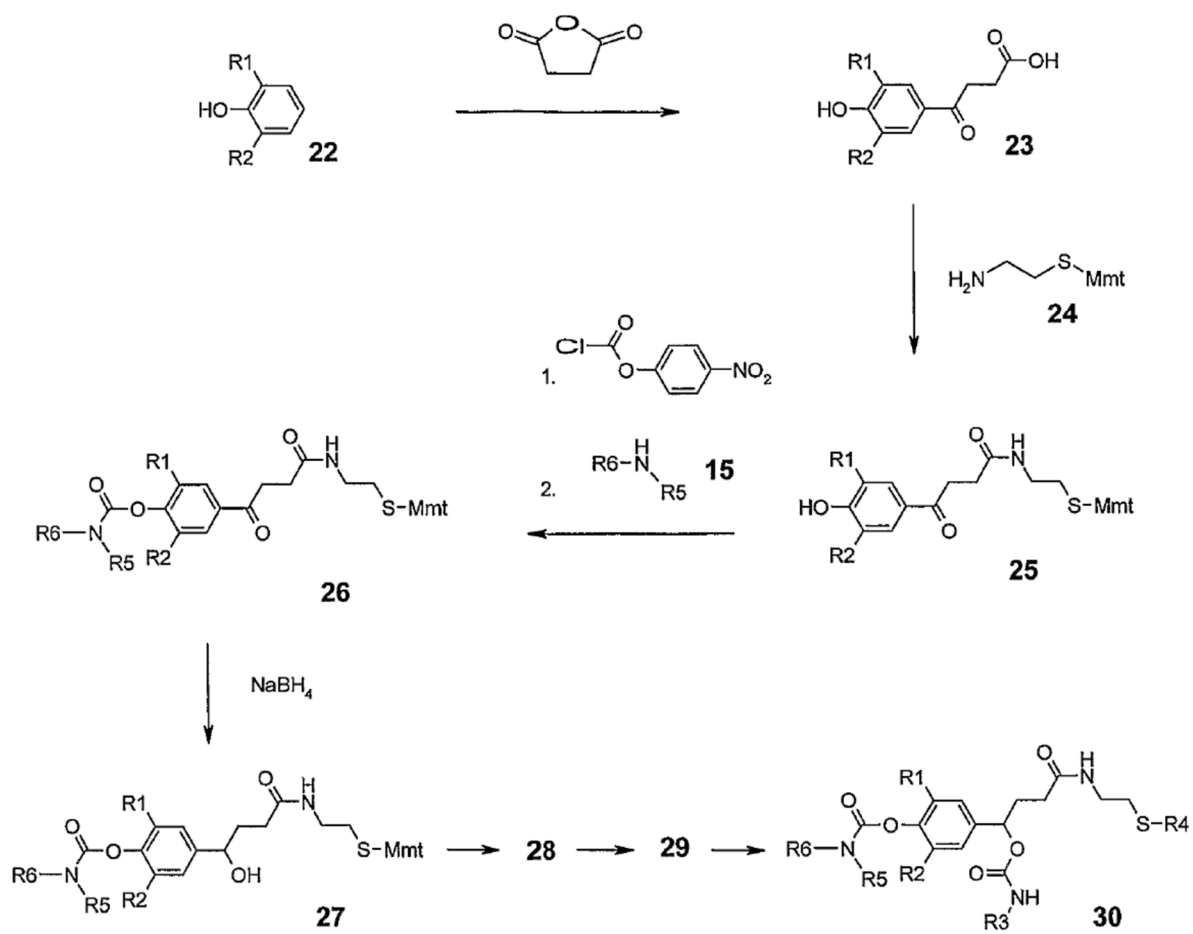


Síntesis de profármacos poliméricos según la fórmula la con grupos de enmascaramiento unidos a carbamatos)

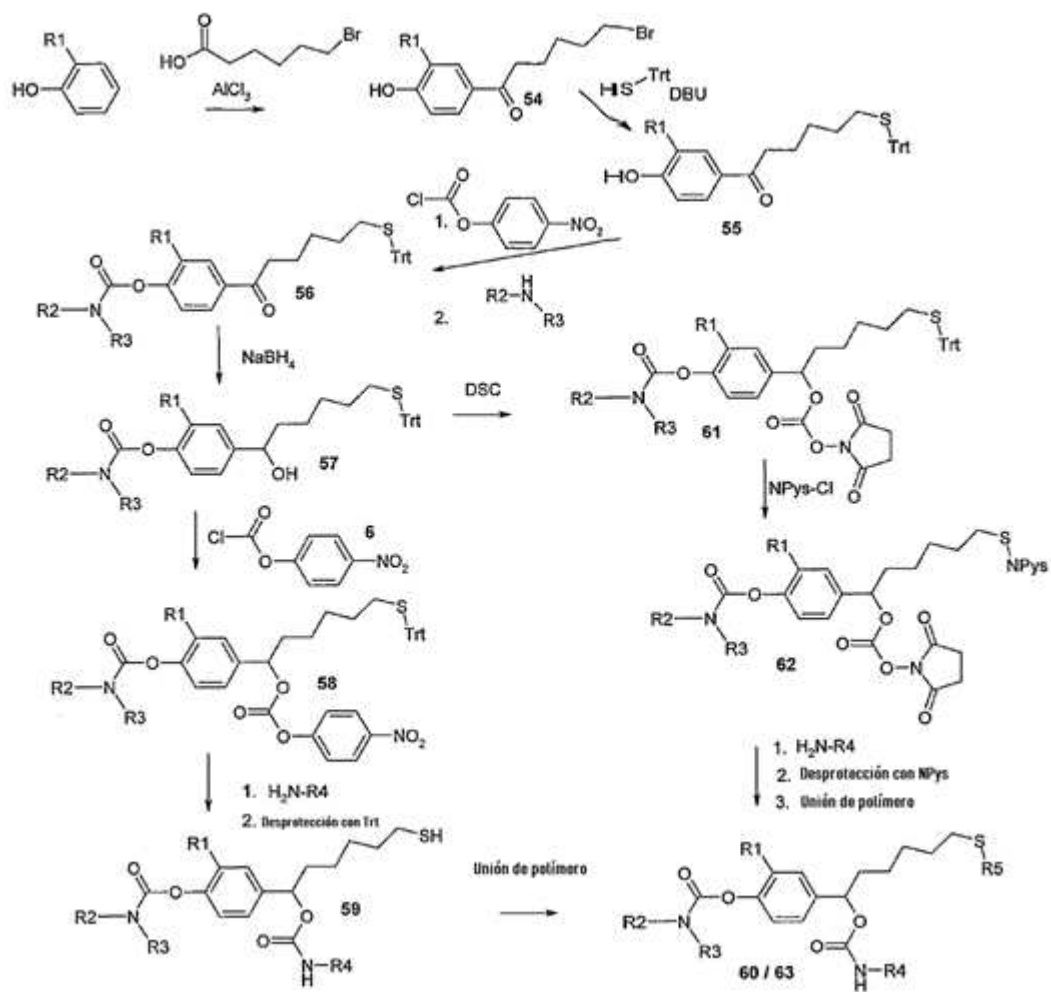
a)



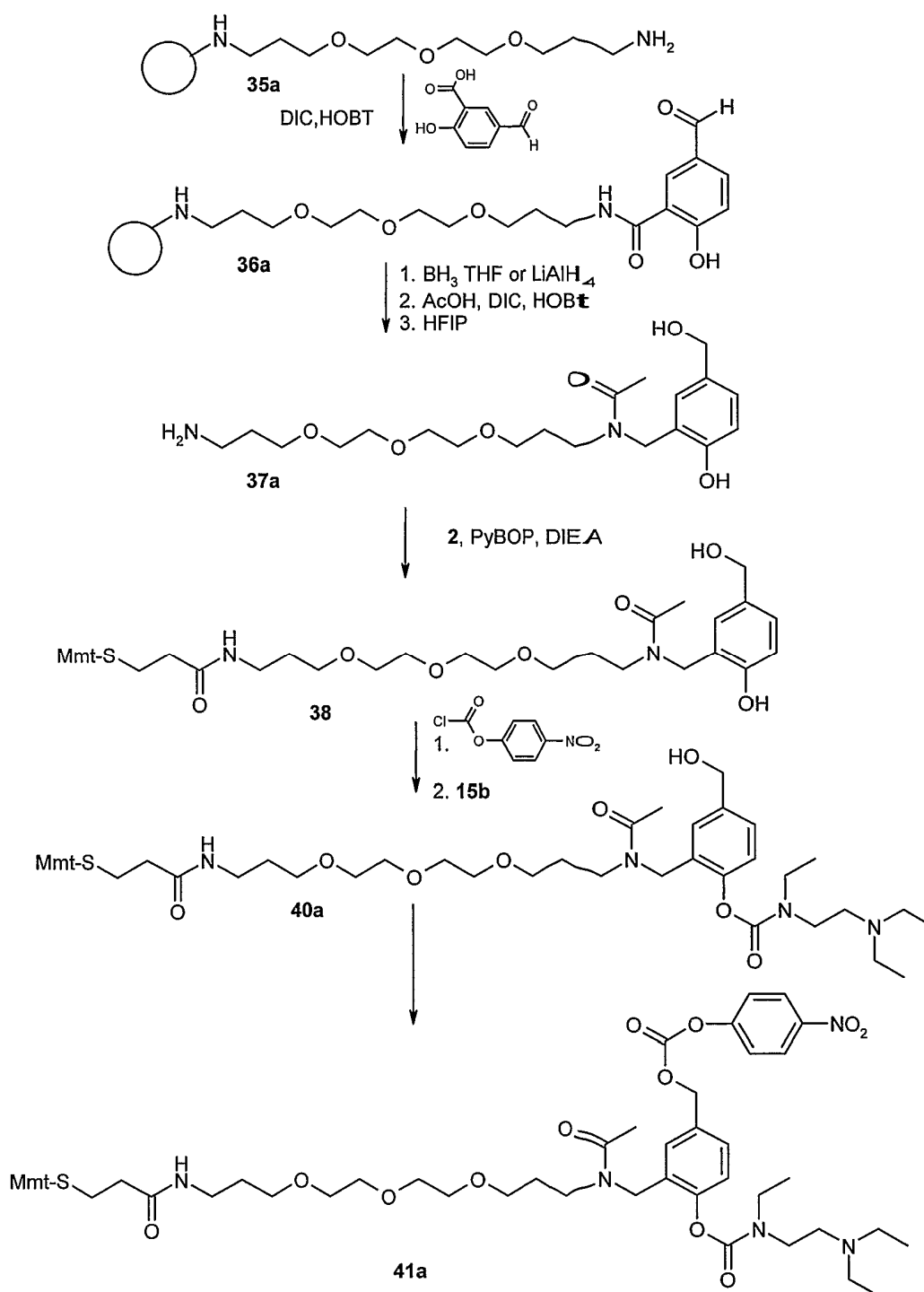
b)



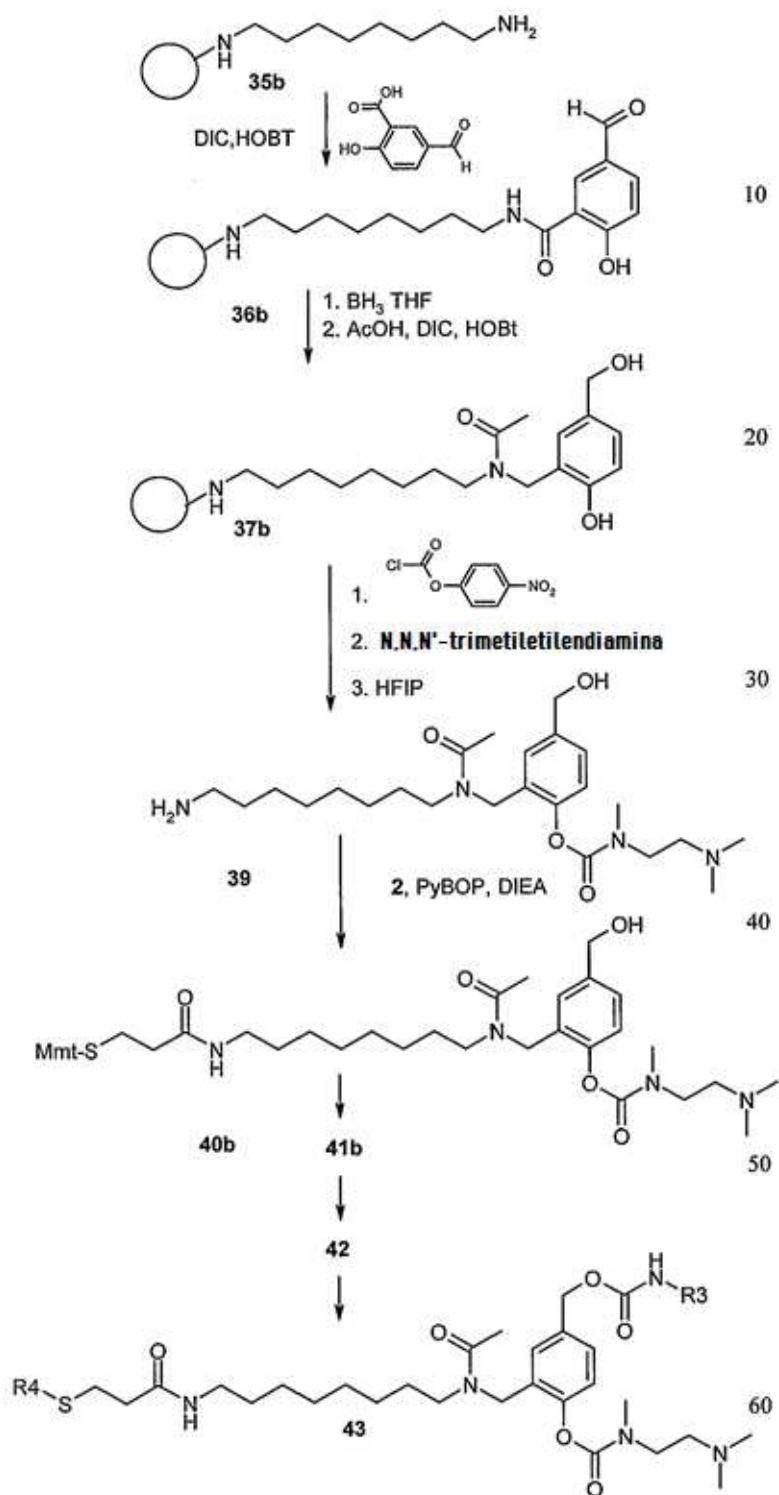
c)

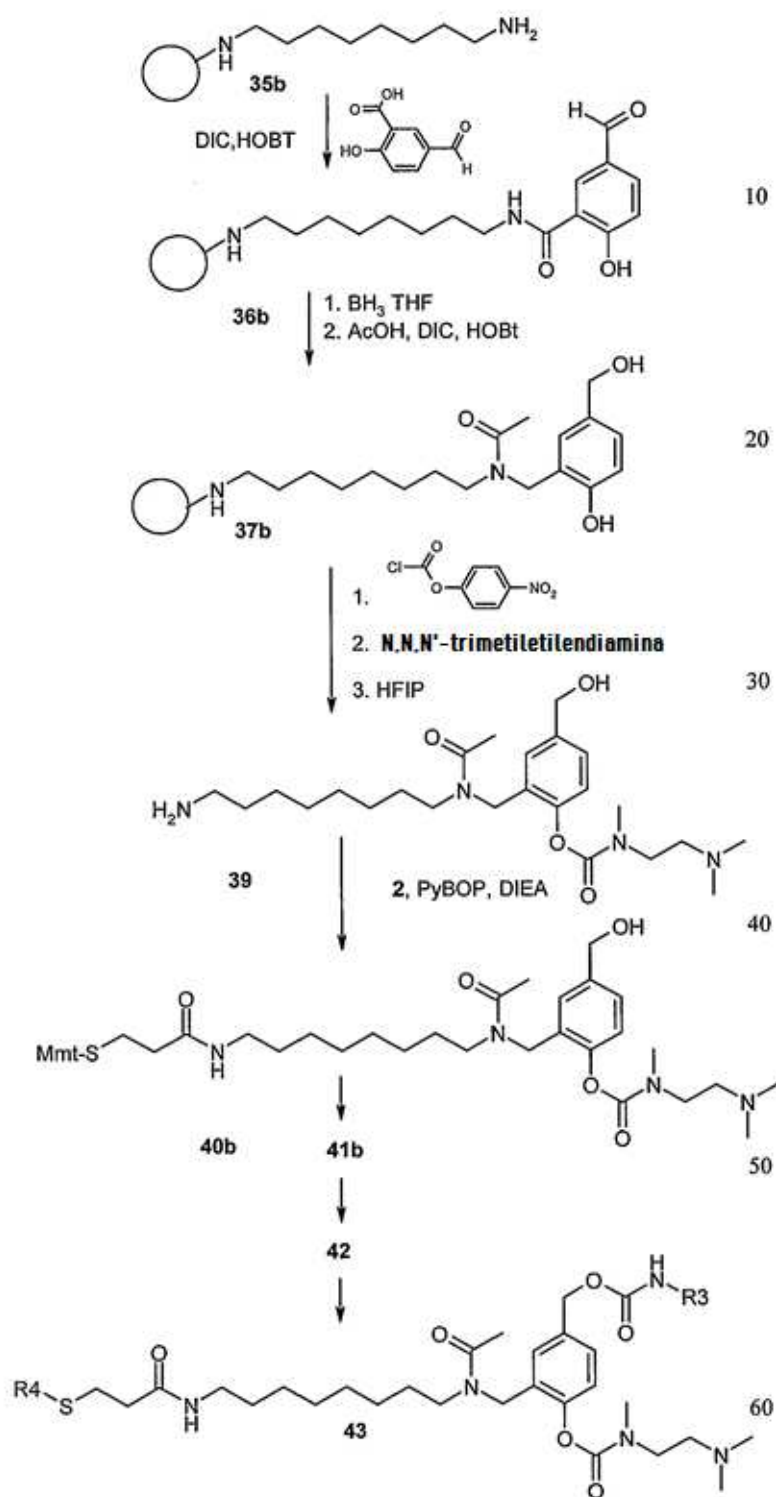


Síntesis de profármacos poliméricos según la fórmula Ib con un grupo de enmascaramiento unido a carbamatos)

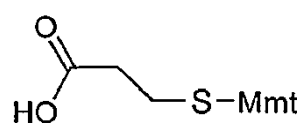


b)





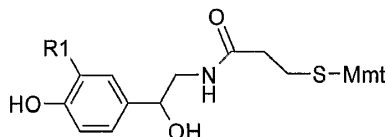
Síntesis del compuesto 2



2

Se disolvieron cloruro de Mmt (1 eq) y ácido mercaptopropiónico (1.1 eq) en TFA y se incubaron durante 30 min. El disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se disolvió en piridina, se diluyó en agua, se acidificó con ácido acético y se extrajo con éter. La fase etérea se separó y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto 2 se purificó por RP-HPLC.

5 Síntesis de los compuestos 3a y 3b



3a R1 = H

3b R1 = OMe

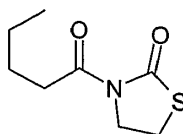
10 Se disolvieron clorhidrato de octopamina (1a) (2 eq), DIEA (4 eq) y PyBOP (1 eq) en DMF, se añadió 2 (1 eq) y la mezcla se hizo reaccionar durante 50 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de ácido acético (7 eq), el producto 3a se purificó por RP-HPLC.

3b se sintetizó a partir de clorhidrato de normetanefrina (1b) como se describe anteriormente.

3a: MS [M+Na]⁺ = 536 (MW+Na calculado = 536.2 g/mol)

3b: MS [M+Na]⁺ = 566 (MW+Na calculado = 566.2 g/mol)

15 Síntesis de mercaptotiazolida 4

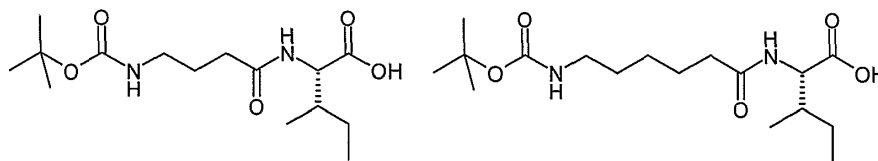


4

20 Se disolvieron 2-mercaptotiazolina y trietilamina (1.5 eq) en THF seco y se añadió cloruro de pentanoílo (1 eq). La mezcla se agitó durante 1 hora a 50°C bajo una atmósfera de gas inerte y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió HCl acuoso 0.5 N y las fases orgánicas separadas se secaron sobre Na₂SO₄. Después de concentrar al vacío, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando heptano/acetato de etilo (1/1) como fase móvil. La mercaptotiazolida 4 se recogió como un aceite amarillo viscoso.

4 R_f (heptano/acetato de etilo 1:1) = 0.7

Síntesis de los compuestos 5a y 5b.



5a

5b

25 Protocolo de síntesis general:

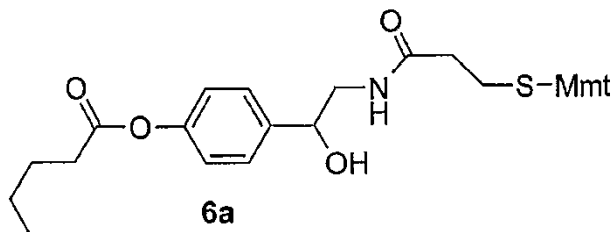
30 Se incubó 1 g de resina de cloruro de 2-clorotritilo (cargando 1.6 mmol/g) durante 1 h con 850 mg (2.4 mmol) de Fmoc-Ile-OH y 840 µl (4.8 mmol) de DIEA en 5 ml 1/1 de DCM/DMF. Después de la eliminación de fmoc y el lavado de la resina con DMF, se acopló ácido boc-aminobutírico a 0.5 g de resina de acuerdo con el método de acoplamiento estándar. El compuesto 5a se escindió de la resina con 97/1/2 (v/v) de DCM/TFA/TES durante 45 min. Después de la neutralización con piridina, los disolventes se eliminaron a presión reducida y la 5a se purificó por RP-HPLC.

5b se sintetizó a partir de ácido boc-aminohexanoico como se describe anteriormente.

5a MS [M+Na]⁺ = 339.2 (MW+Na calculado = 339.4 g/mol)

5b MS [M+Na]⁺ = 367.4 (MW+Na calculado = 367.5 g/mol)

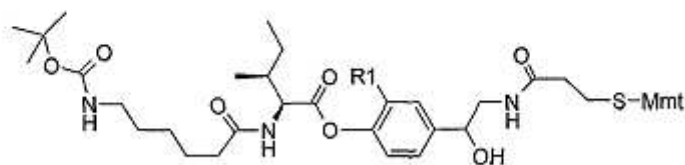
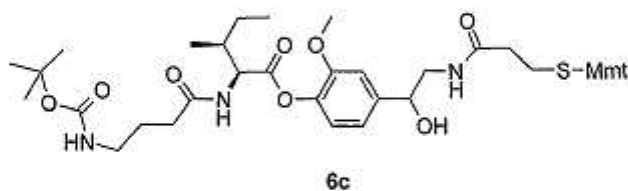
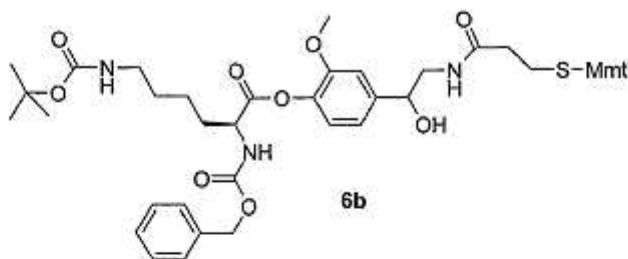
Síntesis del compuesto 6^a



5 Mercaptotiazolida 4 (1 eq), fenol 3a (4 eq) y DMAP (4 eq) se sometieron a reflujo en DCM durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. Después de la neutralización con ácido acético, el disolvente se eliminó al vacío y el producto 6a se purificó por RP-HPLC.

6a MS $[M+Na]^+ = 620$ (MW+Na calculado = 620.3 g/mol)

Síntesis de compuestos 6b a 6e



Protocolo de síntesis general:

6d R1 = OMe
6e R1 = H

10 El ácido carboxílico 5a (1 eq), fenol 3b (1 eq), DIC (1 eq) y DMAP (2 eq) en DMF se hicieron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la adición de ácido acético (4 eq), el éster carboxílico resultante 6c se purificó por RP-HPLC.

La 6d se sintetizó como se describió anteriormente utilizando 5b y 3b como materiales de partida.

6b se sintetizó como se describió anteriormente utilizando Z-Lys(Boc)-OH y 3b.

6e se sintetizó como se describe anteriormente utilizando 5b y 3a.

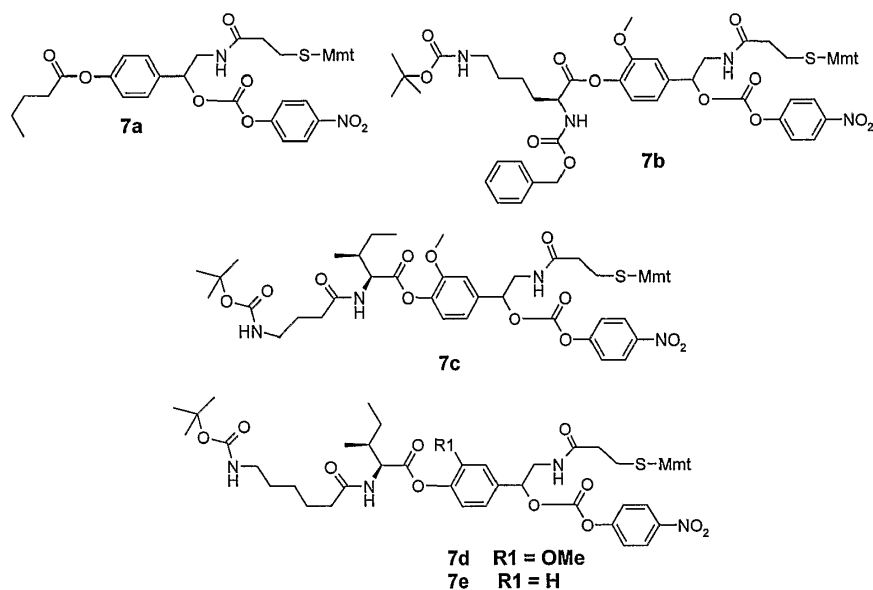
15 6b MS $[M+Na]^+ = 928$ (MW+Na calculado = 928.6 g/mol)

6c MS $[M+Na]^+ = 864$ (MW+Na calculado = 864.5 g/mol)

6d MS $[M+Na]^+ = 892$ (MW+Na calculado = 892.6 g/mol)

6e MS $[M+Na]^+ = 862$ (MW+Na calculado = 862.6 g/mol)

Síntesis de los compuestos 7a a 7e



Protocolo de síntesis general:

- 5 El alcohol 6a (1 eq), el cloroformiato de 4-nitrofenilo (10 eq) y el DIEA (10 eq) se agitaron en dioxano seco durante 3 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Después de la adición de ácido acético (25 eq), las mezclas se diluyeron con 7/3 (v/v) de acetonitrilo/H₂O y el carbonato 7a se purificó por RP-HPLC.

7b, 7c, 7d o 7e se sintetizaron a partir de 6b, 6c, 6d o 6e, respectivamente, como se describió anteriormente.

7a MS [M+Na]⁺ = 785 (MW+Na calculado = 785.5 g/mol)

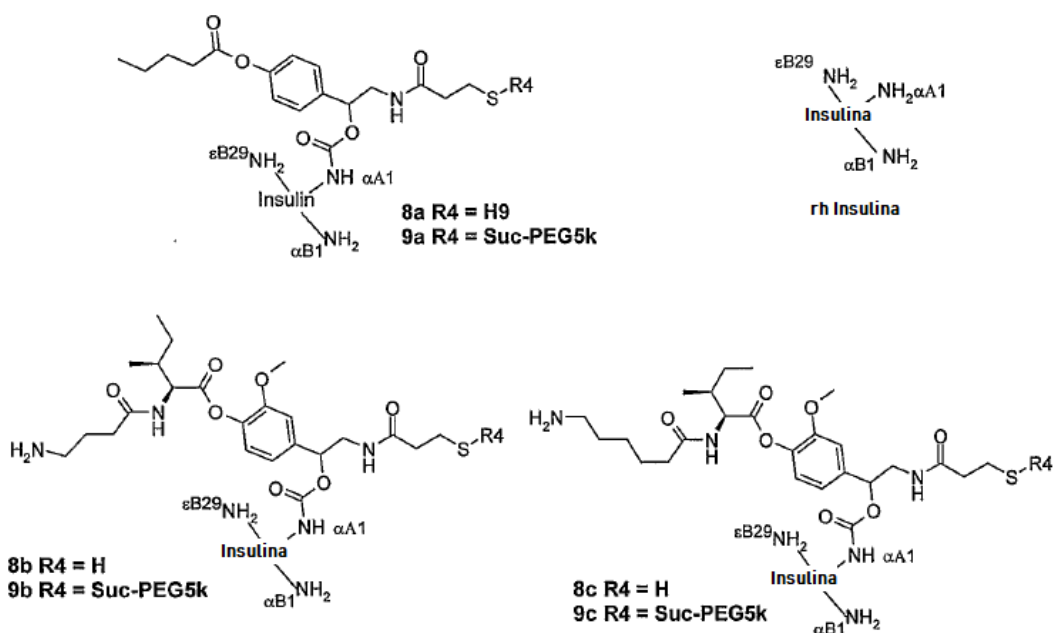
- 10 7b MS [M+Na]⁺ = 1093 (MW+Na calculado = 1093.7 g/mol)

7c MS [M+Na]⁺ = 1029 (MW+Na calculado = 1029.6 g/mol)

7d MS [M+Na]⁺ = 1057 (MW+Na calculado = 1057.6 g/mol)

7e MS [M+Na]⁺ = 1027 (MW+Na calculado = 1027.6 g/mol)

Síntesis de los compuestos 8a a 8c (N^{αA1}-enlazador-insulina)



Protocolo general de síntesis:

Se mezcló Rh-Insulina en 1/1 (v/v) DMSO/DMF con una solución de 0.9 eq de carbonato 7a en DMSO. La solución resultante se ajustó a pH básico con DIEA y se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente. La purificación por RP-HPLC dio un intermedio protegido con Mmt.

- 5 Después de la liofilización, el intermedio protegido con Mmt se mezcló con 95:5 (v/v) de TFA/trietilsilano y se agitó durante 5 min. Los volátiles se eliminaron bajo flujo de nitrógeno y 8a se purificó por RP-HPLC y se liofilizó. La regioselectividad de la modificación de la insulina se verificó mediante reducción con DTT y análisis de MS.

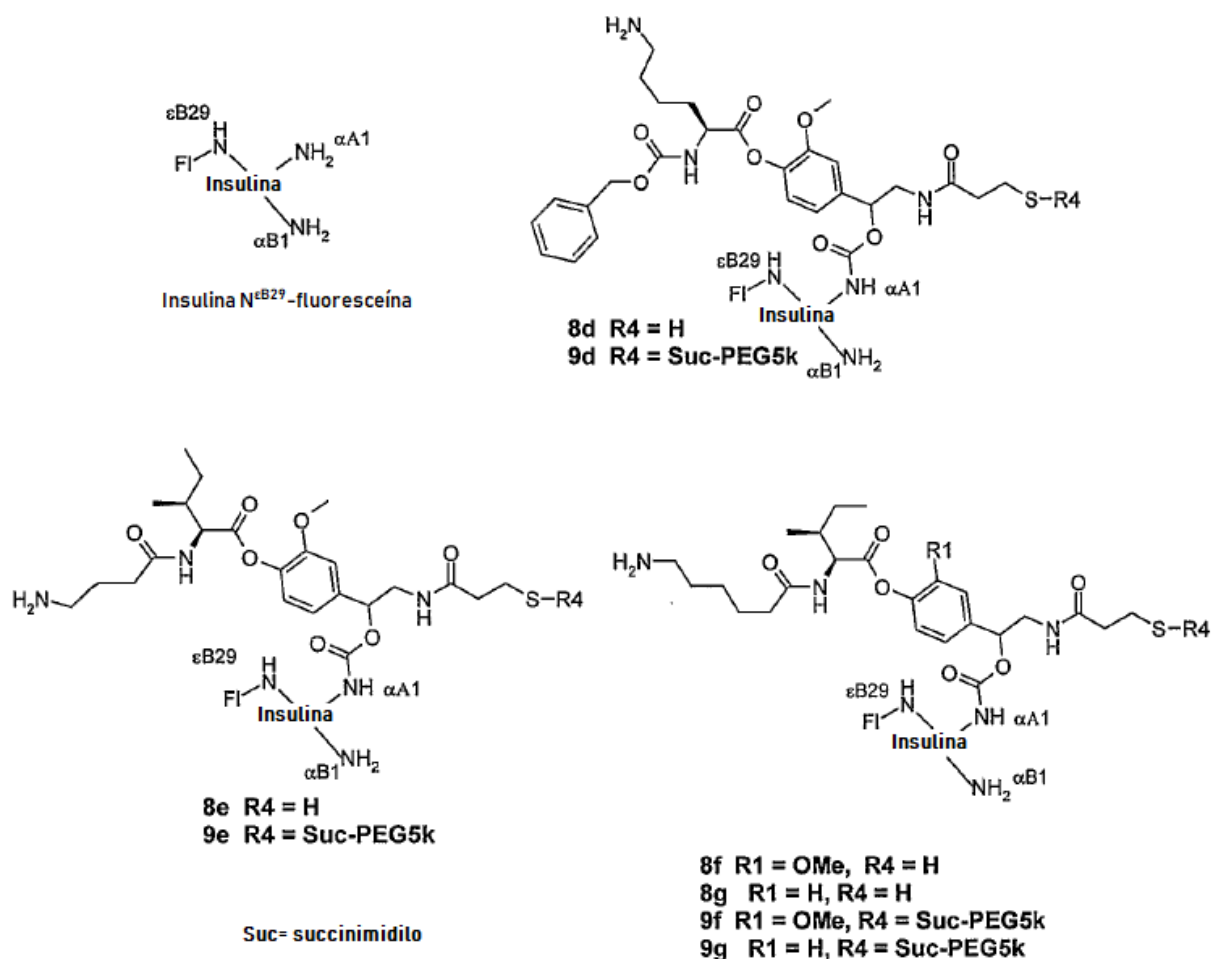
8b u 8c se sintetizaron a partir de 7c, o 7d, respectivamente, como se describe anteriormente.

8a MS $[M+2H]^{2+} = 3078,9$; $[M+3H]^{3+} = 2053,2$ $[M+4H]^{4+} = 1540,6$ (MW calculado = 6158 g/mol)

- 10 8b MS $[M+2H]^{2+} = 3152,9$; $[M+3H]^{3+} = 2100,6$ $[M+4H]^{4+} = 1575,8$ (MW calculado = 6302 g/mol)

8c MS: $[M+3H]^{3+} = 2110,7$; $[M+4H]^{4+} = 1583,7$; $[M+5H]^{5+} = 1266,6$ (MW calculado = 6330 g/mol)

Síntesis de los compuestos 8d a 8g ($N^{\epsilon B29}$ -Fluoresceína- $N^{\alpha A1}$ -enlazador-insulina)

Síntesis de insulina $N^{\epsilon B29}$ -fluoresceína:

- 15 Se disolvieron 80 mg (13.8 μ mol) de rh-insulina en 4 ml 1/1 (v/v) de DMF/DMSO y se agregaron 40 μ l de DIEA. Se añadieron 8 mg (17 μ mol) de éster succinimídico de 5-(y -6)-carboxifluoresceína y la solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 4 ml de 5/5/1 (v/v/v) de acetonitrilo/agua/ácido acético, el producto $N^{\epsilon B29}$ -fluoresceína insulina se purificó por RP-HPLC y se liofilizó. El sitio de conjugación se verificó mediante la reducción de insulina $N^{\epsilon B9}$ -fluoresceína con 1,4-ditiotreitol, digestión con proteasas y análisis de MS.
- 20 MS: $[M+2H]^{2+} = 3084,0$; $[M+3H]^{3+} = 2054,6$ (MW calculado = 6166 g/mol)

La insulina N^εB²⁹-fluoresceína en 1/1 (v/v) de DMF/DMSO se mezcló con una solución de 0.9 eq de carbonato 7b en DMSO. La solución resultante se ajustó a pH básico con DIEA y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La purificación por HPLC-P dio un producto intermedio protegido con Mmt.

- 5 Después de la liofilización, el intermedio se disolvió en 95/5 (v/v) de TFA/trietilsilano y se agitó durante 5 min. Los volátiles se eliminaron bajo flujo de nitrógeno y 8d se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

8e, 8f u 8g se sintetizaron como se describió anteriormente utilizando 7c, 7d o 7e, respectivamente.

8d MS: $[M+2H]^{2+} = 3364.1$; $[M+3H]^{3+} = 2242.7$; $[M+4H]^{4+} = 1681.5$ (MW calculado = 6724 g/mol)

8e MS: $[M+3H]^{3+} = 2219.2$ $[M+4H]^{4+} = 1665.9$; $[M+5H]^{5+} = 1332.8$ (MW calculado = 6660 g/mol)

8f MS: $[M+3H]^{3+} = 2229.7$ $[M+4H]^{4+} = 1673.3$; $[M+5H]^{5+} = 1337.7$ (MW calculado = 6689 g/mol)

- 10 8g MS: $[M+3H]^{3+} = 2218.7$ $[M+4H]^{4+} = 1664.9$ (MW calculado = 6659 g/mol)

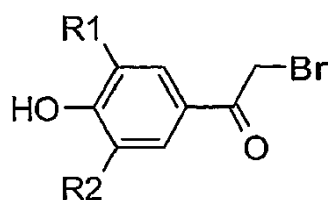
Síntesis de los compuestos 9a a 9g (compuestos de insulina monopegilados)

- 15 Se mezclaron 70 μ l de 500 μ M 8a en 1/4 (v/v) de acetonitrilo/agua con 7 μ l de maleimida 10 mM-PEG5k en 1/4 (v/v) de acetonitrilo/agua y 10 μ l de regulador de fosfato de sodio 0.5 M pH 7.0 y se incubó durante 15 min. El compuesto 9a se purificó por SEC (columna: Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) utilizando un regulador HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% como fase móvil. El eluato recogido (aproximadamente 1.5 ml) se usó directamente como tal para la determinación de la velocidad de liberación.

9b, 9c, 9d, 9e, 9f o 9g se sintetizaron como se describe anteriormente a partir de 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, u 8g, respectivamente.

9a a 9g: tiempo de retención de SEC: 19.5 min

- 20 Síntesis de los compuestos 11a y 11b



11a R1 = R2 = Me

11b R1 = Me, R2 = H

- 25 Se disolvieron 3,5-dimetil-4-hidroxi-acetofenona (5.0 mmol) (10a) y CuBr₂ (1.7 g, 7.5 mmol) en 10 ml de acetato de etilo y se sometieron a reflujo durante 2 h. Los subproductos sólidos se eliminaron por filtración. El filtrado se evaporó y el producto bruto 11a se purificó por RP-HPLC.

11b se sintetizó a partir de 4-hidroxi-3-metil-acetofenona (10b) (0.75 g, 5.0 mmol) como se describe anteriormente.

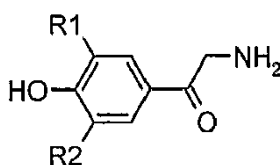
11a: Rendimiento 754 mg (62%)

- 30 MS $[M+H]^+ = 243.1/245.1$ (MW+H calculado = 244.1 g/mol)

11b: Rendimiento de 533 mg (47%)

MS $[M+H]^+ = 229.2/231.1$ (MW+H calculado = 230.1 g/mol)

Síntesis de los compuestos 12a y 12b



- 35 12a R1 = R2 = Me

12b R1 = Me, R2 = H

Se disolvieron 500 mg de 11a (2.06 mmol) y 576 mg (4.11 mmol) de hexametilentetramina en 20 ml de triclorometano y se calentaron a reflujo durante 30 minutos. El disolvente se eliminó a vacío. Se añadieron 4 ml de etanol y 2 ml de HCl concentrado y la suspensión se calentó a 50°C durante 4 h. La mezcla se concentró al vacío, se diluyó con acetonitrilo/agua y la 12a se purificó por RP-HPLC.

12b se sintetizó a partir de 472 mg (2.06 mmol) de 11b como se describe anteriormente.

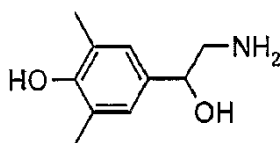
12a: Rendimiento 547 mg (81%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 202.2$ (MW+Na calculado = 202.2 g/mol)

12b: Rendimiento 455 mg (70%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 188.2$ (MW+Na calculado = 188.2 g/mol)

Síntesis del compuesto 13



13

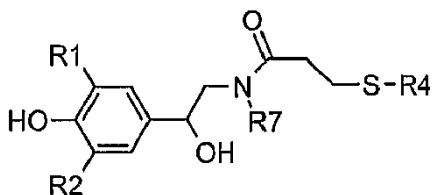
Se disolvieron 500 mg (171 mmol) de 12a (sal de TFA) en 10 ml 1/1 (v/v) de metanol/agua, se añadieron 129 mg (3.41 mmol) de NaBH₄ y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0.5 ml de ácido acético y 13 se purificaron por RP-HPLC.

13: Rendimiento 313 mg (62%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 204.2$ (MW+Na calculado = 204.2 g/mol)

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, Fenol), 7.84 (bs, 3H, NH₃⁺), 6.89 (s, 2H, CH_{ar}), 5.85 (d, 1H, Hidroxilo, J=3.7 Hz), 4.62 (m, 1H, CH_{Bencilo}), 2.93 (m, 1H, CH_a), 2.80 (m, 1H, CH_b), 2.17 (s, 6H, CH₃).

Síntesis de compuestos 14a a 14d



14a R1 = R2 = Me, R7 = H, R4 = Mmt

14b R1 = R2 = H, R7 = Me, R4 = Mmt

14c R1 = OMe, R2 = H, R7 = Me, R4 = Mmt

14d R1 = H, R2 = H, R7 = Me, R4 = Trt

13 (sal de TFA, 159 mg, 0.541 mmol) se acopló al compuesto 2 como se describe para el compuesto 3a para producir 14a.

14b o 14c se sintetizaron como se describió anteriormente utilizando sinefrina (335 mg, 2.00 mmol) o metanefrina (sal de HCl, 281 mg, 1.20 mmol), respectivamente. Se acopló sinefrina (335 mg, 2.3 mmol) a ácido 3-tritilsulfanil-propiónico como se describió anteriormente para producir 14d.

14a: Rendimiento 254 mg (87%)

MS $[M+Na]^+ = 564.7$ (MW+Na calculado = 564.3 g/mol)

14b: Rendimiento 760 mg (72%)

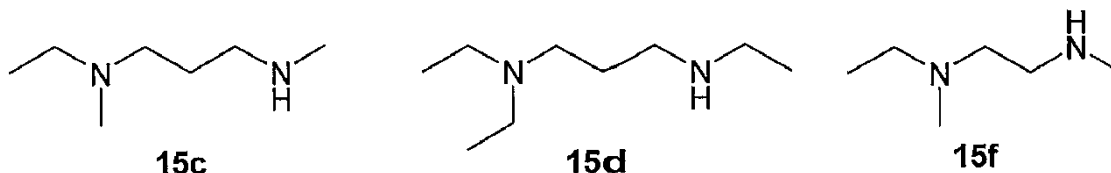
MS $[M+Na]^+ = 550.2$ (MW+Na calculado = 550.3 g/mol)

14c: Rendimiento 530 mg (80%) MS $[M+Na]^+ = 580.4$ (MW+Na calculado = 580.4 g/mol)

14d: Rendimiento 567 mg (49%)

MS $[M+Na]^+ = 520.5$ (MW+Na calculado = 520.7 g/mol)

Síntesis de compuestos 15c, 15d y 15f.



Protocolo de síntesis general:

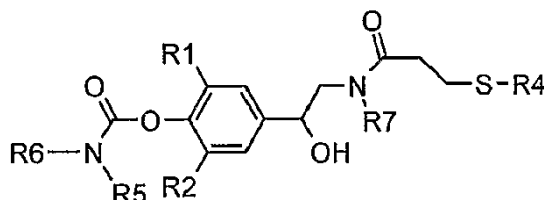
Se incubó 1 g de resina de cloruro de 2-clorotritilo (cargando 1.4 mmol/g) durante 1 h con N,N'-dimetilpropano-1,3-diamina (para síntesis de 15c), o N,N'-dietil-propano-1,3-diamina (para síntesis de 15d) o N,N'-dimetil-etano-1,2-diamina (4 eq) (para síntesis de 15f) en DCM. Después del lavado de la resina con DMF, las aminas se acetilaron con 1/1/2 (v/v/v) de anhídrido acético/piridina/DMF durante 14 h. La resina se lavó con THF y se secó. Se añadió gota a gota $LiAlH_4$ (1 M en THF, 4 eq) a la resina suspendida en THF. La suspensión resultante se agitó durante 3 horas a 45°C en atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar, se añadió solución acuosa de sal de Rochelle y la resina se separó y se secó. Los compuestos se escindieron de la resina con 2/1 (v/v) HFIP/DCM (2 x 30 min). Los componentes volátiles se evaporaron y los productos 15c, 15d o 15f se usaron en los siguientes pasos sin purificación adicional.

15c MS $[M+H]^+ = 131.2$ (MW = 130.1 g/mol)

15d MS $[M+H]^+ = 159.2$ (MW = 158.1 g/mol)

15f MS $[M+H]^+ = 117.1$ (MW = 116 g/mol)

Síntesis de los compuestos 16a a 16f y 16i.



16a $R1 = R2 = R5 = Me$, $R6 = 2-(dimetilamino)etilo$, $R7 = H$, $R4 = Mmt$

16b $R1 = OMe$, $R2 = H$, $R5 = Et$, $R6 = 2-(dietilamino)etilo$, $R7 = H$, $R4 = Mmt$

16c $R1 = OMe$, $R2 = H$, $R5 = Me$, $R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo$, $R7 = Me$, $R4 = Mmt$

16d $R1 = R2 = H$, $R5 = Me$, $R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo$, $R7 = Me$, $R4 = Mmt$

16e $R1 = OMe$, $R2 = H$, $R5 = Et$, $R6 = 3-(dietilamino)propilo$, $R7 = Me$, $R4 = Mmt$

16f $R1 = R2 = H$, $R5 = Et$, $R6 = 3-(dietilamino)propilo$, $R7 = Me$, $R4 = Mmt$

16i $R1 = R2 = H$, $R5 = Et$, $R6 = 2-(dietilamino)etilo$, $R7 = Me$, $R4 = Trt$

Se disolvió 14a (120 mg, 0.222 mmol) en 1.5 ml de THF seco. Se añadieron cloroformiato de p-nitrofenilo (45 mg, 0.222 mmol) y DIEA (113 μ l, 0.665 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 15a (N,N,N'-trimetil-etilen-1,2-diamina) (72 μ l, 0.554 mmol) y se continuó la agitación durante 30 min. El disolvente se eliminó al vacío, se agregaron 100 μ l de AcOH y 16a se purificó por RP-HPLC.

16b se sintetizó como se describe anteriormente a partir de 3b (80 mg, 0.15 mmol) y 15b (N,N,N'-tri-etil-etileno-1,2-diamina) (55 mg, 0.38 mmol).

16c o 16d se sintetizaron como se describe anteriormente a partir de 14c (56 mg, 0.1 mmol) o 14b (53 mg, 0.1 mmol), respectivamente, y diamina 15c.

16e o 16f se sintetizaron como se describió anteriormente a partir de 14c (56 mg, 0.1 mmol) o 14b, respectivamente, (53 mg, 0.1 mmol) y diamina 15d.

16i se sintetizó como se describió anteriormente a partir de 14d (350 mg, 0.7 mmol) y 15b (N,N,N'-tri-etil-etileno-1,2-diamina) (180 μ l, 1 mmol). 16a: Rendimiento 120 mg (69%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 692.4$ (MW+Na calculado = 692.9 g/mol)

16b: Rendimiento de 48 mg (40%) como sal de TFA

5 MS $[M+Na]^+ = 736.3$ (MW+Na calculado = 736.4 g/mol)

16c: Rendimiento de 8 mg (10%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 736.4$ (MW+Na calculado = 736.4 g/mol)

16d: Rendimiento 20 mg (25%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 706.3$ (MW+Na calculado = 706.3 g/mol)

10 16e: Rendimiento 2 mg (3%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 764.6$ (MW+Na calculado = 764.4 g/mol)

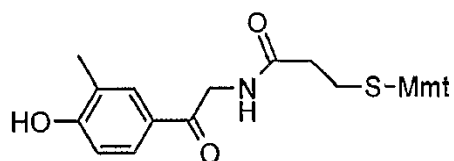
16f: Rendimiento 6 mg (8%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 734.4$ (MW+Na calculado = 734.3 g/mol)

16i: Rendimiento 152 mg (28%) como sal de TFA

15 MS $[M+Na]^+ = 690.5$ (MW+Na calculado = 690.9 g/mol)

Síntesis del compuesto 17



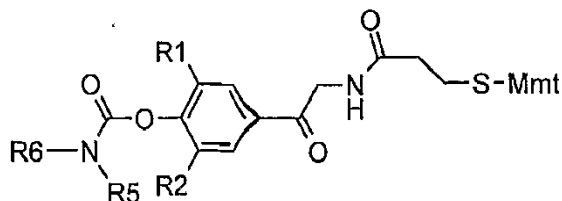
17

La amina 12b (sal de TFA) se acopló al compuesto 2 como se describe para el compuesto 3a.

17: Rendimiento 608 mg (74%)

20 MS $[M+Na]^+ = 548.3$ (MW+Na calculado = 548.7 g/mol)

Síntesis de los compuestos 18a y 18b.



18a R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 3-(dimetilamino)propilo

18b R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 2-(N-etil-N-metilamino)etilo

25 383 mg (0.729 mmol) de 17 se hicieron reaccionar con cloroformiato de p-nitrofenilo y N,N,N'-trimetil-propano-1,3-diamina (15e) o 15f, respectivamente, para producir 18a o 18b como se describe para el compuesto 16a.

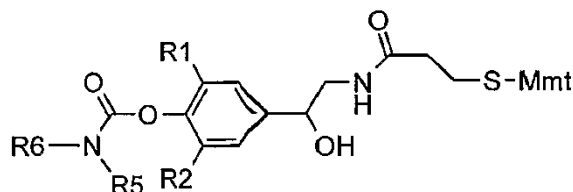
18a: Rendimiento 287 mg (50%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 690.7$ (MW+Na calculado = 690.9 g/mol)

18b: Rendimiento 148 mg (26%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 690.9$ (MW+Na calculado = 690.9 g/mol)

Síntesis de compuestos 16g y 16h.



16g R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 3-(dimetilamino)propilo

5 16h R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 2-(N-etil-N-metilamino)etilo

Se disolvió 18a (287 mg, 0.367 mmol, sal de TFA) en 5 ml de metanol, se añadió NaBH₄ (41 mg, 1.07 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0.5 ml de ácido acético y se purificaron 16 g mediante RP-HPLC.

Se hizo reaccionar 18b (8 mg, 0.010 mmol, sal de TFA) como se describe anteriormente para producir 16 h.

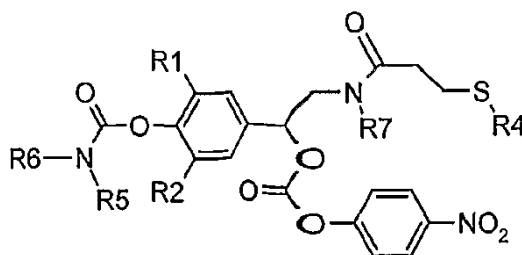
10 16 g: Rendimiento de 201 mg (70%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 692.7$ (MW+Na calculado = 692.9 g/mol)

16h: Rendimiento 6 mg (77%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 692.7$ (MW+Na calculado = 692.9 g/mol)

Síntesis de los compuestos 19a a 19i.



- 15
- 19a R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo, R7 = H, R4 = Mmt
- 19b R1 = OMe, R2 = H, R5 = Et, R6 = 2-(dietilamino)etilo, R7 = H, R4 = Mmt
- 19c R1 = OMe, R2 = H, R5 = Me, R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo, R7 = Me, R4 = Mmt
- 19d R1 = R2 = H, R5 = Me, R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo, R7 = Me, R4 = Mmt
- 20 19e R1 = OMe, R2 = H, R5 = Et, R6 = 3-(dietilamino)propilo, R7 = Me, R4 = Mmt
- 19f R1 = R2 = H, R5 = Et, R6 = 3-(dietilamino)propilo, R7 = Me, R4 = Mmt
- 19g R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 3-(dimetilamino)propilo, R7 = H, R4 = Mmt
- 19h R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 2-(N-etil-N-metilamino)etilo, R7 = H, R4 = Mmt
- 19i R1 = R2 = H, R5 = Et, R6 = 2-(dietilamino)etilo, R7 = Me, R4 = Trt
- 25 Los carbonatos 19a a 19i se sintetizaron de 16a a 16i, respectivamente, como se describe para el compuesto 7a. 19a: Rendimiento de 98 mg (72%) como sal de TFA
- MS $[M+Na]^+ = 857.8$ (MW+Na calculado = 858.0 g/mol)
- 19b: Rendimiento 6 mg (11%) como sal de TFA
- MS $[M+Na]^+ = 901.8$ (MW+Na calculado = 901.5 g/mol)
- 30 19c: Rendimiento 1 mg (15%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 901.4$ (MW+Na calculado = 901.5 g/mol)

19d: Rendimiento 8 mg (29%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 871.4$ (MW+Na calculado = 871.4 g/mol)

19e: Rendimiento de 0.3 mg (18%) como sal de TFA

5 MS $[M+Na]^+ = 929.4$ (MW+Na calculado = 929.5 g/mol)

19f: Rendimiento de 4 mg (45%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 899.7$ (MW+Na calculado = 899.6 g/mol)

19 g: Rendimiento 6 mg (6%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 857.8$ (MW+Na calculado = 858.0 g/mol)

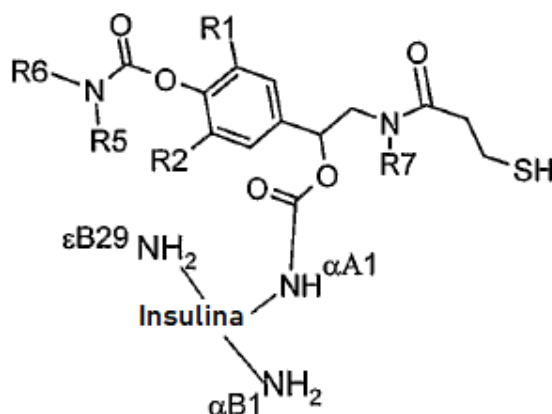
10 19h: Rendimiento de 0.8 mg (11%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 857.7$ (MW+Na calculado = 858.0 g/mol)

19i: Rendimiento de 77 mg (49%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 856.2$ (MW+Na calculado = 856.0 g/mol)

Síntesis de compuestos 20a a 20f



15

20a R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo, R7 = H

20b R1 = OMe, R2 = H, R5 = Et, R6 = 2-(dietilamino)etilo, R7 = H

20c R1 = OMe, R2 = H, R5 = Me, R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo, R7 = Me

20d R1 = R2 = H, R5 = Me, R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo, R7 = Me

20 20e R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 3-(dimetilamino)propilo, R7 = H

20f R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 2-(N-etil-N-metilamino)etilo, R7 = H

Los derivados de insulina 20a, 20b, 20c, 20d, 20e o 20f se sintetizaron a partir de 19a, 19b, 19c, 19d, 19g o 19h respectivamente, como se describe para el compuesto 8a.

20a MS $[M+3H]^{3+} = 2077.3$ $[M+4H]^{4+} = 1559.2$ (MW calculado = 6231.3 g/mol)

25 20b MS $[M+3H]^{3+} = 2093.0$ $[M+4H]^{4+} = 1569.6$ (MW calculado = 6274 g/mol)

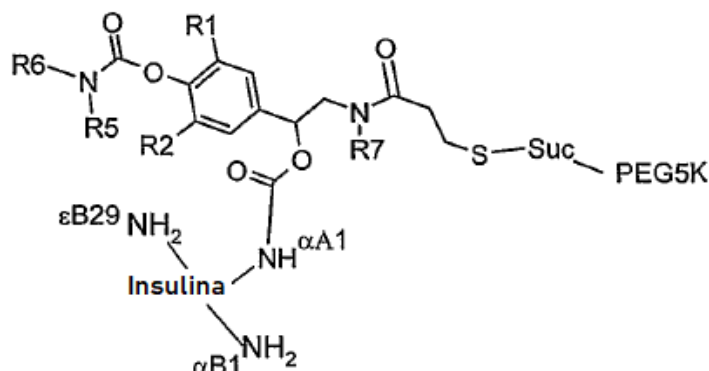
20c MS $[M+3H]^{3+} = 2090.8$ $[M+4H]^{4+} = 1568.7$ (MW calculado = 6274 g/mol)

20d MS $[M+3H]^{3+} = 2081.3$ $[M+4H]^{4+} = 1561.8$ (MW calculado = 6244 g/mol)

20e MS $[M+3H]^{3+} = 2077.1$ $[M+4H]^{4+} = 1558.2$ (MW calculado = 6231.3 g/mol)

20f MS $[M+3H]^{3+} = 2076.7$ $[M+4H]^{4+} = 1559.3$ (MW calculado = 6231.3 g/mol)

Síntesis de los compuestos 21a a 21f (derivados de insulina monopegilados)



21a R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo, R7 = H

21b R1 = OMe, R2 = H, R5 = Et, R6 = 2-(dietilamino)etilo, R7 = H

5 21c R1 = OMe, R2 = H, R5 = Me, R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo, R7 = Me

21d R1 = R2 = H, R5 = Me, R6 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo, R7 = Me

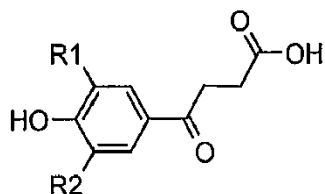
21e R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 3-(dimetilamino)propilo, R7 = H

21f R1 = R5 = Me, R2 = H, R6 = 2-(N-etil-N-metilamino)etilo, R7 = H

10 Los derivados de insulina 21a, 21b, 21c, 21d, 21e o 21f se sintetizaron a partir de los compuestos 20a, 20b, 20c, 20d, 20e o 20f, respectivamente, como se describe para el compuesto 9a.

21a a 21f: tiempo de retención SEC: 19.5 min

Síntesis de los compuestos 23a y 23b.



23a R1 = Yo, R2 = H

15 23b R1 = R2 = Me

o-Cresol (22a) (1 eq), anhídrido succínico (1 eq) y AlCl_3 (3 eq) en nitrobenceno se calentaron a 100°C durante 1 h. La mezcla de reacción se vertió en HCl/hielo y se extrajo con éter. La capa orgánica se extrajo con NaOH 1 N y la capa acuosa se acidificó con HCl concentrado. La capa acuosa se extrajo con éter y el éter se evaporó. 23a se purificó por RP-HPLC.

20 23b se sintetizó a partir de 2,6-dimetilfenol (22b) como se describe anteriormente.

23a: Rendimiento 552 mg (31%) MS $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 231.0$ (MW+Na calculado = 231.2 g/mol)

RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] = 12.05 (bs, 1H, CO_2H), 10.23 (s, 1H, fenol OH), 7.74 (s, 1H, CH_{ar}), 7.7 (d, 1H, CH_{ar} , $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz), 6.86 (d, 1H, CH_{ar} , $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz), 3.13 (t, 2H, C(O)CH_2 , $3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz), 2.53 (t, 2H, CH_2CO_2 , $3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz), 2.16 (s, 3H, CH_3)

25 23b: Rendimiento 166 mg (15%)

MS $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 245.4$ (MW+Na calculado = 245.2 g/mol)

Síntesis del compuesto 24



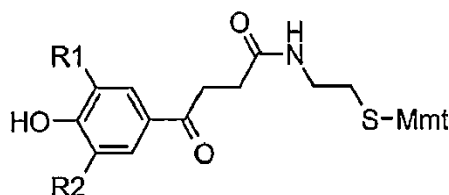
Se disolvieron 1.85 g (16.02 mmol) de clorhidrato de cisteamina en 15 ml de TFA y se agregaron 2.47 g (8.01 mmol) de MmtCl. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min, el disolvente se evaporó al vacío. El residuo se disolvió en éter dietílico y se extrajo con NaHCO₃ acuoso saturado, IN H₂SO₄ y salmuera. El disolvente se evaporó y 24 se purificó por RP-HPLC.

5

24: Rendimiento de 1.11 g (30%) como sal de TFA

TLC (AcOEt/Et₃N 99/1), R_f = 0.24

Síntesis de los compuestos 25a y 25b.



10 25a R1 = Me, R2 = H

25b R1 = R2 = Me

23a (1eq), HOBt (1.1 eq) y DIC (1 eq) se disolvieron en DMF y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 24 (sal de TFA, 1 eq) y DIEA (3 eq) y la solución se agitó durante 60 min. Se añadió ácido acético y 25a se purificó por RP-HPLC.

15 25b se sintetizó a partir de 23b como se describe anteriormente.

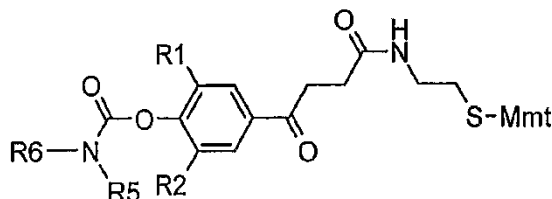
25a: Rendimiento 552 mg (25%)

MS [M+Na]⁺ = 562.7 (MW+Na calculado = 562.7 g/mol)

25b: Rendimiento 15 mg (40%)

MS [M+Na]⁺ = 576.6 (MW+Na calculado = 576.6 g/mol)

20 Síntesis de los compuestos 26a y 26b.



26a R1 = Me, R2 = H, R5 = R6 = 3-(dimetilamino)propilo

26b R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo

25 Se hicieron reaccionar 267 mg (0.495 mmol) de 25a con cloroformato de p-nitrofenilo y N-(3-dimetilaminopropil)-N',N'-dimetil-propano-1,3-diamina (15 g) para producir 26a como se describe para el compuesto 16a.

26b se sintetizó como se describió anteriormente usando 15 mg de 25b y N,N,N'-trimetil-etano-1,2-diamina (15a).

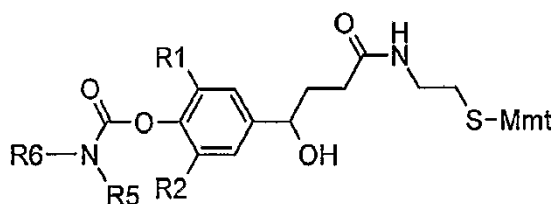
26a: Rendimiento 282 mg (58%) como sal doble de TFA

MS [M+Na]⁺ = 775.2 (MW+Na calculado = 776.0 g/mol)

26b: Rendimiento 17 mg (70%) como sal de TFA

30 MS [M+Na]⁺ = 704.5 (MW+Na calculado = 704.6 g/mol)

Síntesis de los compuestos 27a y 27b.



27a R1 = Me, R2 = H, R5 = R6 = 3-(dimetilamino)propilo

27b R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo

- 5 26a (272 mg, 0.277 mmol, sal doble de TFA) se disolvió en 5 ml de metanol, se añadió NaBH₄ (42 mg, 1.09 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0.5 ml de ácido acético y 27a se purificó por RP-HPLC.

El alcohol 27b se sintetizó igualmente a partir de 26b (17 mg, 25 µmol, sal de TFA).

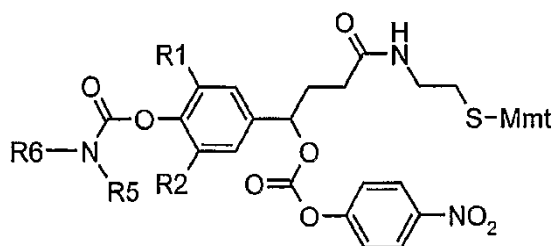
27a: Rendimiento 142 mg (52%) como sal doble de TFA

MS [M+Na]⁺ = 777.9 (MW+Na calculado = 778.0 g/mol)

- 10 27b: Rendimiento 6 mg (40%) como sal de TFA

MS [M+Na]⁺ = 706.5 (MW+Na calculado = 706.6 g/mol)

Síntesis de los compuestos 28a y 28b



28a R1 = Me, R2 = H, R5 = R6 = 3-(dimetilamino)propilo

- 15 28b R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo

Los carbonatos 28a o 28b se sintetizaron a partir de 27a o 27b, respectivamente, como se describe para el compuesto 7a.

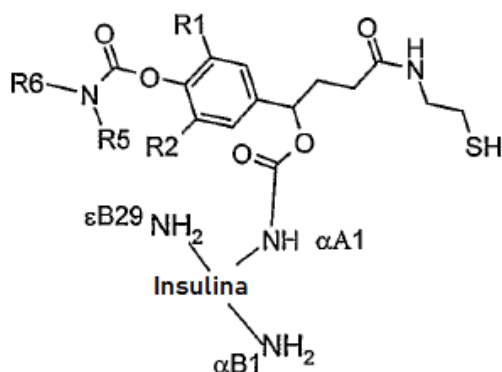
28a: Rendimiento 1 mg (29%)

MS [M+Na]⁺ = 942.9 (MW+Na calculado = 943.2 g/mol)

- 20 28b: Rendimiento 1.5 mg (19%)

MS [M+Na]⁺ = 871.6 (MW+Na calculado = 871.7 g/mol)

Síntesis de los compuestos 29a y 29b.



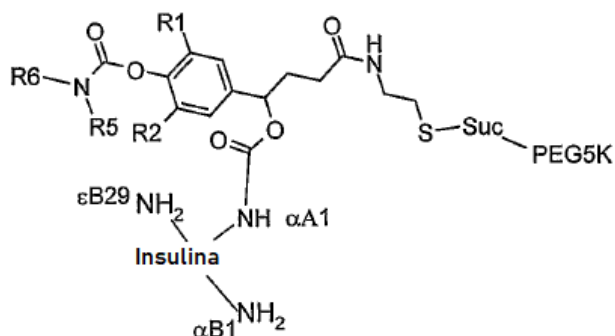
29a R1 = Me, R2 = H, R5 = R6 = 3-(dimetilamino)propilo

29b R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo

5 Los derivados de insulina 29a o 29b se sintetizaron a partir de 28a o 28b, respectivamente, como se describe para el compuesto 8a.

29a MS $[M+3H]^{3+} = 2105.8$ $[M+4H]^{4+} = 1580.2$ (MW calculado = 6316.4 g/mol) 29b MS $[M+3H]^{3+} = 2081.8$ $[M+4H]^{4+} = 1562.4$ (MW calculado = 6244 g/mol)

Síntesis de los derivados de insulina monopegilados 30a y 30b



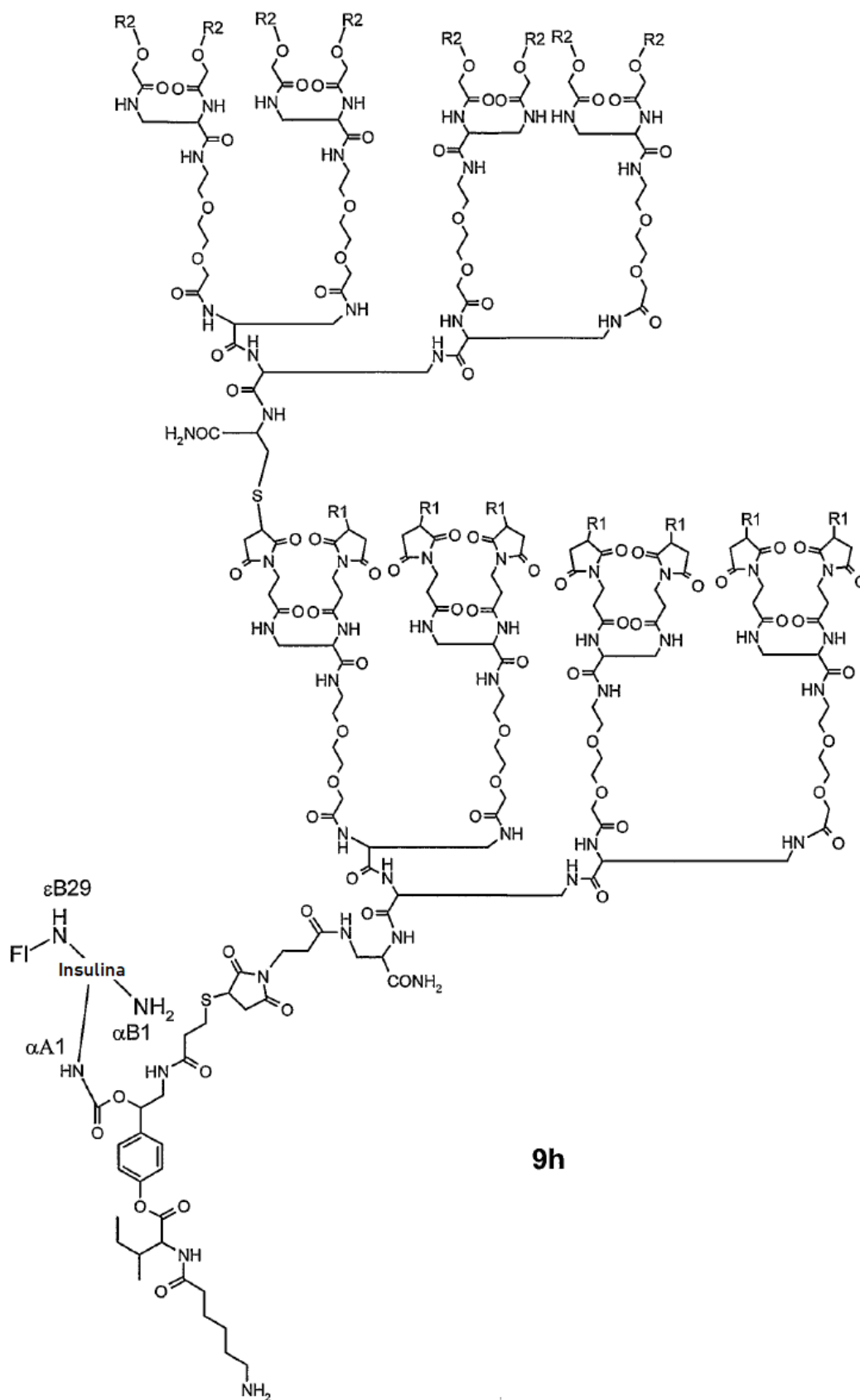
10 30a R1 = Me, R2 = H, R5 = R6 = 3-(dimetilamino)propilo

30b R1 = R2 = R5 = Me, R6 = 2-(dimetilamino)etilo

Los derivados de insulina 30a o 30b se sintetizaron a partir de 29a o 29b, respectivamente, como se describe para el compuesto 9a.

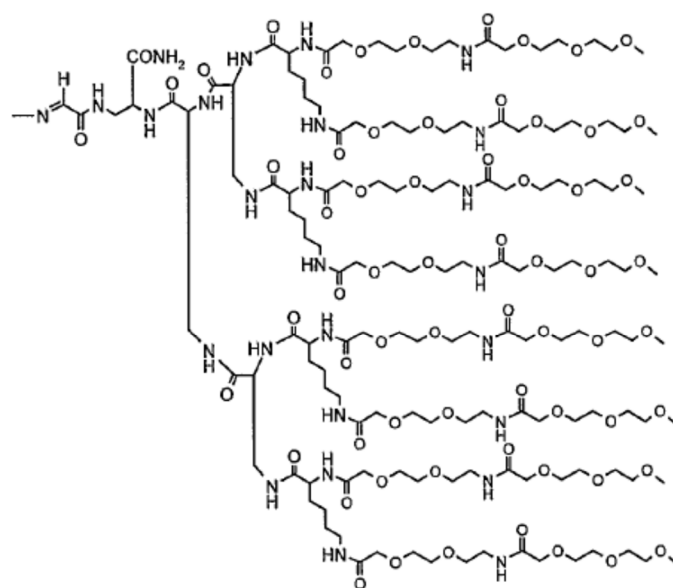
30a y 30b: Tiempo de retención de SEC: 19.5 min

15 Síntesis de un profármaco polimérico de acuerdo con la fórmula la con un grupo de enmascaramiento unido a éster y un portador dendrítico (9h)

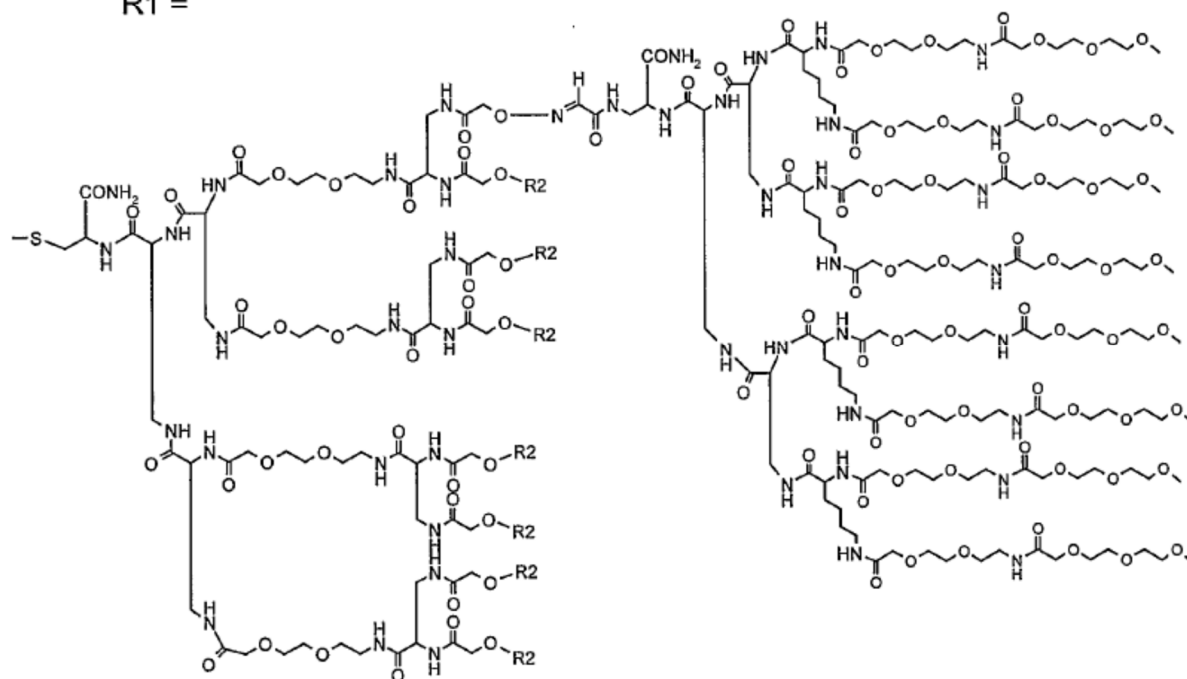


9h

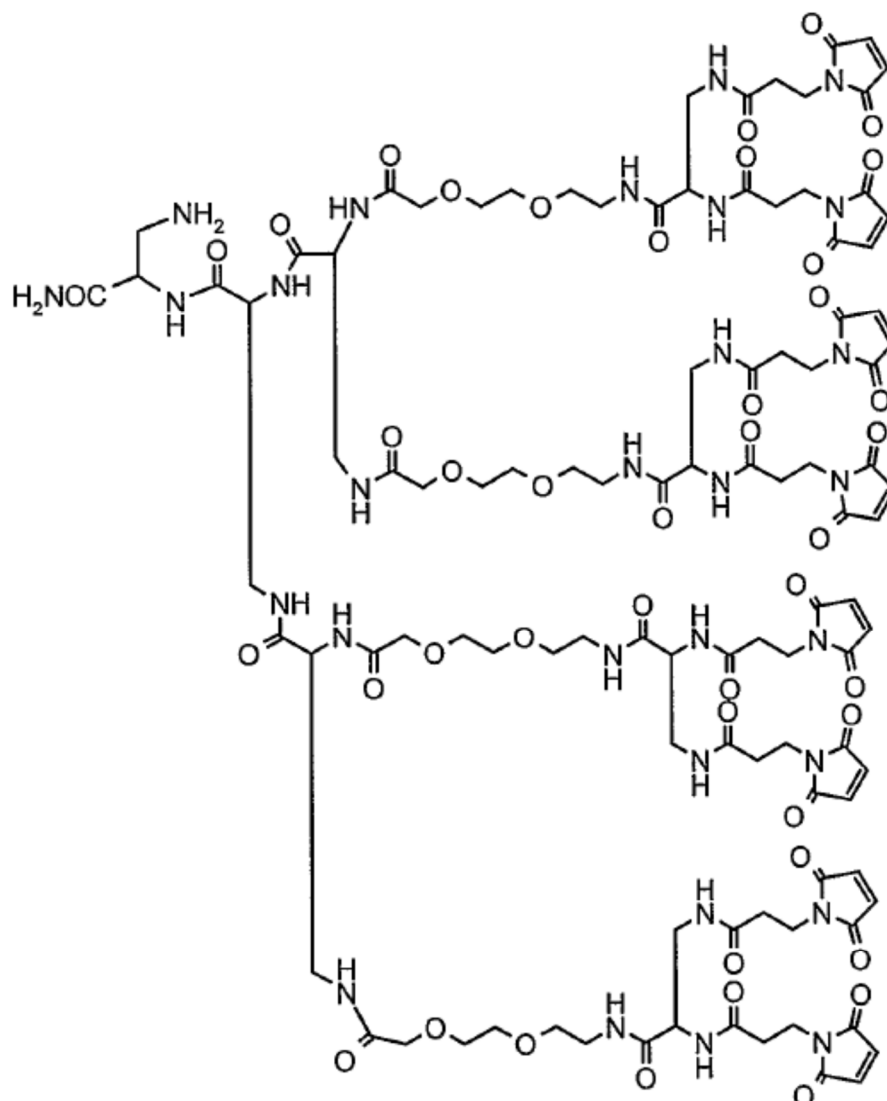
R2 =



R1 =



Síntesis del compuesto 31

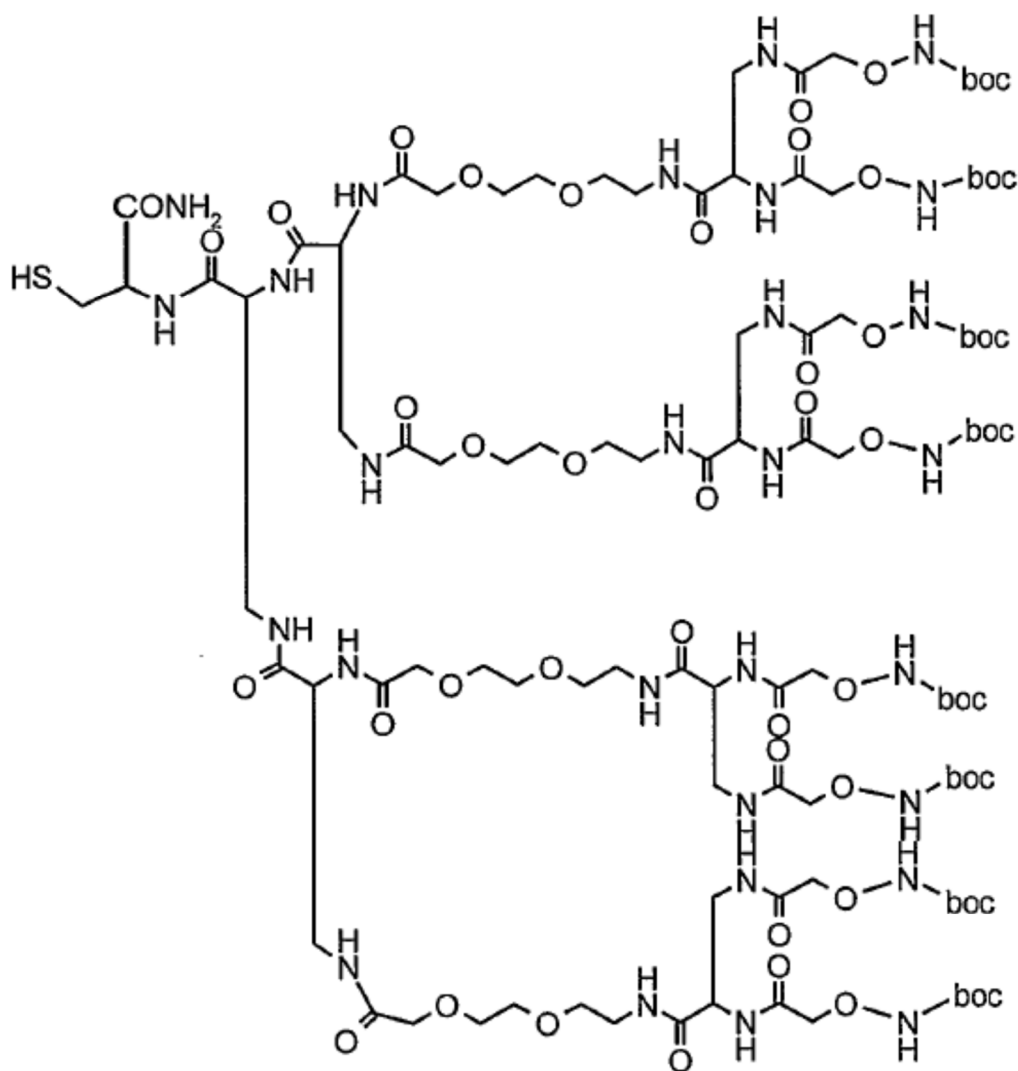


31

5 31 se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar de síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Dpr(Boc)-OH, Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH, Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH, Fmoc-Ado-OH y Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH se acoplaron a Resina amida NovaSyn TG Sieber. Después de la eliminación final de fmoc, la resina se agitó con 5 eq de ácido maleimidopropiónico y 5 eq de DIC en relación con los grupos amino en DMF durante 30 min. 31 se escindió de la resina con TFA/TES/agua 95/3/2 (v/v/v). Después de la evaporación del disolvente, el producto 31 se purificó por RP-HPLC.

MS: $[M+H]^+ = 2494.6$ (MW calculado = 2495.4 g/mol)

Síntesis del compuesto 32

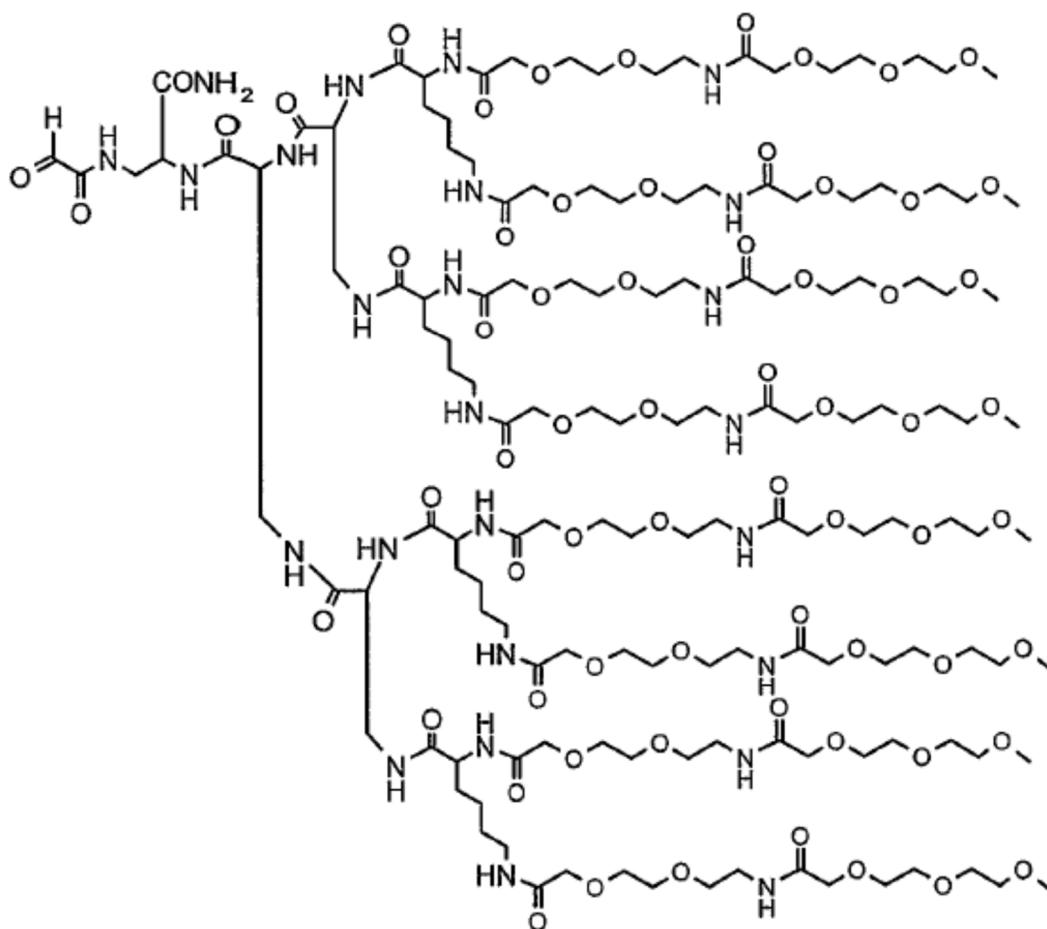


32

El compuesto 32 se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar de síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH, Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH, Fmoc-Ado-OH y Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH se acoplaron a resina amida NovaSynTG Sieber.

- 5 Después de la eliminación final de fmoc, la resina se agitó con 3 eq de ácido Boc-aminoxiacético, 3 eq de DIC y 3 eq de HOBT en relación con los grupos amino en DMF durante 30 min. 32 se escindió de la resina con DCM/TFA/TES 97/1/2 (v/v/v). Después de la adición de 0.8 eq de piridina en relación con TFA, el disolvente se evaporó y el producto 32 se purificó por RP-HPLC.

MS: $[M+H]^+ = 2688.2$ g/mol (MW calculado = 2688.8 g/mol) Síntesis del compuesto 33

**33**

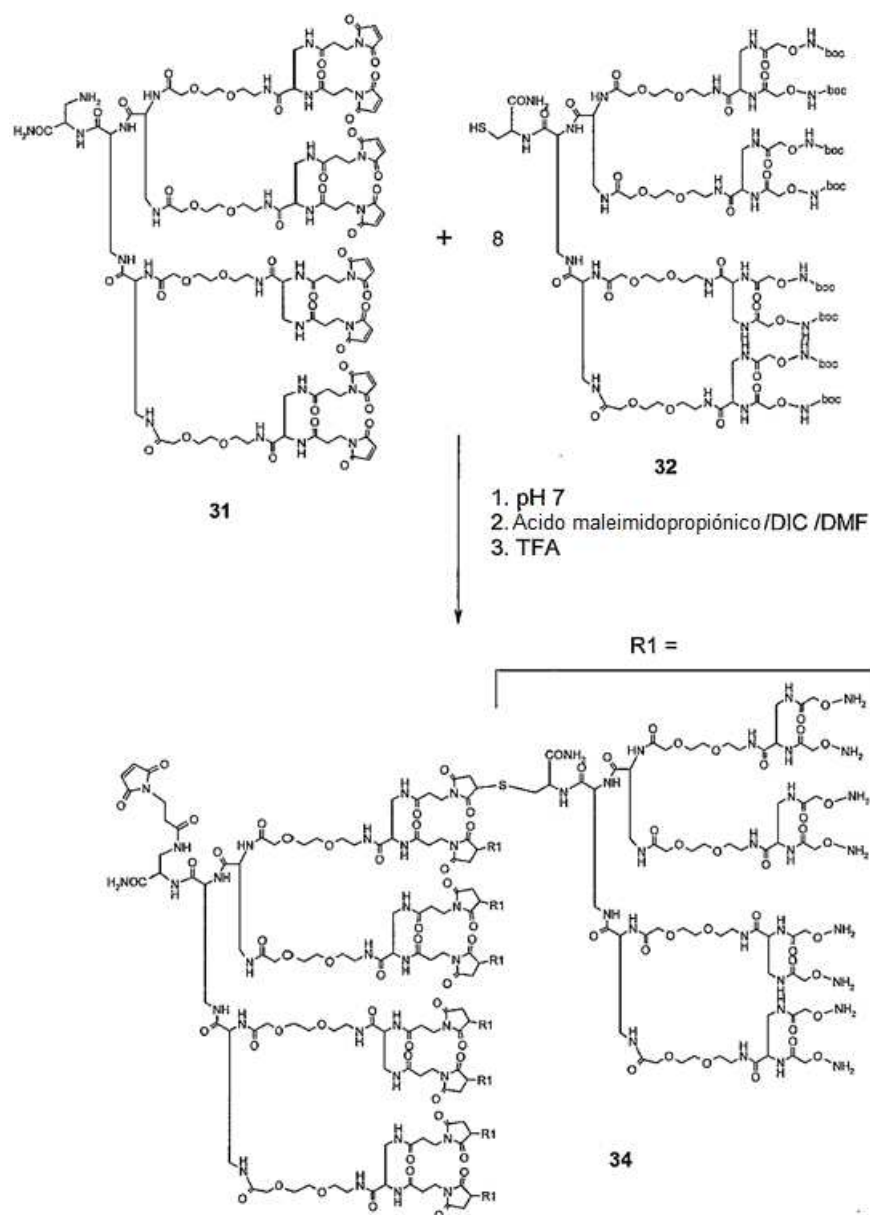
El compuesto 33 se obtuvo de acuerdo con el protocolo estándar de síntesis en fase sólida. Los aminoácidos Fmoc-Dpr(ivDde)-OH, Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH, Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, y Fmoc-Ado-OH se acoplaron a Resina amida NovaSyn TG Sieber.

- 5 Después de la eliminación final de fmoc, la resina se agitó con 3 eq de ácido 3,6,9-trioxadecanoico, 3 eq de PyBOP y 6 eq de DIEA en relación con los grupos amino en DMF durante 60 min.

- 10 Para escindir el grupo protector ivDde, la resina se trató tres veces con hidrazina al 2% en DMF. Después del lavado, se acoplaron 3 eq de Fmoc-Ser-OH con 3 eq de DIC y 3 eq de HOBT durante 30 min. Después de la eliminación final, la resina se retiró y el producto se escindió de la resina con DCM/TFA/TES 88/10/2 (v/v/v). El disolvente se evaporó y el residuo se oxidó con 10 eq de peryodato de sodio en fosfato de sodio 0.1 M 3/2 (v/v), pH 7/acetronitrilo durante 15 minutos para producir 33. El producto 33 se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

MS: $[M+H]^+ = 3372.1$ g/mol (3372.8 g/mol)

Síntesis del compuesto 34



Se disolvieron 6 mg (2.4 μmol) del compuesto 31 en 1 ml de acetonitrilo 2/1 (v/v)/fosfato de sodio 0.1 M, pH 7 y se agregaron 65 mg (24.2 μmol) del compuesto 32. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y luego el producto se purificó por RP-HPLC y se liofilizó (rendimiento: 45 mg (78%)).

El producto liofilizado (45 mg) se disolvió en 0.5 ml de DMF y se añadieron 10 μl de DIEA. Se añadieron 5 mg (30 μmol) de ácido 3-maleimidopropiónico y 4.7 μl (30 μmol) de DIC en 150 μl de DMF y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, el producto se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

El producto liofilizado se incubó durante 10 minutos en 95/5 (v/v) de TFA/agua y luego el disolvente se eliminó en una corriente de nitrógeno. El producto 34 se purificó por RP-HPLC y se liofilizó (rendimiento global para las tres etapas: 20 mg (47%)).

MS: 17700-18200 (pico ancho) (MW calculado = 17749 g/mol)

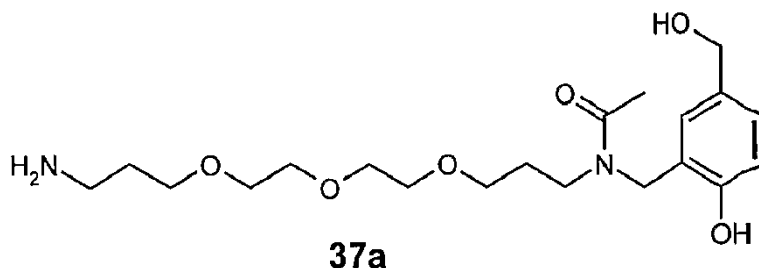
Síntesis del compuesto 9h.

Se mezclaron 1.5 mg (225 nmol) 8g y 5 mg (280 nmol) 34, se disolvieron en 300 μl de 2/1 (v/v) 0.1 M de regulador de fosfato de sodio pH 7/acetonitrilo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. El producto se purificó por RP-HPLC y se liofilizó. (rendimiento 4 mg, 160 nmol, 70%)

El producto liofilizado se disolvió en 200 μ l de regulador de citrato de sodio 0.1 M a pH 1.5 y se agregaron 69 mg (20.5 μ mol) 33 en 200 μ l de 2/1 (v/v) de regulador de acetonitrilo/citrato de sodio de pH 1.5. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y el producto 9h se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (columna: Superdex 200, regulador: HEPES 10 mM, pH 7.4, Tween-20 al 0.005%, EDTA 3 mM, rata de flujo: 0.75 ml/min)

5 Tiempo de elución SEC: 15 min

Síntesis del compuesto 37^a



10 Se incubaron 250 mg (0.35 mmol) de resina de cloruro de 2-clorotritilo (con una carga de 1,4 mmol/g) durante 1.5 h con 308 mg (4 eq., 1.4 mmol) de 4,7,10-trioxatridecano-1,13-diamina en 4 ml DCM para generar 35a. La resina se lavó con DCM y se secó. Se agregaron 107 mg (0.7 mmol) de HOBt, 110 μ l (0.7 mmol) de DIC y 150 mg (0.9 mmol) de ácido 5-formil salicílico en 3 ml de DMF y la suspensión resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente para producir 36a. Después de lavar con DCM y THF, la resina se suspendió en 6 ml de THF y se añadieron gota a gota 3 ml (3 mmol) de BH₃ THF (1 M en THF, 8.5 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a 45°C en atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar 4 ml de THF, se añadieron sucesivamente 0.8 ml de DIEA y 1.6 ml de MeOH. Se

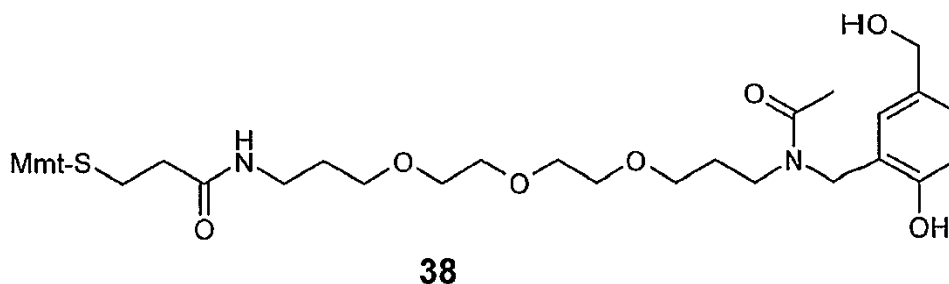
15 agregaron 210 mg (0.84 mmol) de I₂ (como una solución concentrada de THF) y la suspensión se agitó durante 1 h. La resina se lavó repetidamente (tres veces cada una) con THF, DMF, MeOH y DCM. La resina seca se hizo reaccionar con 107 mg (0.7 mmol) de HOBt, 110 μ l (0.7 mmol) de DIC y 55 μ L (0.9 mmol) de AcOH en 3 ml de DMF durante 1 h. Después del lavado de la resina con DMF y DCM, el compuesto 37a se escindió de la resina con 2/1 (v/v) HFIP/DCM (dos veces durante 30 minutos). Los componentes volátiles se evaporaron y el producto 37a se usó en la siguiente

20 etapa sin purificación adicional.

37a: Rendimiento 29 mg (20%) como sal de TFA

MS [M+Na]⁺ = 421.4 (MW+Na calculado = 421.5 g/mol)

Síntesis del compuesto 38

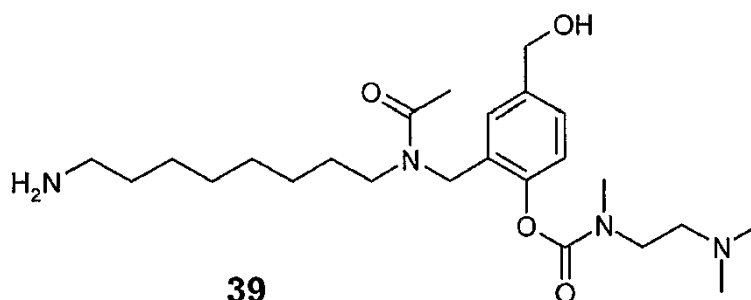


25 Se hicieron reaccionar 24 mg (0.06 mmol) 37a, 31 mg (0.06 mmol) de PyBOP, 32 μ l (0.18 mmol) de DIEA y 23 mg (0.06 mmol) 2 en 0.5 ml de DMF durante 50 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de 50 μ l, el producto de ácido acético 38 se purificó por RP-HPLC.

38: Rendimiento 7 mg (15%)

MS [M+Na]⁺ = 781.3 (MW+Na calculado = 781.6 g/mol)

30 Síntesis del compuesto 39

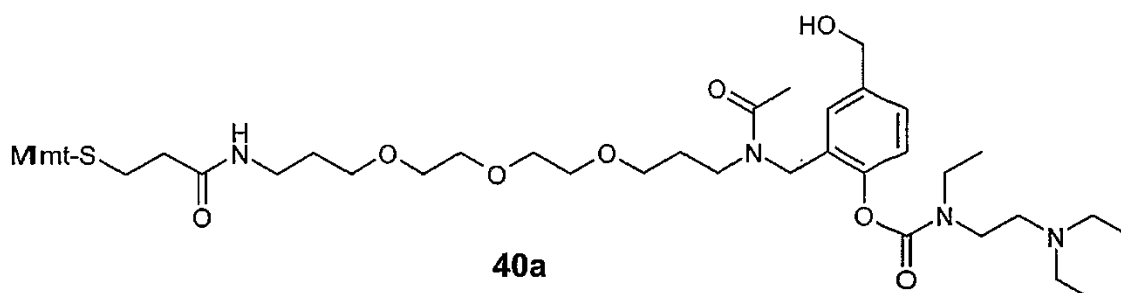


Se incubaron 300 mg (0.42 mmol) de resina de cloruro de 2-clorotritilo (cargando 1.4 mmol/g) durante 1.5 h con 245 mg (4 eq., 1.7 mmol) de 1,8-diaminooctano en 4 ml de DCM para obtener 35b. La resina se lavó con DCM y se secó. Se agregaron 107 mg (0.7 mmol) de HOBT, 110 μ l (0.7 mmol) de DIC y 150 mg (0.9 mmol) de ácido 5-formil salicílico en 3 ml de DMF y la suspensión resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente para generar 36b. Después de lavar con DCM y THF, la resina se suspendió en 6 ml de THF y se agregaron gota a gota 3 ml (3 mmol) de BH₃ THF (1 M en THF). La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a 45°C en atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar 4 ml de THF, se añadieron sucesivamente 0.8 ml de DIEA y 1.6 ml de MeOH. Se agregaron 210 mg (0.84 mmol) de I₂ (como una solución concentrada de THF) y la suspensión se agitó durante 1 h. La resina se lavó repetidamente (tres veces cada una) con THF, DMF, MeOH y DCM. La resina seca reaccionó con 107 mg (0.7 mmol) de HOBT, 110 μ l (0.7 mmol) de DIC y 55 μ L (0.9 mmol) de AcOH en 3 ml de DMF durante 1 h. Después del lavado de la resina con DMF y el compuesto 37b de DCM, se hicieron reaccionar 78 mg (0.39 mmol) de cloroformiato de p-nitrofenilo y 210 μ l (1.2 mmol) de DIEA en 1/1 (v/v) de THF/DCM durante 30 min a temperatura ambiente. La resina separada se suspendió en 1/1 (v/v) THF/DCM y se agregaron 210 μ l (1.2 mmol) de N,N,N'-trimetiletilendiamina. La suspensión resultante se agitó durante 25 min a temperatura ambiente. La resina se separó y se lavó con DCM. El producto 39 se escindió de la resina con 2/1 (v/v) HFIP/DCM (dos veces durante 30 min). Los componentes volátiles se evaporaron y el producto 39 se purificó por HPLC.

39: Rendimiento 16 mg (8%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 473.5$ (MW+Na calculado = 473.3 g/mol)

Síntesis del compuesto 40^a

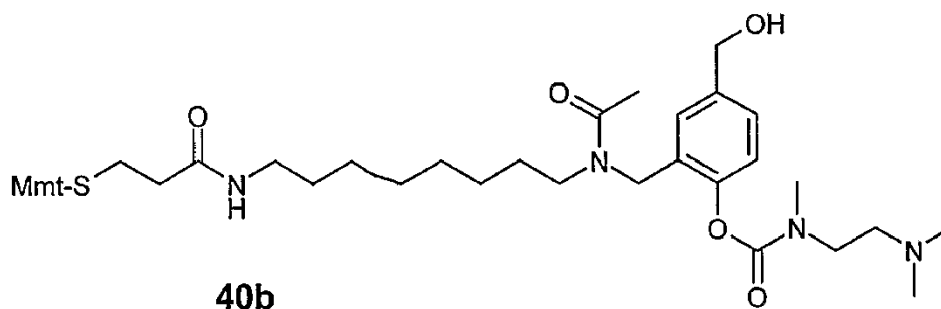


Se disolvió 38 (7 mg, 9 μ mol) en 200 μ l de THF seco. Se añadieron cloroformiato de p-nitrofenilo (2.0 mg, 10 μ mol) y DIEA (4.4 μ l, 25 μ mol) y la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió N,N,N'-tri-etil-etilendiamina (15b) (18 μ l, 0.1 mmol) y se continuó la agitación durante 30 min. El disolvente se eliminó al vacío, se agregaron 10 μ l de AcOH y 40a se purificó por RP-HPLC.

40a: Rendimiento de 1 mg (11%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 951.1$ (MW+Na calculado = 951.8 g/mol)

Síntesis del compuesto 40b

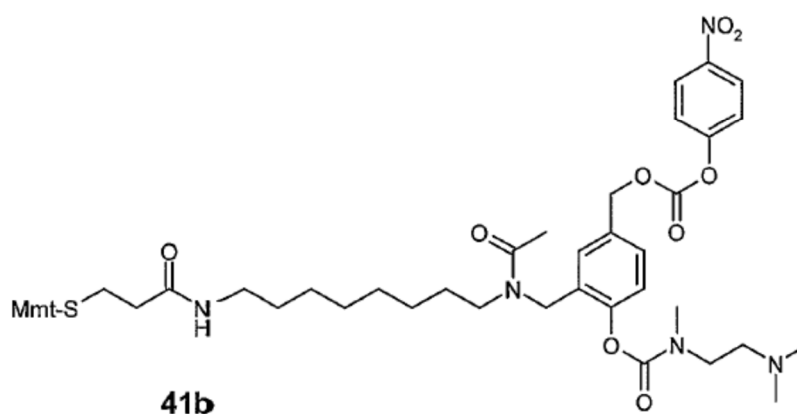
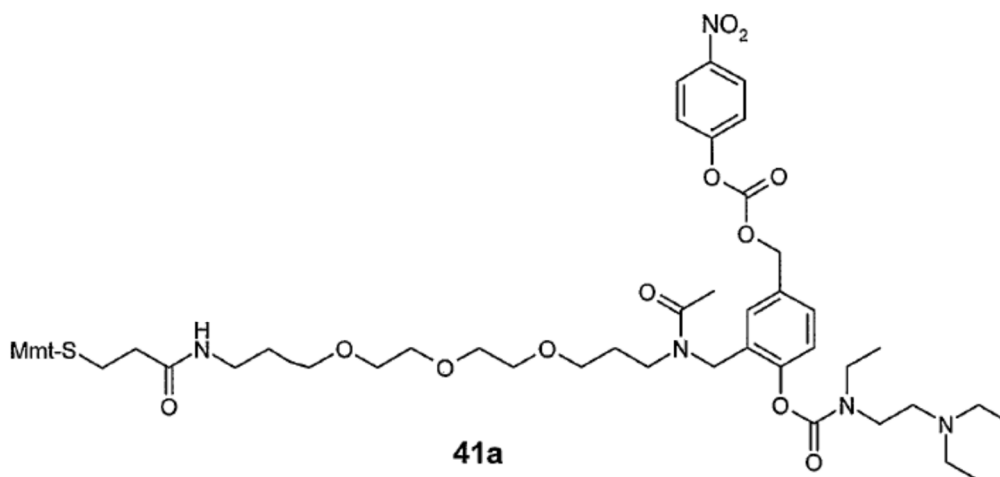


Se hicieron reaccionar 15 mg (33 μ mol) 39, 18 mg (33 μ mol) de PyBOP, 23 μ l (0.13 mmol) de DIEA y 13 mg (35 μ mol) 2 en 0.5 ml de DMF durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de 50 μ l, el producto de ácido acético 40 se purificó por RP-HPLC.

5 40b: rendimiento 10 mg (37%) como sal de TFA

MS $[M+H]^+ = 811.5$ (MW+Na calculado = 810.5 g/mol)

Síntesis del compuesto 41a y 41b



El carbonato 41a o 41b se sintetizó a partir de 40a o 40b como se describe para el compuesto 7a

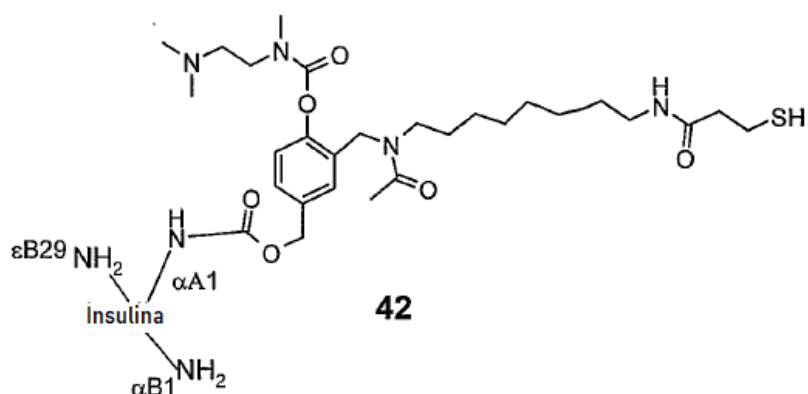
10 41a: Rendimiento 0.4 mg como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 1116.8$ (MW+Na calculado = 1116.9 g/mol)

41b: Rendimiento de 2 mg (16%) como sal de TFA

MS $[M+H]^+ = 976.8$ (MW calculado = 975.8 g/mol)

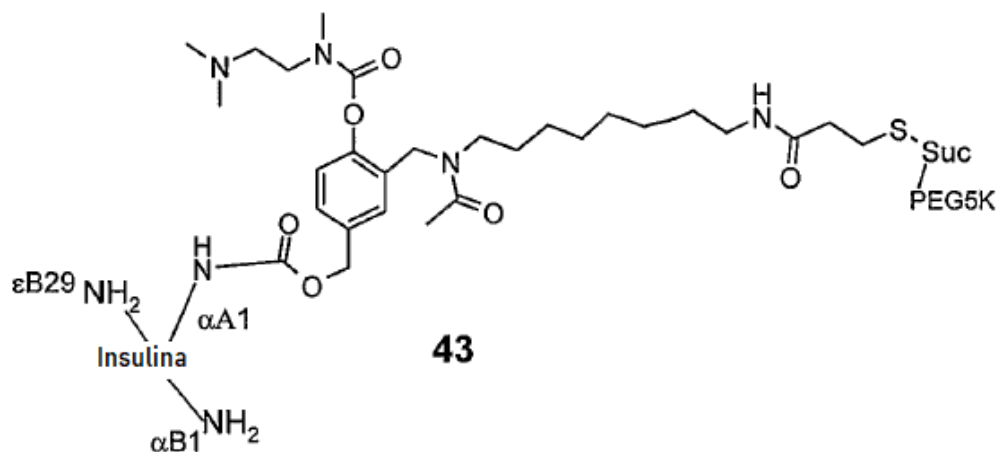
Síntesis del compuesto 42



El derivado de insulina 42 se sintetizó a partir de 41b como se describe para el compuesto 8a.

42 MS $[M+3H]^{3+} = 2124.5$ $[M+4H]^{4+} = 1594.6$ (MW calculado = 6371 g/mol)

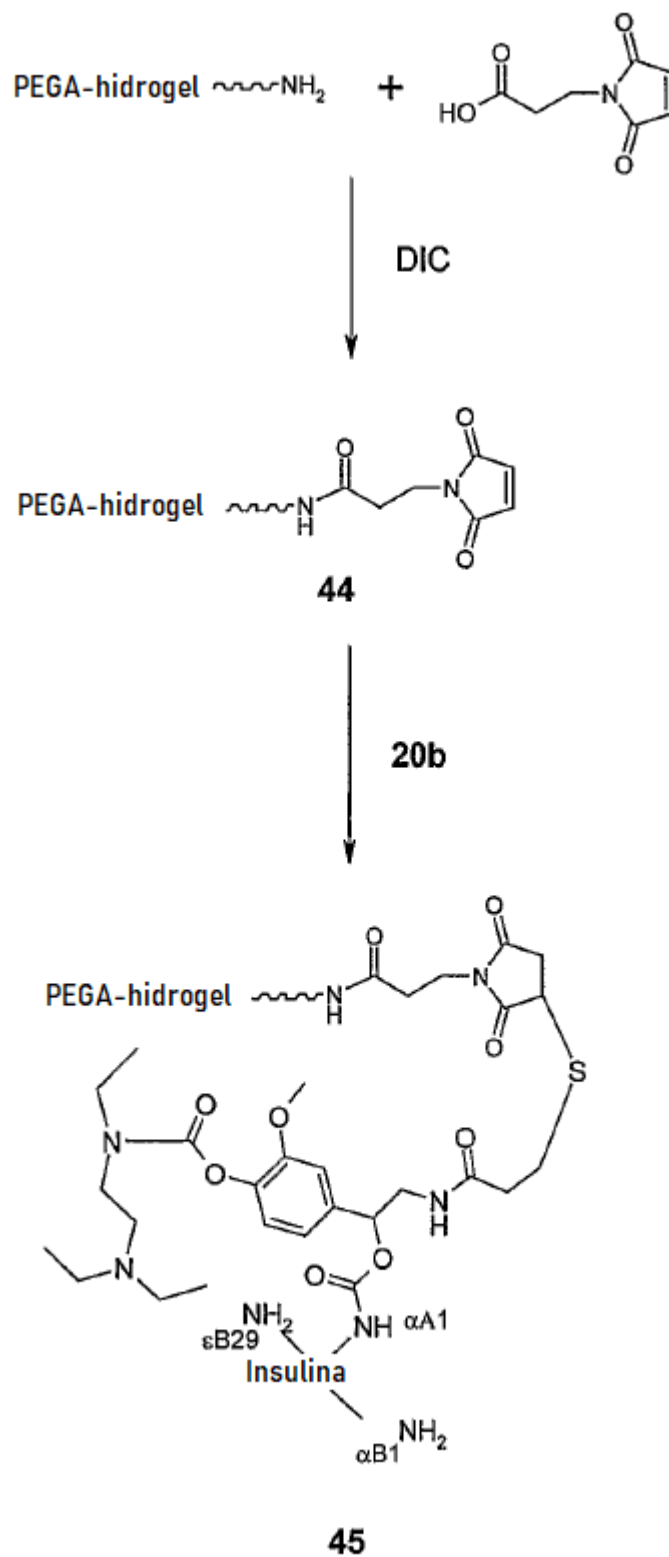
5 Síntesis del compuesto 43



El derivado de insulina 43 se sintetizó a partir de 42 como se describe para el compuesto 9a.

43: Tiempo de retención de SEC: 18.0 min

Síntesis de hidrogel de PEGA cargado con rh-insulina 45



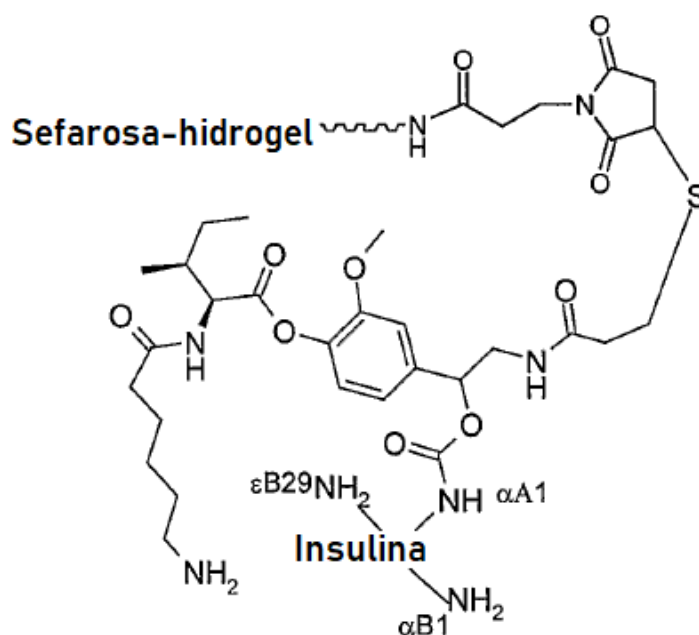
Derivación con maleimida de hidrogel a base de poliacrilamida (PEGA):

Las perlas de hidrogel NH_2 -PEGA con una carga de 0.4 mmol/g y un tamaño de perla de 150-300 μm se adquirieron de Novabiochem.

Se pesaron 2.5 g de hidrogel de NH_2 -PEGA metanol (0.4 mmol/g de carga de NH_2) en una jeringa equipada con una frita de polipropileno. La carga de maleimida se ajustó por acilación empleando una mezcla de ácido maleimidopropiónico activado y ácido acético como se describe a continuación. El hidrogel se lavó 5 veces con DMF y se hizo reaccionar con 13.5 mg (0.08 mmol) de ácido 3-maleimidopropiónico, 115.2 μl (1.92 mmol) de ácido acético y 313 μl (2 mmol) de DIC en 4 ml de DMF durante 30 min. El hidrogel 44 derivado de maleimida se lavó 10 veces con DMF y DCM y finalmente con acetonitrilo.

Se hicieron reaccionar 30 mg de resina derivada de maleimida 44 (cargando 16 $\mu\text{mol/g}$) con 3 mg de compuesto 20b (480 nmol, 1.06 eq) en 600 μl de 20/80 (v/v) acetonitrilo/regulador fosfato 50 mM (pH 7.4) durante 10 minutos para dar hidrogel cargado con rh-insulina 45. El hidrogel 45 se lavó 5 veces con acetonitrilo/agua 50/50 (v/v) y tres veces con acetonitrilo y se secó al vacío.

Síntesis de hidrogel a base de carbohidrato de rh-insulina 46



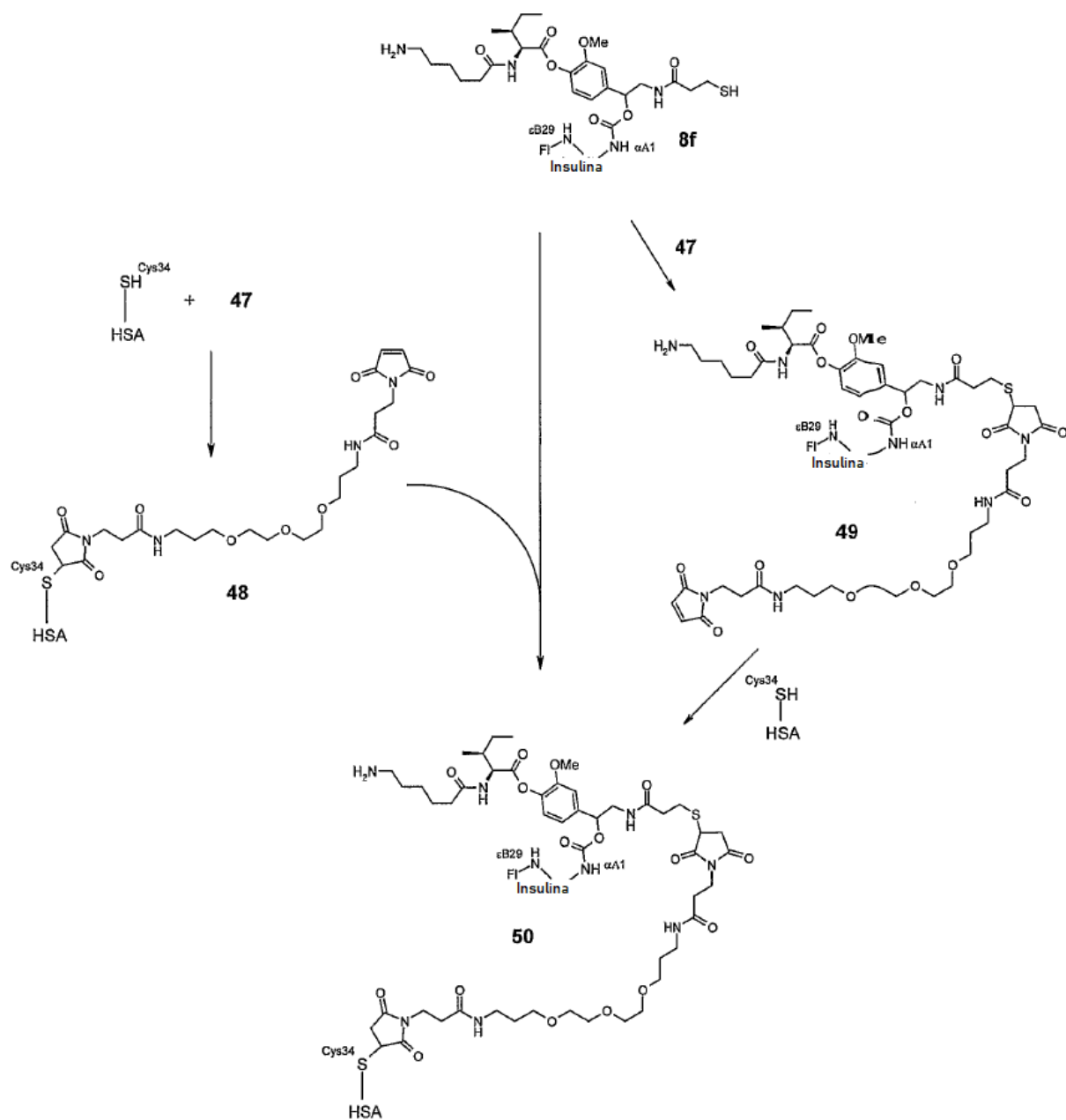
46

Las perlas de hidrogel "Sephacose 4 Fast Flow" activadas por NHS (agarosa reticulada químicamente, epiclorhidrina reticulante) se compraron a Amersham.

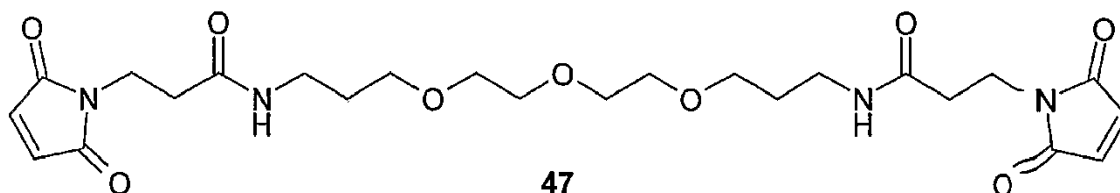
Se pesaron 1.5 g de hidrogel de sefarosa húmedo con etanol (150 mg de hidrogel seco) en una jeringa equipada con una frita de polipropileno y se hizo reaccionar con 4,7,10-trioxatridecano-1,13-diamina 1 M en DMF durante 30 min. Después de 5 etapas de lavado con DMF, se hizo reaccionar hidrogel con 8.5 mg (0.05 mmol) de ácido 3-maleimidopropiónico, 57 μl (0.95 mmol) de ácido acético, 151 mg (1 mmol) de HOBt y 158 μl (1 mmol) de DIC en 4 ml de DMF durante 30 min para dar hidrogel derivado de maleimida. El hidrogel se lavó 10 veces con DMF y finalmente con acetonitrilo.

Se disolvieron 1.5 mg de 8c en 25/75 (v/v) de acetonitrilo/regulador fosfato 50 mM, pH 7.4 y se hicieron reaccionar con 10.8 mg de hidrogel derivado de maleimida durante 10 minutos. El hidrogel cargado con rh-insulina 46 se lavó cinco veces con acetonitrilo/agua 50/50 (v/v) y tres veces con acetonitrilo y se secó al vacío.

Esquema de síntesis de fluoresceína-insulina-rHSA (50)



Síntesis de bismaleimida 47



5 Se hizo reaccionar ácido 3-maleimido-propiónico (92 mg, 0.54 mmol) en 200 µl de DMF con DIC (78 µl, 0.50 mmol) a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadió 4,7,10-trioxa-tridecan-1,13-diamina (43.5 µl, 0.20 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Después de la adición de 800 µl, se purificó 1/4 (v/v) de ácido acético/agua 47 mediante RP-HPLC.

47: Rendimiento 23 mg (22%)

MS [M+Na]⁺ = 545.5 (MW+Na calculado = 545.6 g/mol)

Síntesis de rHSA-maleimida (48)

- 5 Se mezclaron 66.5 µl de solución de rHSA 3 mM en NaCl 145 mM, octanoato de sodio 32 mM, Tween-80 al 0.0015% con 66.5 µl de regulador de fosfato 0.5 M, pH 7.0. Se añadieron 0.41 mg de bismaleimida 47 (0.8 µmol) y la mezcla se hizo reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. El Compuesto 48 se purificó por SEC (columna: Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) utilizando un regulador HEPES 10 mM a pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% como fase móvil. (Rendimiento: 2.6 ml 77.5 µM 48).

Tiempo de retención de SEC: 17.1 min (280 nm)

ESI-MS = 66988 (MW calculado = 66984 g/mol)

Síntesis de fluoresceína-insulina-enlazador-maleimida (49)

- 10 Se mezclaron 40 µl de bismaleimida 47 2.4 mM en 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua (96 nmol) con 40 µl de regulador de borato de sodio 0.5 M, pH 5.8. Se agregaron 24 nmol de en 16.8 µl de 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua y la mezcla se incubó durante 10 minutos a RT. Se agregaron 5 µl de AcOH y 49 se purificaron por RP-HPLC.

ESI-MS = 7211 (MW calculado = 7211 g/mol)

Síntesis de fluoresceína-insulina-enlazador-rHSA 50a) de 49 y Rhsa

- 15 b) de 48 y 8f

a)

Se mezclaron 30 µl de 49 80 µM en 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua (2.4 nmol) con 70 µl de regulador de fosfato de sodio 0.25 M, pH 6.4. Se añadieron 8 µl de 3 mM de rHSA en NaCl 145 mM, octanoato de sodio 32 mM, Tween-80 al 0.0015% (24 nmol) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min.

- 20 El compuesto 50 se purificó por SEC (columna: Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) utilizando un regulador HEPES 10 mM a pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% como fase móvil.

Tiempo de retención de SEC: 17.3 min (500 nm)

ESI-MS = 73676 (MW calculado = 73673 g/mol)

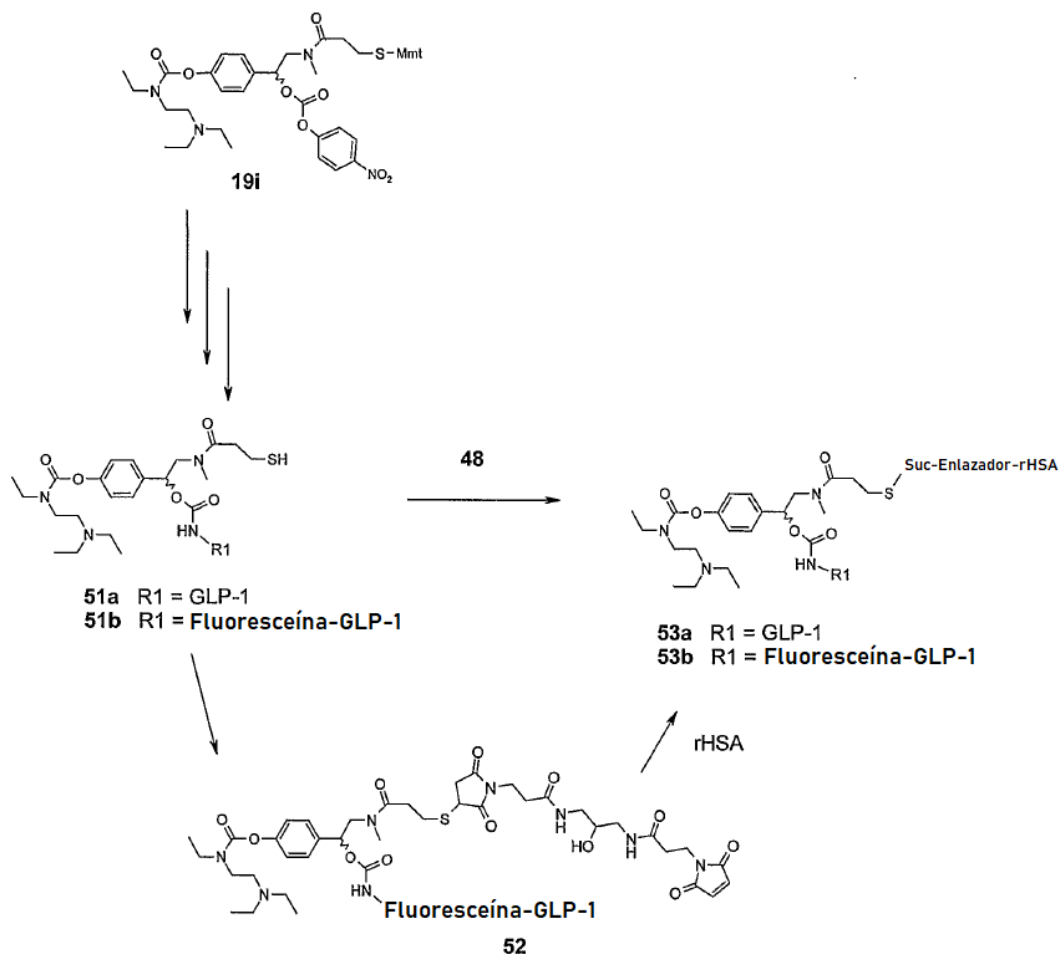
b)

25

El eluato SEC de rHSA-maleimida 48 (241 µl, 77.5 µM, 18.7 nmol) se mezcló con 20 µl de regulador de borato de sodio 0.5 M pH 5.8. Se agregaron 14 µl de 1.41 mM 8f (19.6 nmol) en 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadieron 1.2 µl de ácido 3-maleimidopropiónico 48.5 mM (58 nmol) en 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua y el compuesto 50 se purificó por SEC (columna: Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) usando regulador HEPES 10 mM a pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% como fase móvil.

- 30 Tiempo de retención de SEC: 17.1 min (500 nm)

ESI-MS = 73698 (MW calculado = 73673 g/mol) Esquema de síntesis de rHSA-enlazador-GLP-1 53a y 53b



Síntesis de 51a

GLP(7-36) (secuencia: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR-amida) se sintetizó sobre resina de amina Rink empleando fmoc-Strategy (Specialty Peptide Laboratories, Heidelberg, Alemania). El grupo protector fmoc N-terminal se eliminó y la resina se lavó con DCM y se secó. Se suspendieron 118 mg de resina (0.11 mmol/g, 13.2 μ mol) en una solución de 50 mg 19i (53 μ mol) en 750 μ l de DMSO seco y 22.4 μ l de DIEA. Se añadieron 2.1 μ l de piridina y la mezcla se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de lavar la resina 6 veces cada una con DMF y DCM, la escisión del péptido de la resina y la eliminación de los grupos protectores se logró con 96/2/2 (v/v/v) TFA/trietilsilano/agua. Los volátiles se eliminaron bajo flujo de nitrógeno y 51a se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

51a: Rendimiento 4.6 mg (9%)

MS: $[M+3H]^{3+} = 1251.0$ (MW calculado = 3750.3 g/mol)

Síntesis de 51bLys28 ivDde cadena protegida GLP (7-36) (secuencia: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLK (ivDde)GR-amida) se sintetizó en una resina de Rink-amida empleando fmoc-Strategy (Specialty Peptide Laboratories, Heidelberg, Alemania). El grupo protector fmoc N-terminal se eliminó y la resina se lavó con DCM y se secó. Se suspendieron 50 mg de resina (0.11 mmol/g, 5.5 μ mol) en una solución de 25 mg 19i (26 μ mol) en 400 μ l de DMSO seco y 11.2 μ l de DIEA. Se añadieron 1.1 μ l de piridina y la mezcla se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de lavar la resina seis veces con DMF, el grupo protector ivDde se escindió incubando la resina 3 veces con hidracina al 5% en DMF durante 20 minutos. El ácido Fmoc-8-amino, 3,6-dioxaoctanoico se acopló de acuerdo con el ciclo de acoplamiento estándar. Se eliminó el grupo protector Fmoc y se acopló carboxi-fluoresceína incubando la resina con 8 mg de 5- (y -6)-carboxifluoresceína éster succinimídico y 2 μ l de DIEA durante 60 min. La resina se lavó seis veces cada una con DMF y DCM. La escisión del péptido de la resina y la eliminación de los grupos protectores se logró con 96/2/2 (v/v/v) TFA/trietilsilano/agua. Los volátiles se eliminaron bajo flujo de nitrógeno. Se utilizó 51b para la síntesis de 52 sin purificación adicional.

MS: $[M+3H]^{4+} = 1064.3$, $[M+2H]^{3+} = 1418.3$ (MW calculado = 4254 g/mol)

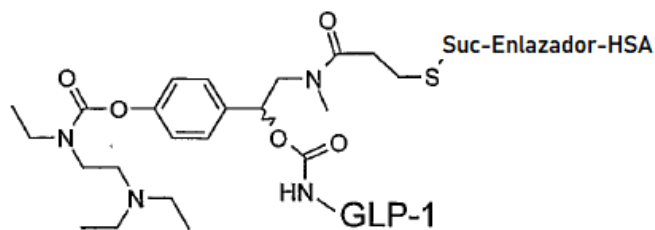
Síntesis de 52

La materia prima 51b se disolvió en 500 µl de acetonitrilo 1/1 (v/v) / fosfato de sodio 0.25 M, pH 7 y se añadieron 8 mg de N,N'-bis(3-maleimidopropionil)-2-hidroxi-1,3-propanodiamina. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y 52 se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

52: Rendimiento: 5.1 mg

5 MS $[M+3H]^{4+} = 1162.8$, $[M+2H]^{3+} = 1549.4$ (MW calculado = 4645 g/mol)

Síntesis del compuesto 53a



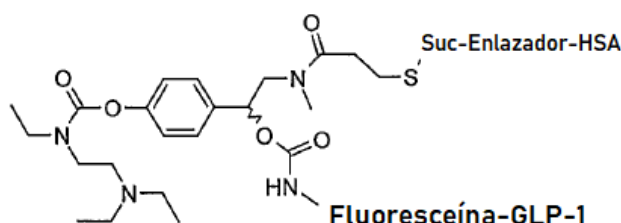
53a

10 Se mezclaron 30 µl de 1.57 mM 48 (47 nmol) en regulador HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% con 10 µl de regulador fosfato de sodio 0.5 M, pH 7.4. Se añadió una mezcla de 2 µl de DMSO y 12 µl de 6.06 mM 51a (73 nmol) en agua/acetonitrilo 9/1 (v/v) y la solución se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La 53a se purificó por SEC (columna: Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) utilizando regulador fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y Tween al 0.005% como fase móvil.

Tiempo de retención de SEC: 17.7 min (280 nm)

ESI-MS = 70745 (MW calculado = 70734 g/mol)

15 Síntesis de 53b

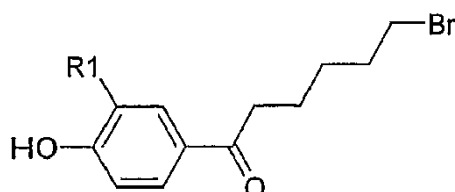


53b

20 100 µl de 3 mM 52 (300 nmol) en 9/1 50 mM de fosfato de sodio, pH 7.0/acetonitrilo, se mezclaron con 100 µl de HSA 3 nM (300 nmol) y la solución se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. 53b se purificó por SEC (columna: Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) utilizando un regulador HEPES 10 mM a pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Tween al 0.005% como fase móvil.

Tiempo de retención de SEC: 17.7 min (500 nm)

Síntesis de los compuestos 54a y 54b



54a R1 = Me

54b R1 = H

5 Se suspendió AlCl_3 (1.05 eq) en DCM y se añadió cloruro de ácido 6-bromohexanoico (1 eq). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadió o-cresol (1 eq) y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 25 minutos. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica separada se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró al vacío. El producto 54a se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando heptano/acetato de etilo (4/1) como fase móvil.

54b se sintetizó como se describe anteriormente utilizando cloruro de ácido 6-bromohexanoico y fenol.

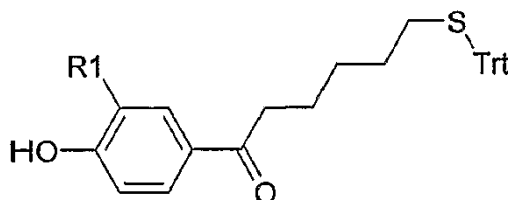
54a: Rendimiento 3.7 g (33%)

10 MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 285.1$ y 287.2 (MW+H calculado = 386.2 g/mol)

54b: Rendimiento 620 mg (15%)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 271.2$ (MW calculado = 271.0 g/mol)

Síntesis de los compuestos 55a y 55b



15 55a R1 = Me

55b R1 = H

Se añadió DBU (105 μl , 701 μmol) a una solución de bromuro 54a (105 mg, 369 μmol) y tritilol (204 mg, 738 μmol) en 50 ml de DMSO seco. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min y se acidificó con H_2SO_4 1N. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y se evaporó. 55a se purificó por RP-HPLC.

20 55b se sintetizó de acuerdo con el mismo protocolo utilizando 54b (180 mg, 0.66 mmol).

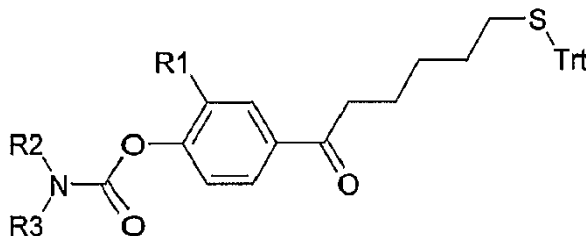
55a: Rendimiento 173 mg (97%)

MS $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 503.6$ (MW+Na calculado = 503.7 g/mol)

55b: Rendimiento 160 mg (85%)

MS $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 489.5$ (MW+Na calculado = 489.3 g/mol)

25 Síntesis de los compuestos 56a y 56b.



56a R1 = Me, R2 = R3 = 3-(dimetilamino)propilo,

56b R1 = H, R2 = Me, R3 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo

30 56a se preparó a partir de 55a (9 mg, 19 μmol), cloroformiato de p-nitrofenilo y bis(3-dimetilamino-propil)amina (21 μl , 94 μmol) como se describe para el compuesto 16a.

56b se sintetizó a partir de 55b (160 mg, 0.34 mmol), cloroformiato de p-nitrofenilo y N-etil-N',N'-dimetil-1,3-propanodiamina (15c) como se describe para el compuesto 16a.

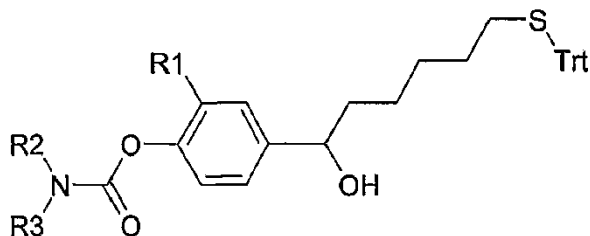
56a: Rendimiento 12 mg (70%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 716.8$ (MW+Na calculado = 717.0 g/mol)

56b: Rendimiento de 80 mg (32%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 645.6$ (MW+Na calculado = 645.4 g/mol)

Síntesis de los compuestos 57a y 57b



57a R1 = Me, R2 = R3 = 3-dimetilamino-propilo,

57b R1 = H, R2 = Me, R3 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo

57a y 57b se sintetizaron a partir de 56a (12 mg, 13 μ mol, sal doble de TFA) y 56b (80 mg, 110 μ mol, sal de TFA), respectivamente, como se describe para el compuesto 16g.

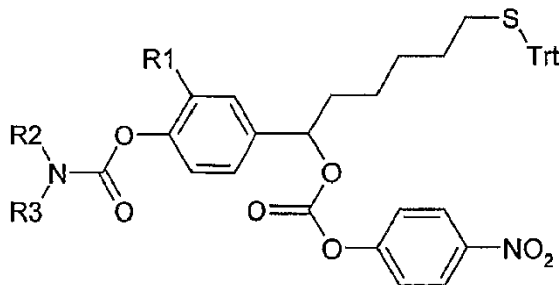
57a: Rendimiento 9 mg (75%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 719.0$ (MW+Na calculado = 718.7 g/mol)

57b: Rendimiento 60 mg (75%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 647.4$ (MW+Na calculado = 647.4 g/mol)

Síntesis de los compuestos 58a y 58b



58a R1 = Me, R2 = R3 = 3-(dimetilamino)propilo,

58b R1 = H, R2 = Me, R3 = 3-(N-etil-N-metilamino)propilo

57a (1 eq, 8 mg, 9 μ mol), cloroformiato de 4-nitrofenilo (3.5 eq, 6 mg, 30 μ mol), DIEA (6 eq, 9 μ l, 52 μ mol) y DMAP (1 eq, 1 mg, 9 μ mol) se agitaron en 1 ml de DCM seco a temperatura ambiente durante 45 min bajo atmósfera de nitrógeno. Los volátiles se evaporaron y se añadió ácido acético. La mezcla se disolvió en 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua y el carbonato 58a se purificó por RP-HPLC.

El carbonato 58b se preparó igualmente a partir de 57b (135 mg, 0.18 mmol).

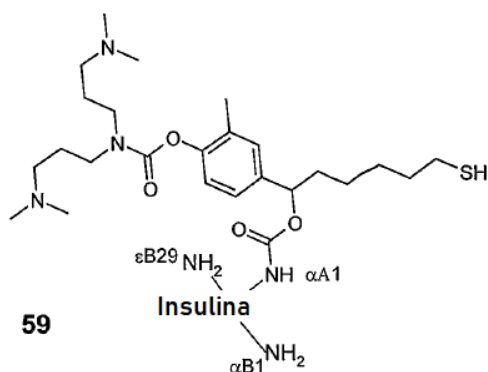
58a: Rendimiento de 7 mg (70%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 883.8$ (MW+Na calculado = 884.1 g/mol)

58b: Rendimiento 110 mg (77%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 812.4$ (MW+Na calculado = 812.5 g/mol)

Síntesis del compuesto 59

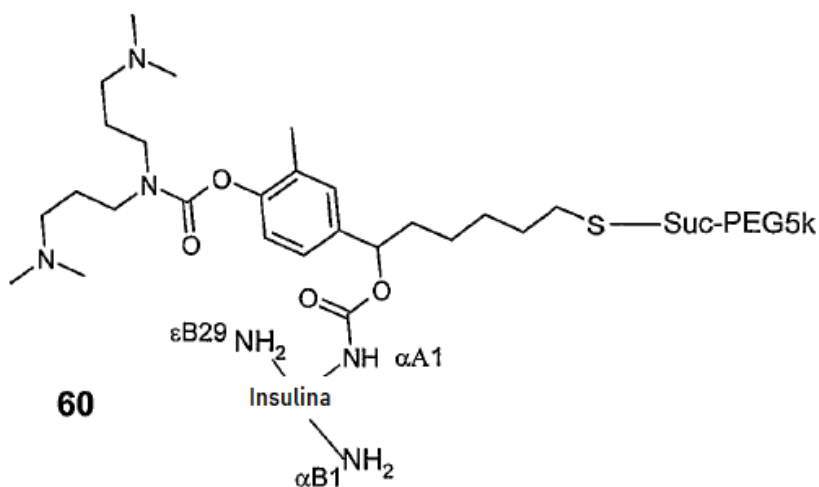


5 Rh-Insulina (44.5 mg, 7.7 μmol), carbonato de 58a (1 eq, 7 mg, 6.4 mmol), DIEA (15 μl , 88 μmol) y DMAP (1.5 mg, 12 μmol) en 0.3 ml de DMSO se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético y se diluyó con 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua. La purificación por RP-HPLC dio el intermedio protegido con Trt apropiado.

Después de la liofilización, el intermedio protegido con Trt se mezcló con 95/5 (v/v) de TFA/trietilsilano y se agitó durante 5 min. Los volátiles se eliminaron bajo flujo de nitrógeno y 59 se purificaron por RP-HPLC y se liofilizaron. La posición de la modificación de la insulina se verificó mediante reducción de la TDT y análisis de la EM.

59: MS $[M+3H]^{3+} = 2095.5$ $[M+4H]^{4+} = 1572.2$ (MW calculado = 6288 g/mol)

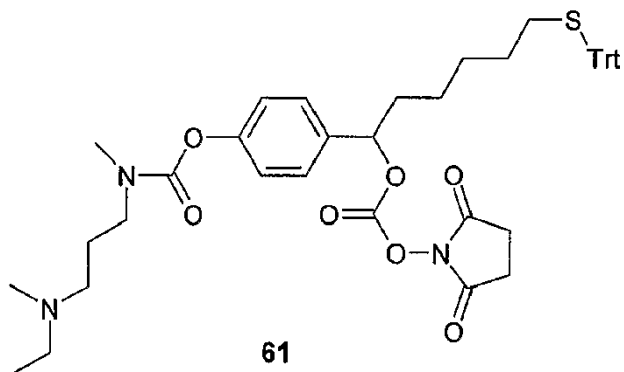
10 Síntesis del compuesto 60



Se preparó 60 a partir de 59 (0.17 μmol) como se describe para el compuesto 9a.

60: Tiempo de retención de la SEC: 19.5 min.

Síntesis del compuesto 61

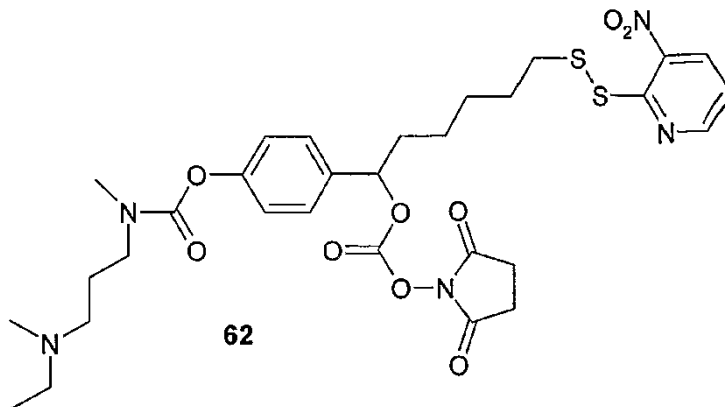


5

61: Rendimiento 40 mg (51%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 788.4$ (MW+Na calculado = 788.5 g/mol)

Síntesis del compuesto 62

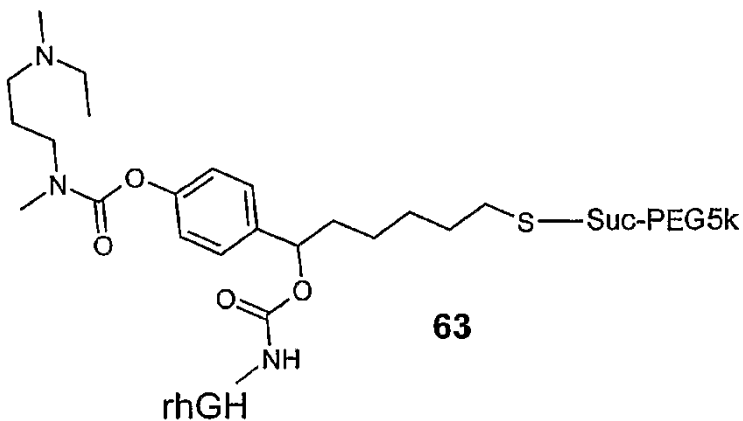


10 61 (12 mg, 13 μ mol) y NPys-Cl (4 mg, 21 μ mol) se agitaron en 1 ml de DCM a -10°C durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. Los volátiles se eliminaron bajo flujo de nitrógeno y 62 se purificaron por RP-HPLC.

62: Rendimiento de 7 mg (65%) como sal de TFA

MS $[M+Na]^+ = 700.9$ (MW+Na calculado = 701.4 g/mol)

Síntesis del compuesto 63



15

rhGH

0.9 mg de rhGH desalinizada (ProspecTany, Israel, MW 22250 g/mol, 40 nmol) en 200 µl de regulador borato 50 mM (pH 8.0), 8 µl de carbonato 62 en acetonitrilo (38 mM, 300 nmol) y 40 µl de DMSO se hicieron reaccionar a temperatura

ambiente durante 3 h. La mezcla de disolventes y los compuestos pesados de bajo peso molecular se reemplazaron por agua y posteriormente con regulador de acetato (25 mM, pH 4.2, 0.005% de Tween 20) mediante ultrafiltración utilizando un filtro Centricon 5 (corte de 5 kDa). 8 µl (80 nmol) de DTT 10 mM en regulador de acetato 25 mM, pH 4.2, se añadió Tween al 0.005% y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Los compuestos de bajo peso molecular se eliminaron mediante ultrafiltración utilizando un filtro Centricon 5 y un regulador de acetato 25 mM a pH 4.2, Tween al 0.005% como eluato. Después de la concentración a un volumen de 100 µl (Centricon 5), se agregaron 20 µl (100 nmol) de maleimida 5 mM-PEG5k en agua y 80 µl de regulador de fosfato 0.5 M, pH 7.0. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. El monoconjugado 63 se separó mediante SEC (columna: Superdex 200, rata de flujo: 0.75 ml/min) utilizando un regulador de fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.005% como fase móvil. El eluato recogido (aproximadamente 1.0 ml) se diluyó con 0.5 ml de regulador que contenía NaN₃ al 0.05% y se usó directamente para la determinación de la velocidad de liberación.

63: Tiempo de retención SEC: 17.5 min

Liberación de insulina o fluoresceína-insulina de los conjugados en un regulador pH 7.4 La liberación de (fluoresceína)-insulina de los conjugados (fluoresceína)-insulina 9a a 9h, 21a a 21f, 30a, 30b, 43, 50 y 60, la liberación de fluoresceína-GLP-1 de 53b y la liberación de rhGH de 63 fue realizada por hidrólisis del enlazador en regulador acuoso pH 7.4. Los eluatos de SEC recogidos de (fluoresceína)-insulina conjugados (véase arriba), fluoresceína-GLP-1 conjugado y rhGH-conjugado, respectivamente, se incubaron a 37°C y las muestras se tomaron a intervalos de tiempo y se analizaron por RP-HPLC (conjugados de insulina) o SEC (conjugado de rhGH, conjugados de insulina con fluoresceína y conjugado de fluoresceína-GLP-1) y detección de UV a 215 o 280 nm o detección de VIS a 500 nm. Los picos que se correlacionan con el tiempo de retención de la insulina nativa, la fluoresceína-insulina, la fluoresceína-GLP-1 y la rhGH, respectivamente, se integraron y se representaron en función del tiempo de incubación, y se aplicó un software de ajuste de curvas para estimar el medio tiempo de liberación correspondiente.

Liberación de insulina a partir de conjugados de hidrogel 45 y 46

Se pesaron 4 mg de 45 o 2 mg 46 en un tubo de ensayo y se incubaron con 1 ml de regulador HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween al 0.005% a 37°C. Se tomaron muestras de 45 µl a diferentes intervalos de tiempo y se analizaron cuantitativamente en busca de rh-insulina mediante un ensayo RP-HPLC. Los picos de rh-insulina se integraron y la concentración de rh-insulina se obtuvo a partir de una curva estándar. Se ajustó una cinética de liberación de primer orden a los puntos de datos para dar la vida media del enlazador.

Análisis de MS de la insulina liberada del compuesto 9a, 9b y 30a Las muestras de regulador de insulina liberada (véase arriba) fueron analizadas por espectrometría de masas. La Figura 11 muestra los espectros de masas de la insulina liberada del compuesto 9a, 9b y 30a. El espectro de masas de la insulina liberada a partir del compuesto 9a muestra claramente un producto secundario principal (indicado por flechas), correspondiente a la insulina irreversiblemente modificada con pentanoílo. En este caso, la eliminación del grupo de enmascaramiento de pentanoílo no fue por hidrólisis sino por transferencia de acilo a la insulina. El espectro de masas de la insulina liberada a partir del compuesto 9b y 30a no muestra ninguna modificación.

Liberación de fluoresceína-insulina del conjugado 9d y 9e en plasma humano al 80%

La liberación de fluoresceína-insulina de 9d o 9e se efectuó mediante hidrólisis en plasma humano al 80% en HEPES 20 mM, pH 7.4 a 37°C. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo y se analizaron mediante detección de SEC y VIS a 500 nm. Los picos que se correlacionaban con el tiempo de retención de la fluoresceína-insulina se integraron y se representaron en función del tiempo de incubación, y se aplicó un software de ajuste de curvas para estimar el medio tiempo de liberación correspondiente.

Tabla: Hidrólisis de profármacos poliméricos.

Compuesto	t _{1/2} regulador pH 7.4	t _{1/2} plasma humano
9a	40 h	nd
9b	55 h	nd
9c	4.5 d	nd
9d	7 h	4 h

Compuesto	t _{1/2} regulador pH 7.4	t _{1/2} plasma humano
9e	55 h	30 h
9f	90 h	nd
9g	37 h	nd
9h	88 h	nd
21a	64 d	nd
21b	8 d	nd
21c	52 d	nd
21d	29 d	nd
21e	100 d	nd
21f	83 h	nd
30a	17 d	nd
30b	>70 d	nd
43	4 h	nd
45	7 d	nd
46	4 d	nd
50	57 h	nd
53b	19 h	nd
60	10 d	nd
63	51 d	nd
nd = no determinado		

Lo anterior se considera ilustrativo de los principios de la invención y dado que los expertos en la materia tendrán numerosas modificaciones, no se pretende limitar la invención a la construcción y operación exactas descritas. Todas las modificaciones y equivalentes adecuados caen dentro del alcance de las reivindicaciones.

5 Abreviaturas:

Boc	t-butiloxicarbonilo
DBU	1,3-diazabicyclo[5.4.0]undeceno
DCM	dicolorometano

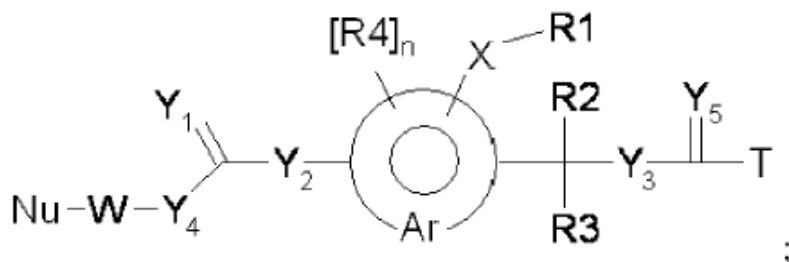
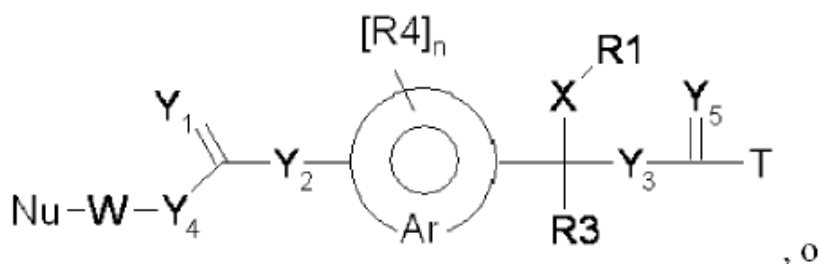
	(iv)Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohexilideno)3-metil-butilo
	DIC	diisopropilcarbodiimida
	DIEA	diisopropiletilamina
	DMAP	dimetilamino-piridina
5	DMF	N,N-dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	Dpr	ácido diaminopropiónico
	DSC	carbonato de disuccinidilo
	EDTA	ácido etilenediaminetetraacético
10	Et	etilo
	Eq.	equivalente estequiométrico
	Fmoc	fluorenilmetoxycarbonilo
	Fmoc-Ado-OH	Ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico
	HFIP	hexafluoroisopropanol
15	HEPES	N-(2-hidroxi-etil)piperazin-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
	HOBt	N-hidroxibenzotriazol
	LCMS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
	Mal	maleimidopropionilo
	Me	metilo
20	Mmt	4-metoxitritilo
	MS	espectro de masas
	MW	masa molecular
	Npys	3-nitro-2-piridinesulfonilo
	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
25	rHSA	albúmina sérica humana recombinante
	rhGH	hormona de crecimiento humano recombinante
	RP-HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa
	RT	temperatura ambiente
	SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
30	Suc	succinimidopropionilo
	TES	triethylsilano
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	UV	ultravioleta
35	VIS	visual
	Z	benziloxycarbonilo

REIVINDICACIONES

1. Un profármaco polimérico en cascada que comprende:

- una amina que contiene una unidad estructural biológicamente activa;
- un grupo de enmascaramiento que tiene al menos un nucleófilo y que es distinto del portador;

5 en donde el profármaco tiene la siguiente estructura:



en donde

T es D;

10 D es un residuo de una amina que contiene una unidad estructural biológicamente activa, que está conectada a la unidad estructural de la molécula a través de un grupo amina;

X es una unidad estructural espaciadora, tal como R5-Y6;

Y1, Y2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O y S;

Y3, Y5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O y S;

Y4 es O, NR6 o -C(R7)(R8)-;

15 Y6 es O, S, NR6, succinimida, maleimida, un enlace carbono-carbono insaturado, cualquier heteroátomo que contenga un par de electrones libres, o está ausente;

R2 y R3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; heteroarilos sustituidos o no sustituidos; ciano; nitro; halógeno; carboxi; carboxialquilo; alquilcarbonilo y carboxamidoalquilo;

20 cada R4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilo; arilo sustituido; heteroarilo sustituido o no sustituido; alcoxi sustituido, no sustituido, lineal, ramificado o cíclico; heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; ariloxi; heteroariloxi; ciano y halógeno;

25 R5 se selecciona del grupo que consiste en alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; y heteroarilos sustituidos o no sustituidos;

R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; heteroarilos sustituidos o no sustituidos; carboxialquilo; alquilcarbonilo; carboxamidoalquilo; ciano y halógeno;

R6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; arilos; arilos sustituidos; y heteroarilos sustituidos o no sustituidos;

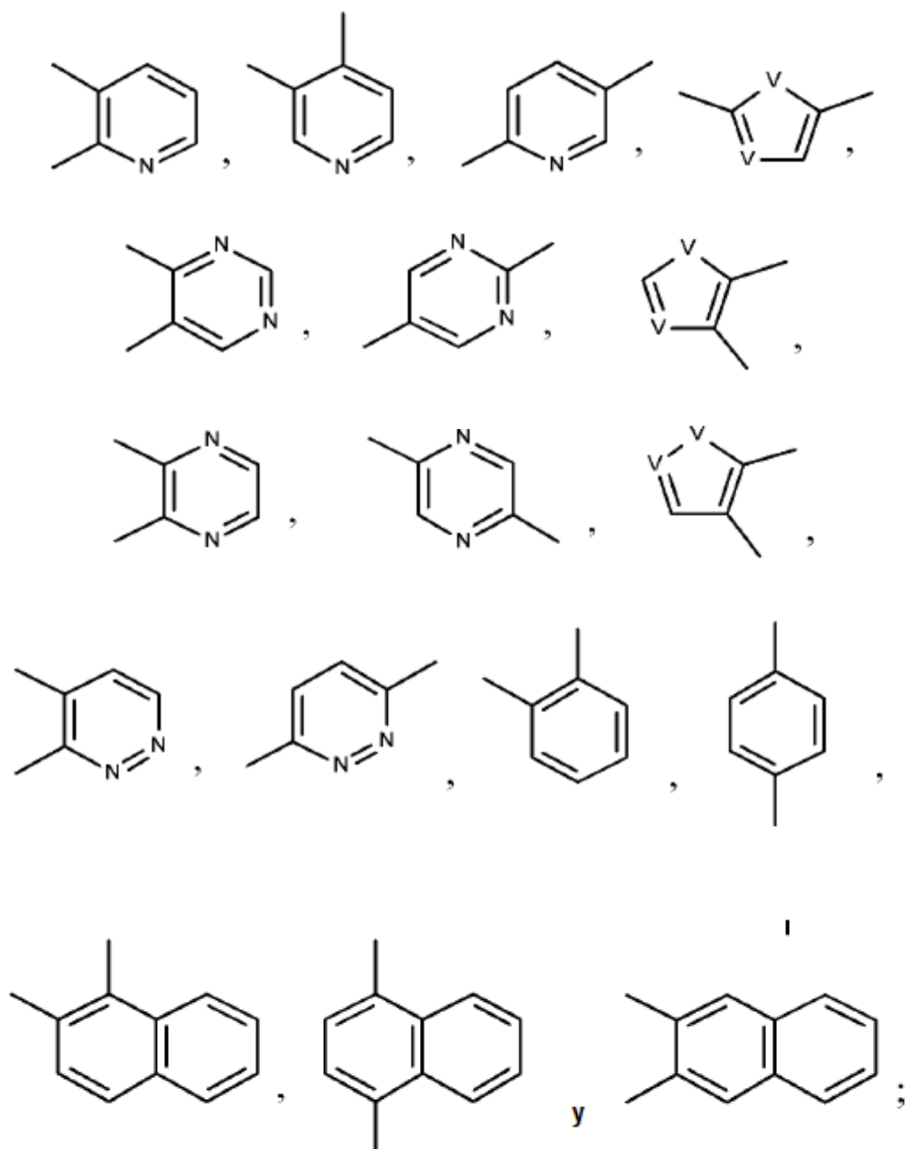
R1 es un polímero;

- 5 W se selecciona del grupo que consiste en alquilos lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos; arilos; arilos sustituidos; heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido; y heteroarilos sustituidos o no sustituidos;

Nu es un nucleófilo seleccionado del grupo que consiste en grupos amino primarios, secundarios o terciarios; tiol; ácido carboxílico; hidroxilamina e hidrazina;

n es cero o un entero positivo; y

- 10 Ar es un hidrocarburo aromático de múltiples sustituciones o un heterociclo aromático de múltiples sustituciones seleccionado del grupo que consiste en:

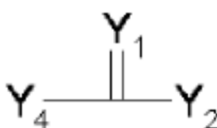


y en donde cada V se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S y N.

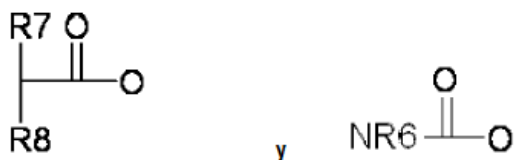
- 15 2. El profármaco de la reivindicación 1, en donde la unidad estructural biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en agentes biológicamente activos y biopolímeros de molécula pequeña.

3. El profármaco de la reivindicación 2, en donde los biopolímeros se seleccionan del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos.
4. El profármaco de la reivindicación 3, en donde los polipéptidos se seleccionan del grupo que consiste en ACTH, adenosina desaminasa, agalsidasa, albúmina, alfa-1 antitripsina (AAT), alfa-1 proteinasa inhibidor (API), alteplasa, anistreplasa, anicod serina proteasa, anticuerpos (monoclonales o policlonales y fragmentos o fusiones), antitrombina III, antitripsinas, aprotinina, asparaginasa, bifalina, proteínas óseas morfogénicas, calcitonina (salmón), colagenasa, DNasa, endorfinas, enfuvirtida, encefalinas, eritropoyetinas, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisisina, proteínas de fusión, hormonas folículo estimulantes, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), galactosidasa, glucagón, péptidos glucagón como GLP-1, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), proteína activadora de fosfolipasa (PLAP), gonadotropina coriónica (hCG), hemoglobinas, vacunas contra la hepatitis B, hirudina, hialuronidasas, globulinas inmunes iduronidasas, vacunas contra la influenza, interleucinas (1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12), antagonista del receptor IL-1 (rhIL-1ra), insulinas, interferones (alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a, gamma 1b), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factores de crecimiento transformantes, lactasa, leuprolida, levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna de Lyme, péptido natriurético, pancrelipasa, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH), prolactina, proteína C, octreotida, secretina, sermorelina, superóxido dismutasa (SOD), somatropinas (hormona del crecimiento), somatostatina, estreptoquinasa, sucrasa, fragmento de toxina tetánica, tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tirotropina, factor de necrosis tumoral (TNF), receptor de TNF-IgG Fc, activador tisular del plasminógeno (tPA), TSH, urato oxidasa, uroquinasa, vacunas y proteínas de plantas tales como lectina o ricina.
5. El profármaco de la reivindicación 3, en donde la proteína se prepara mediante tecnología de ADN recombinante.
6. El profármaco de la reivindicación 3, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en fragmentos de anticuerpo, proteínas de unión de cadena simple, anticuerpos catalíticos y proteínas de fusión.
7. El profármaco de la reivindicación 3, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, calcitonina, G-CSF, GM-CSF, eritropoyetinas, hemoglobinas, interleucinas, insulinas, interferones, SOD, somatropina, TNF, receptor de TNF IgG-Fc y péptidos similares al glucagón como GLP-1.
8. El profármaco de la reivindicación 2, en donde las moléculas pequeñas biológicamente activas se seleccionan del grupo que consiste en agentes activos del sistema nervioso central, antiinfecciosos, antineoplásicos, antibacterianos, antifúngicos, analgésicos, anticonceptivos, antiinflamatorios, esteroides, vasodilatadores, vasoconstrictores y agentes cardiovasculares con al menos un grupo amino primario o secundario.
9. El profármaco de la reivindicación 2 u 8, en donde los agentes biológicamente activos de molécula pequeña se seleccionan del grupo que consiste en daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitoxantrona, aminoglutetimida, amantadina, diafenilsulfona, etambutol, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxazol, sulfaleno, clinafloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina, neomicina B, espectinomycin, kanamicina A, meropenem, dopamina, dobutamina, lisinopril, serotonina, acivicina y carbutamida.
10. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde cada R4 se selecciona independientemente del grupo de sustituyentes pequeños que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, etoxi, metoxi y otros alquilo lineales, cicloalquilo o alquilo y heteroalquilo ramificados que comprenden uno a seis átomos de carbono.
11. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde R1 se selecciona del grupo que consiste en polímeros basados en polialquilo como poli(propilenglicol) o poli(etilenglicol); dextrano, quitosano, ácido hialurónico, alginato, xilano, manano, carragenano, agarosa, celulosa, almidón, hidroxietil almidón (HES) y otros polímeros a base de carbohidratos; poli(alcoholes vinílicos); poli(oxazolin); poli(anhídridos); poli(ortoésteres); poli(carbonatos); poli(uretanos); poli(ácidos acrílicos); poli(acrilamidas) tales como poli(hidroxipropilmetacrilamida) (HMPA); poli(acrilatos); poli(metacrilatos) como poli(metacrilato de hidroxietilo); poli(organofosfazenos); poli(siloxanos); poli(vinilpirrolidona); poli(cianoacrilatos); poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o poli(ácidos glicólicos); poli(iminocarbonatos); poli(aminoácidos) tales como poli(ácido glutámico), colágeno o gelatina; copolímeros; copolímeros injertados; polímeros reticulados; y copolímeros de bloque de los polímeros enumerados anteriormente.
12. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde R1 es un hidrogel.
13. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde R1 es un polímero ramificado o hiperramificado.
14. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde R1 es un dendrímero o polímero de estrella denso.

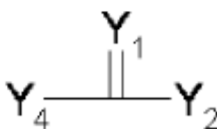
15. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde R1 es un biopolímero.
16. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 15, en donde R1 es una proteína.
17. El profármaco de la reivindicación 16, en donde la proteína es albúmina, un anticuerpo, fibrina, caseína o cualquier otra proteína plasmática.
- 5 18. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde R1 incluye además una o más sustancias biológicamente activas.
19. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el polímero de R1 tiene al menos un grupo funcional para la unión a X.
- 10 20. El profármaco de la reivindicación 19, en donde al menos un grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, amino, maleimida, tiol, ácido sulfónico y derivados, carbonato, carbamato, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico, ácido fosfónico, haloacetilo, haluros de alquilo, acríloilo, agentes de arilación como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros como disulfuro de piridilo, vinilsulfona, vinilcetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, epóxido, oxirano y aziridina.
- 15 21. El profármaco de la reivindicación 19 o 20, en donde al menos un grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en tiol, maleimida, amino, ácido carboxílico, carbonato, carbamato, aldehído y haloacetilo.
22. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el enlace o grupo formado entre X y R1 se selecciona del grupo que consiste en disulfuro, S-succinimida, amida, amino, éster carboxílico, sulfonamida, carbamato, carbonato, éter, oxima, hidrazona, urea, tiourea, fosfato y fosfonato.
- 20 23. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde el enlace o grupo formado entre X y R1 se selecciona del grupo que consiste en S-succinimida, amida, carbamato y urea.
24. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la unidad estructural



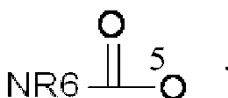
se selecciona del grupo que consiste en



- 25 25. El profármaco de la reivindicación 24, en donde la unidad estructural

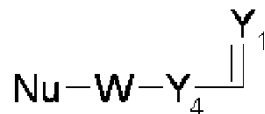


es

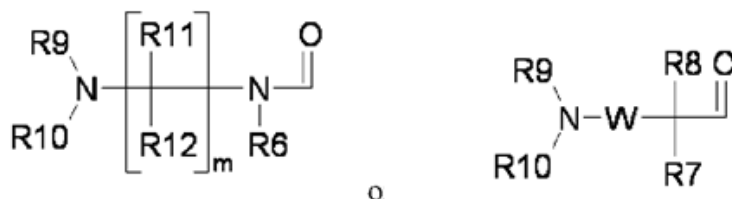


- 30 26. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde R6 es un Nu-W adicional.

27. El profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde



es



5 m = 2-10

en donde R9, R10, R11 y R12 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo y heteroarilo sustituido o no sustituido.

28. El profármaco de la reivindicación 27, en donde R9, R10, R11 y R12 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo sustituido o no sustituido.

10 29. El profármaco de la reivindicación 27 o 28, en donde R7 y/o R8 no son hidrógeno.

30. Un método para hidrolizar el profármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 que comprende una etapa de poner el profármaco en solución con un pH de aproximadamente 7.4.

89. Fig. 1

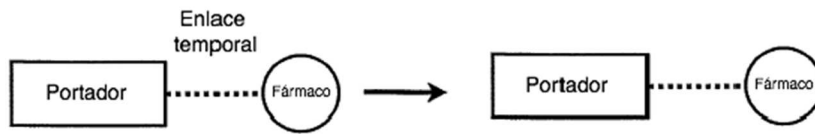


Fig. 2

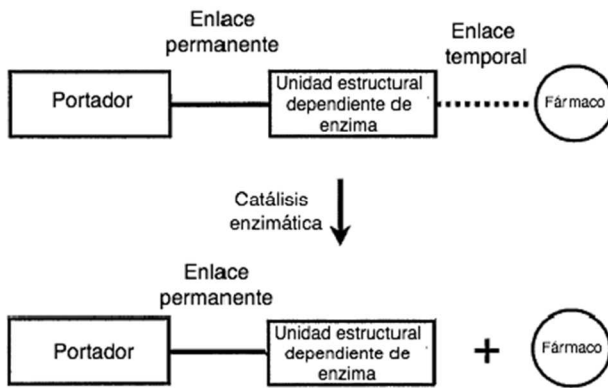


Fig. 3

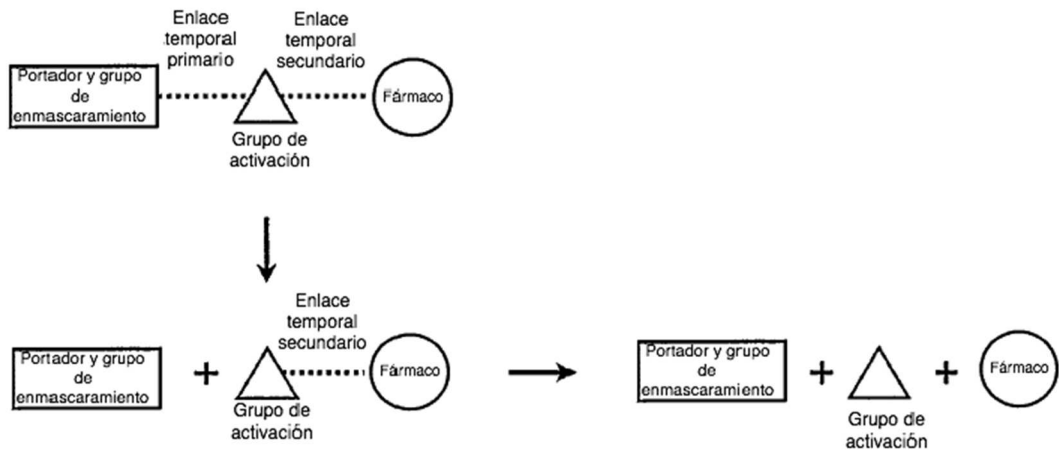


Fig. 4

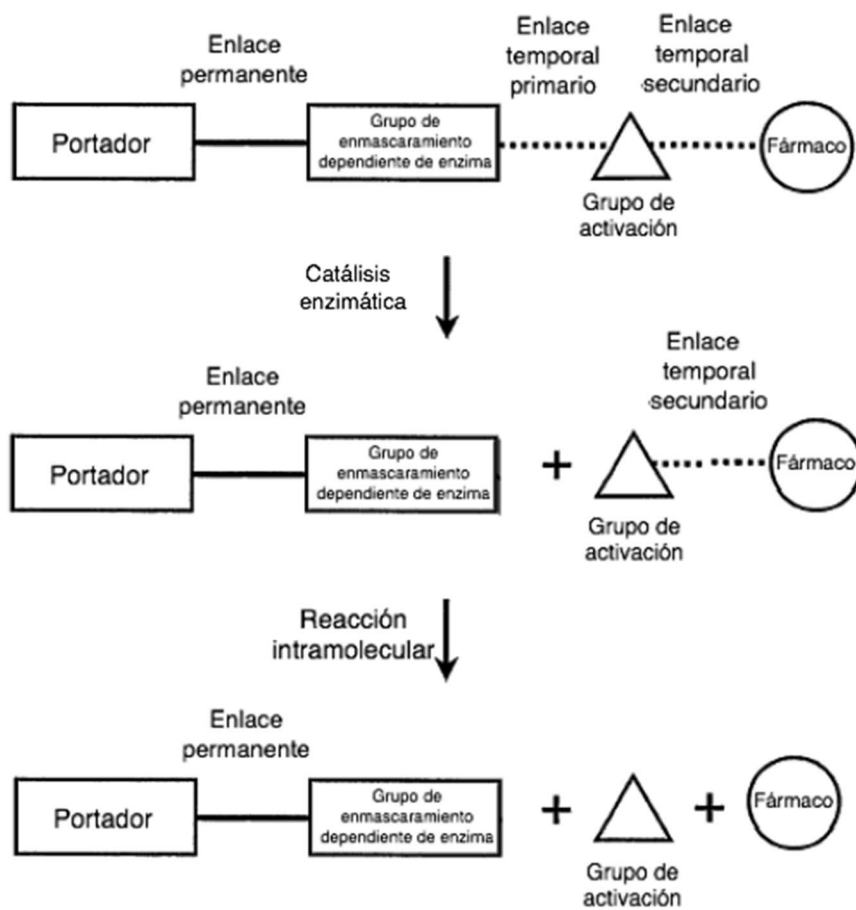


Fig. 5

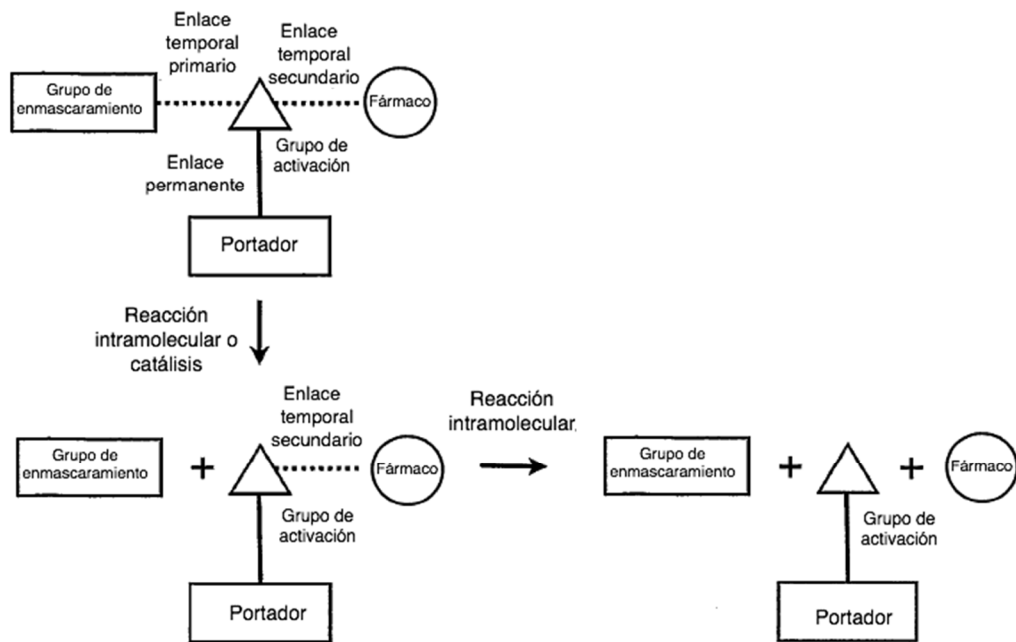


Fig. 6

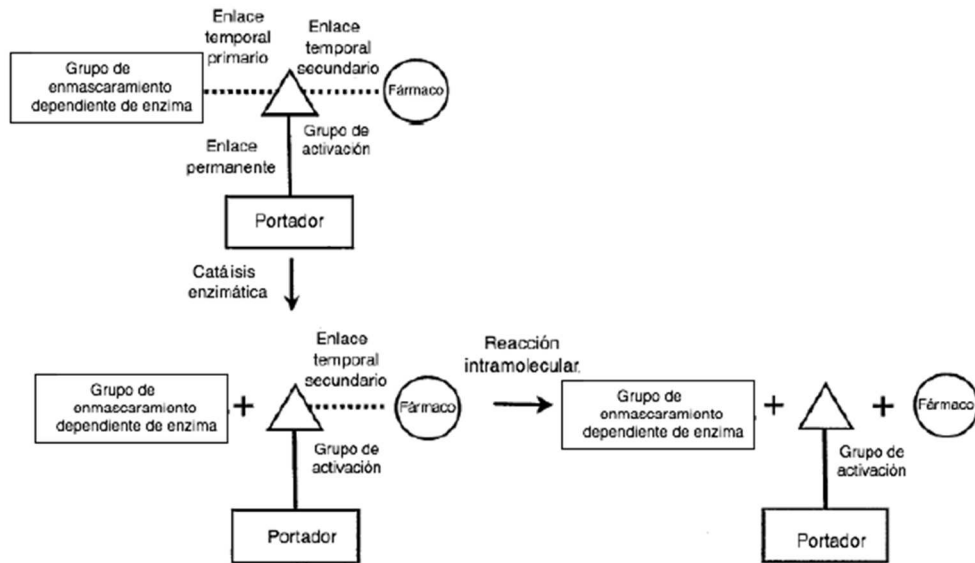


Fig. 7

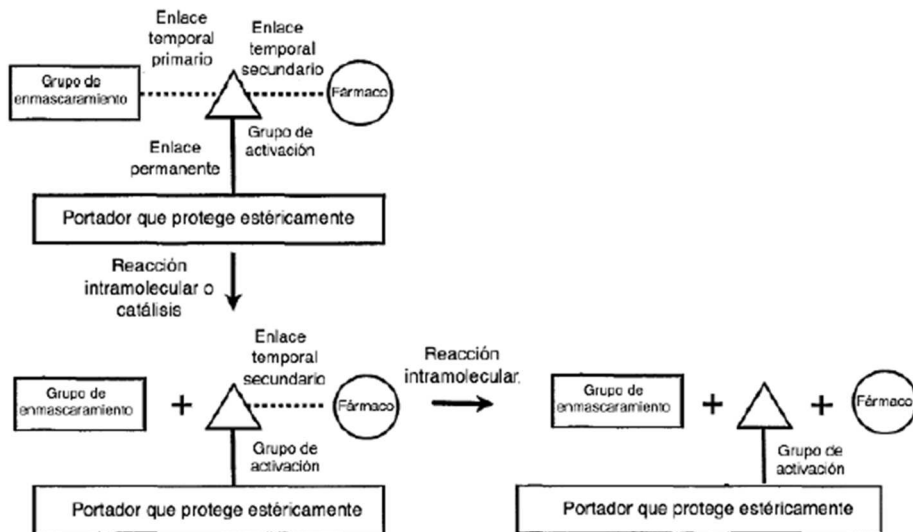


Fig. 8

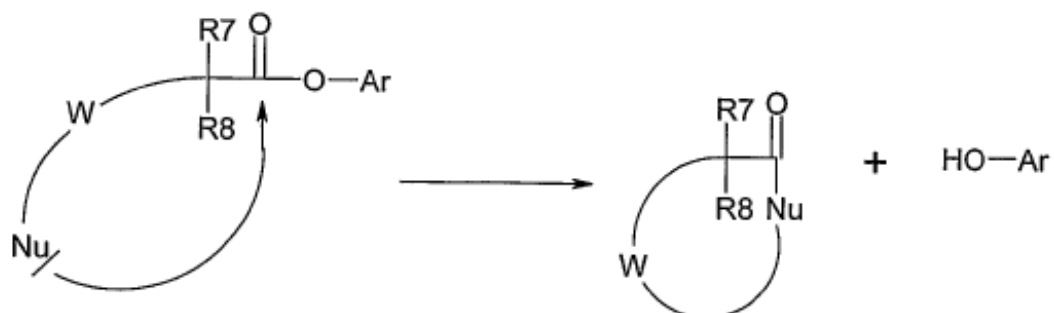
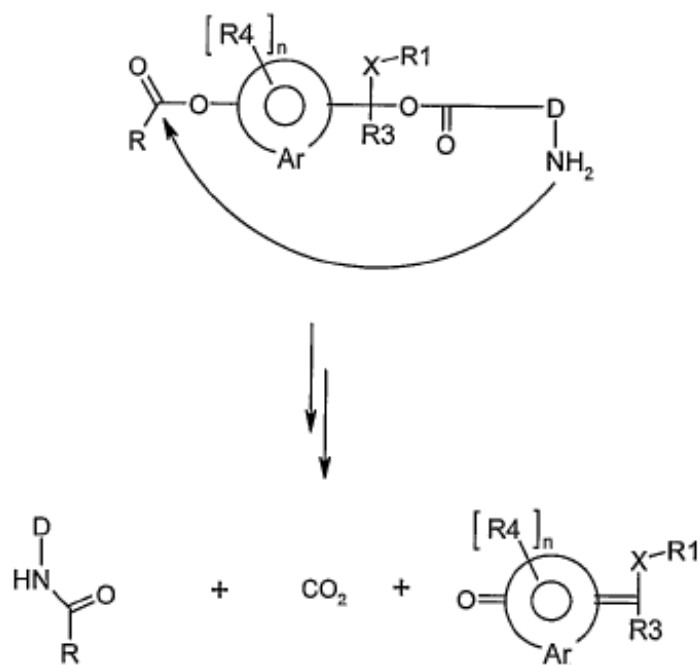


Fig. 9



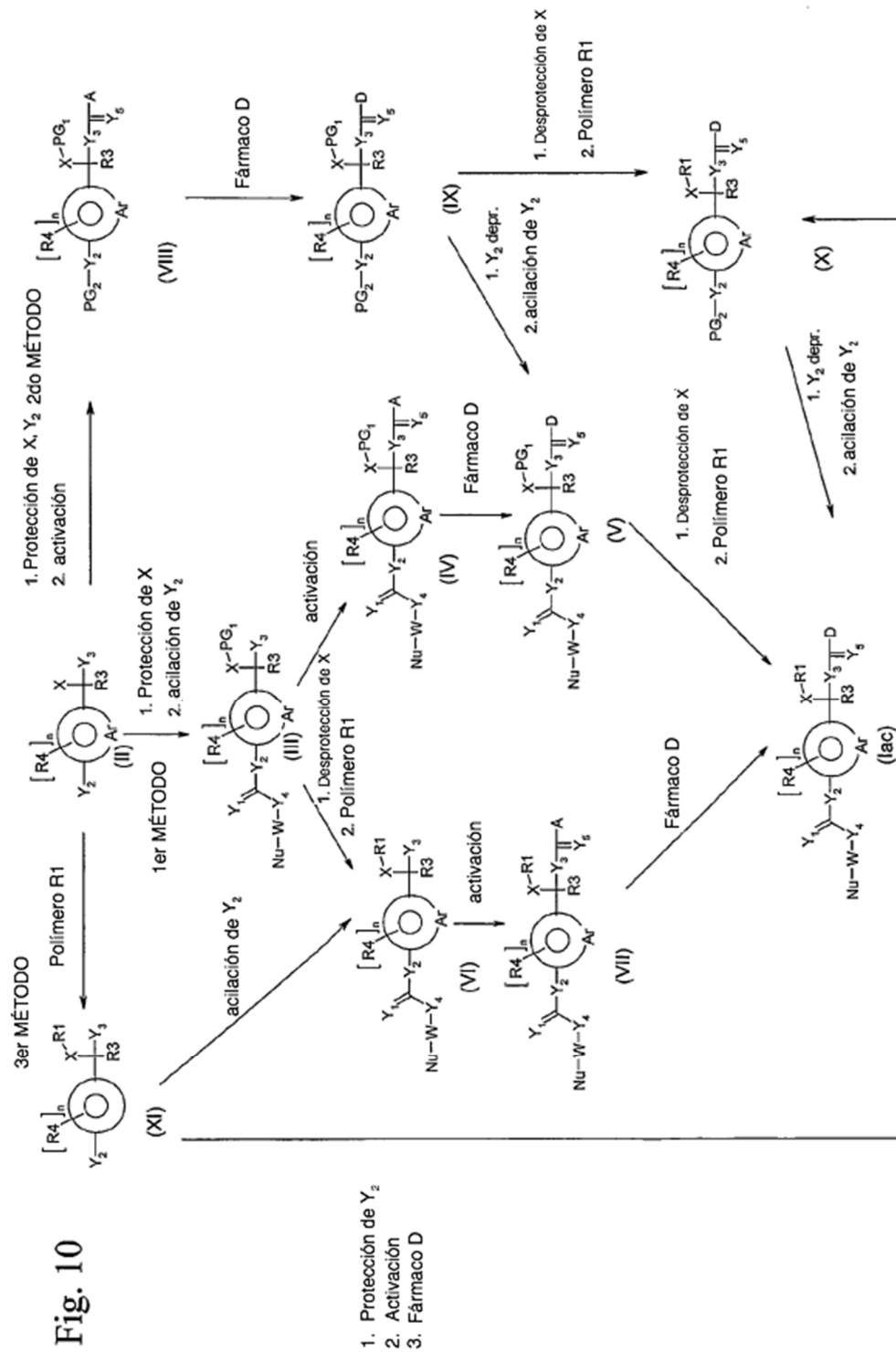


Fig. 11

