

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 985**

51 Int. Cl.:

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

C08F 210/14 (2006.01)

C08F 10/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2015** **PCT/US2015/044771**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016** **WO16025551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2015** **E 15832065 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019** **EP 3180030**

54 Título: **Hidrogeles de trehalosa para la estabilización y administración de proteínas**

30 Prioridad:

12.08.2014 US 201462036431 P

25.03.2015 US 201562138110 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2020

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

MAYNARD, HEATHER D.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 758 985 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles de trehalosa para la estabilización y administración de proteínas

5 Campo de la invención

Se describen composiciones y métodos para preparar hidrogeles de trehalosa para la estabilización y administración de proteínas. Específicamente, las composiciones incluyen nuevos homopolímeros o copolímeros a base de trehalosa con adición de reticulantes, en las que los homopolímeros o copolímeros forman hidrogeles de trehalosa para la

Antecedentes de la invención

Las enzimas tienen estructuras tridimensionales bien definidas formadas por múltiples interacciones no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrófobas (Somero, 1995). A altas temperaturas, las enzimas pierden su estructura original y se desnaturalizan para formar agregados insolubles que ya no están activos (Somero, 1995; Rader et al., 2002; Fágáin, 1995). Debido a su alta eficiencia y selectividad en la catalización de procesos biológicos, las enzimas se utilizan para numerosos fines industriales (Rader et al., 2002; Ravindran y Son, 2011; Samejima et al., 1980; Schmid et al., 2001). Sin embargo, esta inestabilidad térmica de las proteínas tiene un impacto negativo en sus aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y biotecnológica. Muchas técnicas tales como la modificación química (DeSantis y Jones, 1999; Ryan et al., 1994) y la ingeniería de proteínas (Frosst et al., 1995; Matthews et al., 1987; Kumar et al., 2000; Imanaka et al., 1986) se han desarrollado para abordar este problema. Adicionalmente, se han utilizado polímeros como conjugados o excipientes para mejorar la termoestabilidad de las enzimas (Gaertner y Puigserver, 1992; Longo y Combes, 1999; Yang et al., 1996; Kazan y Erarslan, 1997; Tomita et al., 2012). Sin embargo, algunos de estos enfoques son demasiado costosos para ciertas aplicaciones industriales y agrícolas.

Para aplicaciones industriales, los hidrogeles poliméricos son materiales especialmente atractivos para la estabilización enzimática. La inmovilización de enzimas por hidrogeles ha sido ampliamente estudiada en el contexto de la estabilización industrial de enzimas, especialmente en disolventes orgánicos (Sheldon, 2007). Las enzimas pueden cargarse en hidrogeles sin la necesidad de una reacción de conjugación, lo que simplifica el proceso de síntesis y estabilización. Y a diferencia de los excipientes poliméricos que son difíciles de eliminar de la solución enzimática, los hidrogeles macroscópicos se pueden separar fácilmente por filtración o centrifugación. Debido a estas ventajas, los hidrogeles se han utilizado con frecuencia para la estabilización de enzimas, así como otras proteínas (Leobandung, 2002; Akiyoshi et al., 1999; Wang et al., 2008). En el presente documento, se propone un nuevo sistema de hidrogel basado en trehalosa como un excipiente eficaz para mejorar la estabilidad de las enzimas a temperaturas elevadas.

La trehalosa es un disacárido no reductor que se ha demostrado que estabiliza las proteínas y las células frente a tensiones tal como el calor (Lippert y Galinski, 1992; Kaushik y Bhat, 2003; Baptista et al., 2008), desecación (Guo et al., 2000; Hengherr et al., 2008; Crowe et al., 1984), y congelación (Beattie et al., 1997; Sundaramurthi y Suryanarayanan, 2009; Duong et al., 2006). Algunos animales acumulan trehalosa a niveles significativos en respuesta al estrés ambiental (Westh y Ramløv, 1991; Madin y J. H. Crowe, 1975), enfatizando la capacidad de la trehalosa para estabilizar las moléculas biológicas. Además, la trehalosa generalmente se considera segura (GRAS) (Jain y Roy, 2009) y se usa en varios fármacos farmacéuticos como estabilizadores (Ohtake y Wang, 2011). Este grupo ha utilizado previamente polímeros lineales a base de trehalosa como excipientes (Lee et al., 2013) o conjugados (Mancini et al., 2012) para estabilizar las proteínas y retener su actividad contra el calor y la liofilización. Se busca desarrollar material a base de trehalosa para estabilizar las enzimas contra el calor y enfocarse en hidrogeles por las ventajas descritas anteriormente.

Los hidrogeles se han utilizado ampliamente como vehículos de administración de fármacos con aplicaciones biomédicas (Roy y Gupta, 2003). Los "hidrogeles inteligentes", que responden a desencadenantes específicos, se pueden sintetizar para administrar y liberar fármacos invitados en un sitio diana específico (Bajpai et al., 2008; Gupta et al., 2002; Qiu y Park, 2001; Kiyonaka et al., 2002; Mano, 2008). En particular, los hidrogeles sensibles al pH se usan con frecuencia en la administración de fármacos porque los diferentes tipos de células y compartimentos de las células tienen pH discretos, lo que permite la liberación específica del sitio de una carga útil. Por ejemplo, el pH de la matriz extracelular (ECM) es típicamente aproximadamente 7,4, mientras que el citosol tiene un pH más bajo y las células cancerosas también son más ácidas que las células normales (Ingber et al., 1990; Wei et al., 2014). Además, el pH en el estómago está entre pH 2 y 4, dependiendo de si el estómago está vacío o si se ha ingerido alimento (Qiu y Park, 2001). Por lo tanto, la investigación sobre hidrogeles sensibles al pH es un campo de interés importante. Se ha informado de una investigación significativa sobre la administración oral de productos terapéuticos utilizando hidrogeles sensibles al pH. Estos hidrogeles se dirigen al estómago para la administración de sitio específico de antibióticos, proteínas terapéuticas y péptidos (Lowman et al., 1999; Patel y Amiji, 1996; Besheer et al., 2006; Guo y Gao, 2007; Nho et al., 2005; Sajeesh y Sharma, 2006; Shantha y Harding, 2000). Dado que el sitio diana es el estómago y el pH del estómago es de 2-4, dependiendo de si está vacío o lleno, los hidrogeles solo deben liberar sus agentes terapéuticos en condiciones más ácidas que el pH 4. Esta liberación se produce al cambiar el grado de

hinchazón en el hidrogel o al escindir el reticulante.

En la técnica se necesitan hidrogeles de trehalosa para la estabilización y la administración de proteínas como estabilizadores de pienso para animales. La fitasa es producida por bacterias que se encuentran en el intestino de los animales rumiantes (ganado bovino, ovino), lo que les permite utilizar el ácido fítico que se encuentra en los granos como fuente de fósforo. Los no rumiantes (animales monogástricos) como los seres humanos, perros, aves, etc. no producen fitasa. La investigación en el campo de la nutrición animal ha planteado la idea de complementar el pienso con fitasa para poner a disposición de los animales nutrientes unidos a fitatos como calcio, fósforo, otros minerales, carbohidratos y proteínas.

Este es un mercado enorme con una importancia creciente para los estabilizadores de pienso para animales (por ejemplo, fitasa). Se necesitan en la técnica hidrogeles a base de trehalosa para la estabilización y la administración de enzimas de pienso para animales (por ejemplo, fitasa). Estos hidrogeles a base de trehalosa deben responder a los entornos circundantes, por ejemplo, valores de pH o la presencia de glucosa.

La insulina fue el primer fármaco de proteína recombinante aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), y se usa ampliamente para el tratamiento de la diabetes (Brown, 2005). Sin embargo, uno de los desafíos asociados con la terapia con insulina es el requisito de inyección repetida o inserción de bolo de insulina después de cada comida en el caso de la bomba de insulina, lo que es problemático especialmente para niños y adultos jóvenes (Burdick et al., 2004). Para abordar estos desafíos, se ha utilizado ampliamente ácido fenilborónico que no es tóxico y duradero en materiales para la liberación de insulina (Wu et al., 2011). Dado que el ácido borónico forma complejos covalentes dinámicos con 1,2- o 1,3-dioles (Cambre y Sumerlin, 2011), su incorporación en hidrogeles da como resultado materiales sensibles a la glucosa. Los dos mecanismos principales de liberación de insulina de los hidrogeles de ácido borónico son la inflamación y la unión competitiva (Wu et al., 2011). El mecanismo de hinchamiento es causado por el cambio en el equilibrio de las diferentes especies de ácido borónico hacia la forma tetraédrica aniónica tras la unión a los dioles, tales como los que se encuentran en los azúcares, lo que provoca un hinchamiento osmótico de los hidrogeles (Matsumoto et al., 2012). Como alternativa, los polímeros a base de ácido borónico (Bapat et al., 2011) pueden formar un hidrogel al formarse un complejo con un polímero que contiene diol en presencia de insulina, y posteriormente desplazarse competitivamente por la glucosa para disolver el hidrogel y liberar insulina (Wang et al., 2014).

Además de la liberación controlada de insulina, la inestabilidad de la proteína es un problema importante que debe abordarse. La exposición de la insulina a los cambios de temperatura durante el almacenamiento puede conducir a la inactivación de la proteína dando como resultado complicaciones de salud (Pryce, 2009). La inestabilidad también contribuye a los costes médicos del tratamiento de la diabetes debido a la proteína que se descarta y desecha (Weiss et al., 2011). Si bien la insulina se ha modificado para aumentar su semivida *in vivo* (mediante la unión covalente de un polímero) (Hinds y Kim, 2002) y para prevenir la formación de hexámero de insulina (mediante la mutación de la secuencia de aminoácidos) (Heise et al., 2007), solo unos pocos estudios han informado sobre la estabilización de la insulina a la exposición al calor ambiental (Leobandung et al., 2002; Akiyoshi et al., 1998). Peppas ha utilizado nanoesferas compuestas por poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol) para mejorar la estabilidad térmica y mecánica de la insulina (Leobandung et al., 2002), pero su sistema carecía de un mecanismo de liberación. Akiyoshi et al. han utilizado nanogeles de pululano que contienen colesterol para estabilizar la insulina contra el calor y la degradación enzimática, y el nanogel liberó insulina cuando se expuso al nivel fisiológico de albúmina sérica bovina (BSA) por asociación de BSA con pululano (Akiyoshi et al., 1998). Aunque este sistema estabilizó con éxito la insulina, carecía de capacidad de respuesta a la glucosa, lo cual es altamente deseable en los sistemas de administración de insulina. Según el conocimiento de los inventores, aún no se ha informado de un hidrogel que responda tanto a la glucosa como a la estabilización de la insulina.

En la técnica se necesitan hidrogeles de trehalosa para la estabilización y la administración de proteínas. Se necesitan en la técnica hidrogeles a base de trehalosa que respondan a los entornos circundantes, por ejemplo, valores de pH o la presencia de glucosa.

Compendio de la invención

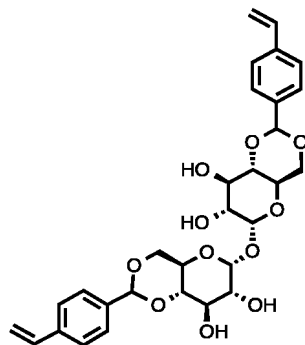
En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para crear un hidrogel a base de trehalosa, que comprende los pasos de a) preparar un reticulante de trehalosa; b) preparar un monómero a base de trehalosa; y c) hacer reaccionar el reticulante de trehalosa con el monómero a base de trehalosa para formar el hidrogel a base de trehalosa.

En una realización, el reticulante de trehalosa se sintetiza usando una química idéntica a la que se usa para preparar el monómero a base de trehalosa.

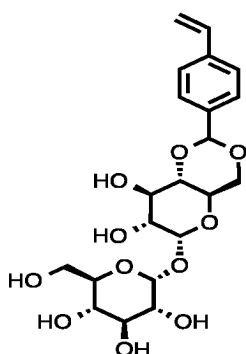
En una realización, el reticulante de trehalosa se sintetiza durante la misma etapa que se usa para preparar el monómero a base de trehalosa.

En una realización, la reacción en la etapa b) es una polimerización por radicales libres iniciada por un iniciador Redox.

En una realización, el reticulante de trehalosa tiene la estructura

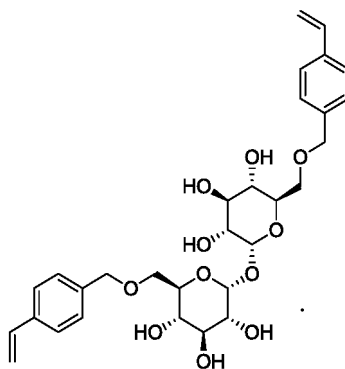


5 En una realización, el monómero a base de trehalosa tiene la estructura

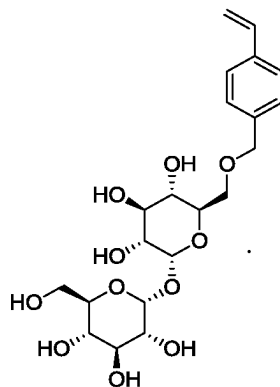


En una realización, el reticulante de trehalosa comprende la estructura

10



En una realización, el monómero a base de trehalosa tiene la estructura



15

En una realización, no es necesario ningún proceso de purificación por HPLC para purificar el monómero a base de trehalosa.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para estabilizar una proteína, que comprende las etapas de a) preparar un hidrogel a base de trehalosa de acuerdo con la invención; y b) añadir una proteína al hidrogel a base de trehalosa en el momento de la formación del hidrogel o después de la formación para formar un complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa; en el que la proteína se estabiliza.

En una realización, la proteína es una enzima.

En una realización, la proteína se estabiliza cuando se expone al calor.

En una realización, la proteína se estabiliza por encima de 4 °C.

En una realización, la proteína se estabiliza a 70-90 °C.

En una realización, la proteína se libera del complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa por dilución con agua o reduciendo el pH.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un conjunto de gráficos que muestran espectros de ¹H RMN de amina PEG de 8 brazos (arriba) y ácido borónico PEG de 8 brazos (abajo) (en D₂O).

La Figura 2 (a y b) es un conjunto de fotografías que muestran (a) una fotografía del hidrogel de trehalosa-ácido borónico formado y (b) una fotografía de hidrogel de trehalosa-ácido borónico cargado con insulina marcada con FITC en D-PBS a pH 7,4.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la cinética de disolución de hidrogeles de PoliSET-ácido borónico después de la inmersión en D-PBS que contiene 0, 1, 5, 10 y 20 mg/ml de glucosa (n = 3 por grupo).

La Figura 4 es un gráfico que muestra la insulina liberada en D-PBS, pH 7,4, que contiene 0, 5 y 10 mg/ml de glucosa (n = 6 por grupo).

La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de ELISA de insulina (sin control de calor), insulina con hidrogel (sin control de calor), insulina sin aditivo (caliente), insulina con ácido borónico PEG de 8 brazos (caliente), insulina con polímero de trehalosa (caliente), e insulina con hidrogel (caliente). La condición de calentamiento fue de 90 °C durante 30 min. *** es *p* < 0,001 en relación con ningún aditivo, ## es *p* < 0,01 en relación con ácido borónico PEG de 8 brazos (n = 6).

La Figura 6 es un gráfico que muestra la insulina liberada en D-PBS, pH 8,0, que contiene 0, 5 y 10 mg/ml de glucosa (n = 3 por grupo).

La Figura 7 es un gráfico que muestra estudios cinéticos de fluoróforo de hidrogel de trehalosa de la liberación de carboxifluoresceína en tampón D-PBS, pH 7,4 (n = 3) tras la adición de glucosa.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la espectroscopía de ¹H RMN del reticulante **bis-SAT** (en CD₃CN).

La Figura 9 es un conjunto de gráficos que muestran la espectroscopía de ¹H RMN de **poli(SAT)** antes (arriba) y después (abajo) del tratamiento con una solución acuosa de TFA al 10 % (en D₆DMSO).

La Figura 10 es un conjunto de fotografías que muestran los estudios de estabilidad de **hidrogel-1 SET** en D-PBS a pH 7,4, PBS pH 5 y TFA al 10 % después de 3 min (arriba) y 3 h de incubación (abajo) a 25 °C.

La Figura 11 (a-e) es un conjunto de fotografías que muestran (a) **SET en bruto** y TEMED disuelto en H₂O, (b) después de añadir APS, (c) después de liofilizar el hidrogel, (d) sumergir el gel liofilizado nuevamente en el H₂O, y (e) después de lavar el hidrogel (molido después de la liofilización y sumergido en H₂O).

La Figura 12 es un gráfico que muestra la actividad de HRP antes del calentamiento (control) y después del calentamiento a 70 °C durante 30 min sin aditivo, 10 equivalentes en peso, o 50 equivalentes en peso de **hidrogel SET** con respecto a la proteína.

La Figura 13 es un conjunto de fotografías que muestran imágenes de microscopía confocal axial (15 barridos) del borde del **hidrogel-2 SET** sumergido en una solución de HRP-AF488 (verde) (resolución axial de 25 µm) durante 24 h y después se lava brevemente.

La Figura 14 (a y b) es un conjunto de fotografías que muestran imágenes SEM de hidrogel de trehalosa. (a) Imágenes con un aumento de 500 veces y (b) con un aumento de 1000 veces.

La Figura 15 es una fotografía que muestra imágenes confocales de hidrogel de trehalosa incubado durante una noche en una solución que contiene fitasa marcada con FITC y lavada con agua desionizada. Los números en la esquina inferior derecha indican índices de corte transaxial. Resolución axial = 2 µm.

La Figura 16 es un gráfico que muestra el perfil de liberación de fitasa marcada con FITC a partir de hidrogel de trehalosa después de la carga y la liofilización (n = 6).

La Figura 17 es un gráfico que muestra la actividad de la fitasa después del calentamiento con diferentes equivalentes en peso de hidrogel de trehalosa. Todas las muestras, excepto el control, se calentaron durante 1 minuto a 90 °C con el 53 % en peso de agua (n = 3). *** = *p* < 0,005 en relación con la fitasa solamente.

La Figura 18 es un gráfico que muestra el cromatograma de LC-MS de la mezcla de estirenil éter trehalosa en bruto después de la precipitación en DCM.

La Figura 19 es un gráfico que muestra el cromatograma de LC-MS del lavado DCM de la mezcla de estirenil éter trehalosa en bruto.

La Figura 20 es un gráfico que muestra el cromatograma de LC-MS de la mezcla de reacción de hidrogel de

trehalosa después de 1 día.

La Figura 21 es un gráfico que muestra el perfil de liberación de fitasa marcada con FITC a partir de hidrogel de trehalosa antes de la liofilización (n = 6).

La Figura 22 es un gráfico que muestra el cromatograma de LC-MS de síntesis de la síntesis de monómero de la primera etapa en el hidrogel a base de trehalosa que produce diversos regioisómeros de trehalosa mono, di y trisustituida.

Descripción detallada de la invención

10 EN GENERAL

Antes de describir los presentes materiales y métodos, se entiende que la presente invención no se limita a una determinada metodología, protocolos, materiales y reactivos particulares descritos, pues estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las solicitudes no provisionales presentadas posteriormente.

Como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Del mismo modo, los términos "un" (o "una"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se pueden usar indistintamente en el presente documento. Los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" se pueden usar indistintamente.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen los mismos significados que el entendido normalmente por alguien con una habilidad habitual en la técnica. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones y patentes específicamente mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia para todos los fines, incluida la descripción y divulgación de los productos químicos, instrumentos, análisis estadísticos y metodologías que se informan en las publicaciones que podrían usarse en relación con la invención. Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva deben tomarse como indicativas de la nivel de experiencia en la técnica. No debe interpretarse que nada en el presente documento sea un reconocimiento de que la invención no tenga derecho a antedatar tal divulgación en virtud de una invención anterior.

DEFINICIONES

Antes de que se describan la composición y los métodos relacionados, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, materiales y reactivos particulares descritos, pues estos pueden variar. La terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las solicitudes no provisionales presentadas posteriormente.

La invención descrita en el presente documento proporciona hidrogeles a base de trehalosa para la estabilización y la administración de proteínas.

De acuerdo con una realización de la invención, se usa un hidrogel a base de trehalosa para estabilizar la proteína contra la agregación, los cambios conformacionales y/o la degradación, tal como la desnaturalización de la proteína nativa o la renaturalización de la proteína desnaturalizada (desplegada o parcialmente plegada), ayudando a mantener la proteína en la configuración deseada en un entorno hostil o estresante, y la función prevista se mantiene al menos igual a la proteína en sus estados naturales o se mejora con una actividad reducida que la proteína tendría en el entorno estresante. Un hidrogel a base de trehalosa actuará para estabilizar las proteínas contra la degradación, por ejemplo, por calor, radiación electromagnética, esfuerzo cortante, proteólisis, o por modificación química tal como reducción, oxidación o carbamilación. Se puede usar un hidrogel a base de trehalosa para estabilizar una proteína en una solución acuosa, o en forma seca, por ejemplo, producido por desecación, deshidratación, evaporación o liofilización (secado por congelación) de una solución acuosa.

Un método para producir hidrogeles a base de trehalosa puede comprender la etapa de hacer reaccionar un homopolímero o copolímero de trehalosa con un reticulante sintetizado previamente para formar el hidrogel a base de trehalosa.

Otro método para producir hidrogeles a base de trehalosa puede comprender la etapa de copolimerizar un reticulante de trehalosa con un monómero a base de trehalosa para formar el hidrogel a base de trehalosa.

El término "arilo" se refiere a un anillo aromático carbocíclico (no heterocíclico o heterocíclico) aromático o un sistema anular mono, bi o tricíclico. El anillo o sistema anular aromático generalmente está compuesto por 6 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, bifenilo, naftilo y tetrahidronaftilo. Se prefieren arilos de 6 miembros tal como fenilo.

El término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos. Los ejemplos incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (Pr), isopropilo (*i*-Pr), butilo (Bu), isobutilo (*i*-Bu), sec-butilo (s-Bu), *terc*-butilo (*t*-Bu), pentilo, neopentilo, hexilo y similares. A menos que el contexto requiera otra cosa, el término "alquilo" también abarca grupos alquilo que contienen un átomo de hidrógeno menos, de modo que el grupo está unido a través de dos posiciones, es decir, divalente. Se prefieren "alquilo C₁₋₄" y "alquilo C₁₋₃" incluyendo metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, sec-butilo y *terc*-butilo, siendo metilo particularmente preferido.

Como se usa en el presente documento, los términos "alquilo", "alquenilo", y el prefijo "alk-" incluyen grupos de cadena lineal y grupos de cadena ramificada y grupos cíclicos, por ejemplo, cicloalquilo y cicloalquenilo. A menos que se especifique de otro modo, estos grupos contienen de 1 a 20 átomos de carbono, conteniendo los grupos alquenilo de 2 a 20 átomos de carbono. En algunas realizaciones, estos grupos tienen un total de, como máximo, 10 átomos de carbono, como máximo, 8 átomos de carbono, como máximo, 6 átomos de carbono, o como máximo, 4 átomos de carbono. Los grupos cíclicos pueden ser monocíclicos o policíclicos y preferiblemente tienen de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo. Los grupos cíclicos ejemplares incluyen ciclopropilo, ciclopropilmetilo, ciclopentilo, ciclohexilo, adamantilo, y bornilo, norbornilo y norbornenilo sustituidos y sin sustituir.

A menos que se especifique de otro modo, "alquilenilo" y "alquenilenilo" son las formas divalentes de los grupos "alquilo" y "alquenilo" definidos anteriormente. Los términos, "alquilenilo" y "alquenilenilo" se usan cuando "alquilenilo" y "alquenilenilo", respectivamente, están sustituidos. Por ejemplo, un grupo arilalquilenilo comprende una fracción alquilenilo a la que está unida un grupo arilo.

El término "haloalquilo" incluye grupos que están sustituidos por uno o más átomos de halógeno, incluyendo grupos perfluorados. Esto también es válido para otros grupos que incluyen el prefijo "halo-". Son ejemplos de grupos haloalquilo adecuados difluorometilo, trifluorometilo y similares. Los "halógenos" son elementos que incluyen cloro, bromo, flúor y yodo.

El término "heteroarilo" incluye anillos o sistemas de anillos aromáticos que contienen al menos un heteroátomo por anillo (por ejemplo, O, S, N). En algunas realizaciones, el término "heteroarilo" incluye un anillo o sistema anular que contiene de 2 a 12 átomos de carbono, de 1 a 3 anillos, de 1 a 4 heteroátomos y O, S y/o N como heteroátomos. Los grupos heteroarilo adecuados incluyen furilo, tienilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, isoindolilo, triazolilo, pirrolilo, tetrazolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, carbazolilo, benzoxazolilo, pirimidinilo, benzoimidazolilo, quinoxalinilo, benzotiazolilo, naftiridinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, purinilo, quinazolinilo, pirazinilo, 1-oxidopiridilo, piridazinilo, triazinilo, tetrazinilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, etc.

Los términos "arileno" y "heteroarileno" son las formas divalentes de los grupos "arilo" y "heteroarilo" definidos anteriormente. Los términos "arilenilo" y "heteroarilenilo" se usan cuando "arileno" y "heteroarileno", respectivamente, están sustituidos. Por ejemplo, un grupo alquilarilenilo comprende una fracción arileno a la que está unido un grupo alquilo.

El término "entorno estresante", como se usa en el presente documento, significa un entorno que reducirá una propiedad funcional o actividad de una biomolécula. Por ejemplo, el entorno puede reducir una propiedad funcional o actividad de una proteína sobre una proteína nativa o aquella que la proteína tiene en su estado natural. Un entorno estresante puede incluir temperaturas que crean entornos térmicos adversos que podrían ser temperaturas elevadas o reducidas, disolventes tal como un disolvente orgánico, la presencia de proteasas, pH y/o falta de tampón.

El término "biomolécula" como se usa en el presente documento se refiere, pero sin limitación, a proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN, ARNs y composiciones farmacéuticas. Dichas biomoléculas están sujetas a tensiones ambientales que incluyen, pero sin limitación, calor, desecación, luz, almacenamiento, exposición a enzimas, endo y exo-nucleasas y variación del pH.

El término "proteína" usado en el presente documento se refiere a cualquier compuesto de dos o más aminoácidos individuales (ya sea de origen natural) unidos mediante enlaces peptídicos, como ocurre cuando el átomo de carbono carboxilo del grupo de ácido carboxílico unido al carbono α de un aminoácido (o residuo de aminoácido) se une covalentemente al átomo de nitrógeno amino del grupo amino unido al carbono α de un aminoácido adyacente. Estas uniones de enlaces peptídicos, y los átomos que los comprenden (es decir, átomos de carbono α , átomos de carbono carboxilo (y sus átomos de oxígeno sustituyentes) y átomos de nitrógeno amino (y sus átomos de hidrógeno sustituyentes)) forman el "esqueleto polipéptido" de la proteína. Además, como se usa en el presente documento, se entiende que el término "proteína" incluye los términos "polipéptido" y "péptido". De manera similar, los fragmentos de proteínas, análogos, derivados y variantes se pueden denominar en el presente documento "proteínas", y se considerarán como una "proteína" a menos que se indique de otro modo. El término "fragmento" de una proteína se refiere a un polipéptido que comprende menos que todos los residuos de aminoácidos de la proteína. Como puede apreciarse, un "fragmento" de una proteína puede ser una forma de la proteína truncada en el extremo amino, el extremo carboxilo, y/o internamente (tal como por corte y empalme natural), y también puede ser una variante y/o derivado. Un "dominio" de una proteína también es un fragmento, y comprende los residuos de aminoácidos de la proteína requeridos para conferir actividad bioquímica correspondiente a la proteína de origen natural. El término

"proteína" usado en el presente documento también incluye "conjugado de proteína" que se refiere a un complejo de compuesto que comprende una "proteína" que está interconectada entre sí con otra molécula o sujeto. El término "complejo" se usa en el presente documento para referirse a los compuestos que comprenden al menos dos componentes. La proteína puede ser de origen natural y estar aislada de su fuente. La proteína puede producirse usando técnicas de recombinación o mutación de ADN. La proteína se puede producir *in vivo* en un animal completo, o en una célula eucariota o procariota; como alternativa, la proteína puede generarse usando un método *in vitro* tal como traducción *in vitro* sin células, por ejemplo, usando lisado de *E. coli*, extracto de germen de trigo o reticulocito de conejo. Se pueden emplear métodos de traducción *in vitro* sin células después de la transcripción *in vitro*, por ejemplo, después de la presentación de fagos o ribosomas.

Los ejemplos de proteínas incluyen, sin limitación, lisozima, adenosina desaminasa, L-asparaginasa, urato oxidasa de mamíferos, interferones, anti-TNF α Fab, factor estimulado por colonias de granulocitos (G-CSF), activador continuo del receptor de eritropoyetina, antagonista de hGH B2036, insulina, inhalación de insulina humana, insulina aspart, insulina glulisina, insulina lispro, insulina isófana, insulina detemir, insulina glargina, insulina de cinc extendida, acetato de pramlintida, hormona del crecimiento (GH), somatotropina, mecasermina, rinfabato de mecasermina, Factor VIII, Factor IX, Antitrombina III (AT-iii), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), concentrado de proteína C, β -Glucocerebrosidasa, Alglucosidasa- α , Laronidasa (α -L-iduronidasa), Idursulfasa (iduronato-2-sulfatasa), Galsulfasa, Agalsidasa- β (α -galactosidasa humana A), inhibidor de α -1-proteinasa, lactasa, enzimas pancreáticas, lipasa, amilasa, proteasa, adenosina desaminasa, inmunoglobulinas agrupadas, albúmina humana, eritropoyetina, epoetina- α , darbepoetina- α , sargramostim (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos; GM-CSF), oprelvequina (interleucina 11; IL11) Hormona estimuladora del folículo humano (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), lutropina- α , alfa-interferón de tipo I, interferón alfacon 1, interferón consenso, aldesleucina (interleucina 2 (IL2), factor activador de timocitos epidérmicos (ETAf), alteolasa (activador de plasminógeno tisular: tPA), reteplasa (deleción muteína de tPA), tenecteplasa, urocinasa, factor VIIa, drotrecogina- α (proteína C activada), calcitonina de salmón, teriparatida (residuos de la hormona paratiroidea humana 1-34), exenatida, octreotida, dibotermína- α (proteína morfogénica ósea humana recombinante 2; rhBMP2), proteína morfogénica ósea humana recombinante 7 (rhBMP7), acetato de histrelina (hormona liberadora de gonadotropina; GnRH), palifermina (factor de crecimiento de queratinocitos; KGF), becaplermina (factor de crecimiento derivado de plaquetas; PDGF), tripsina, nesiritida, toxina botulínica tipo A, toxina botulínica tipo B, colágeno, collagenasa, desoxirribonucleasa humana I, dornasa- α , hialuronidasa (bovina, ovina), hialuronidasa (humana recombinante), papaína, L-asparaginasa, rasburicasa, lepirudina, bivalirudina, estreptocinasa, anistreplasa (complejo activador de estreptoquinasa de plasminógeno anisilado; APSAC), bevacizumab, cetuximab, panitumumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, abatacept anakinra, adalimumab, etanercept, infliximab, alefacept, efalizumab, natalizumab, eculizumab, globulina antitímocítica (conejo), basiliximab, daclizumab, muromonab-CD3, omalizumab, palivizumab, enfuvirtida, abaciximab, Crotalida Fab inmune polivalente (ovina), Digoxina Fab en suero inmune (ovina), ranibizumab, denileucina difitox, ibritumomab tiuxetan, gemtuzumab ozogamicina, tositumomab, e itositumomab.

Una proteína desnaturalizada puede estar completamente desnaturalizada, o parcialmente desnaturalizada o renaturalizada de modo que la proteína esté en forma no nativa como proteína desplegada y/o uno o más intermediarios de replegamiento parcialmente plegado. Una solución acuosa o muestra seca que comprende proteína desnaturalizada puede contener una o más de estas formas. Una proteína nativa está en una conformación funcional plegada. Algunas proteínas también pueden estar presentes en una solución acuosa, o en una muestra seca, en forma de agregados contaminantes y/o cuerpos de inclusión.

El término "estabilidad" se refiere al mantenimiento de una función de bioactividad nativa de proteína u otra biomolécula después del almacenamiento. La presente invención proporcionará estabilidad de al menos el 70 %, y preferiblemente al menos el 80 %, de la función de la proteína en comparación con el almacenamiento sin un agente estabilizador de trehalosa en condiciones ambientales idénticas. Se prevé que, por ejemplo, cuando una proteína como la insulina se conjuga con un polímero o copolímero a base de trehalosa como se describe aquí, la proteína de la insulina conserva al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más de su bioactividad nativa en comparación con la insulina en sí misma, que puede conservar solo el 20 % de su bioactividad original en el mejor de los casos. Los expertos en la técnica aprecian que el porcentaje de bioactividad que se conserva depende de proteínas y estrés. Además, el periodo de tiempo que una proteína conjugada es capaz de mantener su bioactividad o función en comparación con una proteína sin tratar/no modificada varía dependiendo de los factores estresantes ambientales a los que está sometida. Se prevé que las proteínas conjugadas como se describen aquí pueden conservar la bioactividad al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces más que una proteína nativa no conjugada en condiciones ambientales idénticas.

El término "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo" como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina u otras moléculas que comprenden un dominio de unión a antígeno. El término "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos completos (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM, o IgD), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos quiméricos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. El anticuerpo monoclonal también incluye "anticuerpo monoclonal humano" que se refiere a anticuerpos que muestran

una especificidad de unión única que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden producirse mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un gen trans de cadena pesada humana y un transgen de cadena humana ligera fusionado a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, usualmente preparada por técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos también pueden comprender una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado de la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican ADN recombinante convencional y técnicas de transfección génica ahora bien conocidas en la técnica.

El término "anticuerpo" también incluirá anticuerpo humanizado, anticuerpo humano y anticuerpo humano recombinante. El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina original. En una realización preferida, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Las CDR particularmente preferidas corresponden a aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. La cadena pesada variable se deriva preferiblemente de la secuencia de línea germinal DP-50 y la cadena ligera variable se deriva de la secuencia de línea germinal L6. Las regiones constantes del anticuerpo son regiones constantes de tipo IgG1 humana.

El término "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula SP2-0, NSO o CHO (como CHO KI) o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes o anticuerpos de inmunoglobulina humana expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en una forma reorganizada.

También se incluyen los términos "anticuerpo" también incluye "fragmentos de anticuerpos" o "fragmentos derivados de anticuerpos" que comprenden un dominio de unión a antígeno. El término "fragmento de anticuerpo" como se usa en el presente documento pretende incluir cualquier fragmento de anticuerpo apropiado que muestre la función de unión a antígeno, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, Fd, dAb, dímeros TandAbs, minicuerpos, monocuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos, y fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAb, TandAbs, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también pueden sintetizarse mediante técnicas recombinantes o pueden sintetizarse químicamente. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpos se conocen bien y se describen en la técnica.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden producirse de forma natural o pueden producirse total o parcialmente de forma sintética. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser de cualquier fuente apropiada, por ejemplo, fuentes recombinantes, y/o producirse en animales transgénicos o plantas transgénicas. Por lo tanto, las moléculas de anticuerpos se pueden producir *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo que generalmente comprenden el sitio de unión a antígeno. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la totalidad o una parte de una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la totalidad o una parte de una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. La totalidad o parte de dichas regiones constantes pueden producirse de forma natural o pueden ser total o parcialmente sintéticas. Las secuencias apropiadas para dichas regiones constantes se conocen bien y se documentan en la técnica.

El término "fragmento" como se usa en el presente documento, se refiere a fragmentos de relevancia biológica (fragmento funcional), por ejemplo, fragmentos que pueden contribuir o permitir la unión al antígeno, por ejemplo, forman parte o la totalidad del sitio de unión a antígeno, o pueden contribuir a la inhibición o reducción en función del

antígeno o pueden contribuir a la prevención de la interacción del antígeno con sus ligandos naturales. Por lo tanto, los fragmentos comprenden una región variable de cadena pesada (dominio V_H) y/o una región variable de cadena ligera (dominio V_L) de los anticuerpos de la invención. Los fragmentos también pueden comprender una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada de los anticuerpos o de los dominios V_H , o una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena ligera de los anticuerpos, o de los dominios V_L .

El término "polímero de azúcar" como se usa en el presente documento, abarca moléculas de sacárido polimérico y oligomérico que comprenden tres o más unidades de mono, di o tri-sacárido. El polímero de azúcar puede ser un derivado de polímero de azúcar anfipático lineal o no lineal. Específicamente, los polímeros de azúcar comprenden uno o más azúcares incluyendo, sin limitación, trehalosa, eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, xilulosa y ribulosa. Los polímeros de azúcar pueden ser dextrano, celulosa, amilosa, almidón, pululano, manano, quitina, quitosano, inulina, levan, xilano, ciclodextrina (siempre que no sea una alfa, beta o gamma ciclodextrina), cicloamilosa o un derivado de los mismos.

Los polímeros de azúcar, específicamente un homopolímero o copolímeros a base de trehalosa adecuados para su uso en la invención son aquellos que, a una concentración apropiada y en condiciones apropiadas, pueden (1) mantener una biomolécula nativa en su estado nativo para conservar una propiedad funcional de la biomolécula nativa en un entorno estresante, o (2) mantener una biomolécula desnaturalizada en un estado no nativo según lo deseado por el investigador. El homopolímero o copolímeros a base de trehalosa adecuados son aquellos que son capaces de proteger las cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos o modificar la carga neta de biomoléculas o las características de enlace de hidrógeno. El homopolímero o copolímeros a base de trehalosa adecuados también pueden comprender aquellos capaces de atrapar agua, o aquellos que tienen características de enlace de hidrógeno.

El término "hidrogel", como se usa en el presente documento, se refiere a una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas, a veces encontradas como un gel coloidal en el que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son redes poliméricas naturales o sintéticas altamente absorbentes (pueden contener más del 90 % de agua). Los hidrogeles también poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su importante contenido de agua.

Los hidrogeles son redes tridimensionales hechas de polímeros hidrófilos o polímeros que contienen copolímeros hidrófilos. Las redes de hidrogel se forman mediante la reticulación de cadenas de polímeros a través de enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, o mediante enredos físicos. Los hidrogeles se pueden preparar con materiales sintéticos biocompatibles para lograr propiedades específicas a nivel de microescala o nanoscala. La manipulación del peso molecular o la distribución del peso molecular se puede utilizar para modular la resistencia mecánica de los hidrogeles para satisfacer diferentes requisitos. Los hidrogeles pueden diseñarse para modular la porosidad de la red, que puede usarse ventajosamente para controlar la velocidad de liberación. Los hidrogeles se pueden diseñar en una amplia variedad de formas, según se desee. Dependiendo de los requisitos, los hidrogeles pueden prepararse en diferentes formatos de geometría, tales como partículas, películas, recubrimientos, cilindros y placas para usos *in vitro* y/o *in vivo*.

Los hidrogeles pueden formarse a partir de una amplia diversidad de materiales poliméricos biocompatibles, incluyendo, pero sin limitación, poliuretano, silicona, copolímeros de silicona y poliuretano, poliolefinas tales como poliisobutileno y poliisopreno, nitrilo, neopreno, colágeno, alginato y similares. Por ejemplo, se pueden formar hidrogeles adecuados a partir de alcohol polivinílico, acrilamidas tales como ácido poliacrílico y poli(acrilonitrilo-ácido acrílico), poliuretanos, polietilenglicol, poli(N-vinil-2-pirrolidona), acrilatos tales como poli(hidroxietil metacrilato) y copolímeros de acrilatos con N-vinil pirrolidona, N-vinil lactamas, una poli(lactida-co-glicolida), acrilamida, poliuretanos, poli(acrilonitrilo), poloxámero, copolímeros de N-isopropilacrilamida, poli(N-isopropilacrilamida), poli(vinil metil éter), poli(NIPAAm-co-PEG), y similares.

Se pueden formar hidrogeles adecuados a partir de tribloque ABA que contiene poliéster hidrófobo (bloque A) y poliéter hidrófilo; copolímero tribloque de poli(D,L-lactida-bloque-óxido de etileno-bloque-D,L-lactida) PLA-PEO-PLA, copolímero tribloque de poli(L-lactida-bloque-óxido de etileno-bloque-L-lactida) PLLA-PEO-PLLA, copolímero tribloque de poli[(D,L-lactida-co-glicolida)-bloque-óxido de etileno-bloque-(D,L-lactida-co-glicolida)] PLGA-PEO-PLGA, copolímero tribloque de poli[(L-lactida-co-glicolida)-bloque-óxido de etileno-bloque-(L-lactida-co-glicolida)] PLLGA-PEO-PLLGA, copolímero tribloque de poli[(D,L-lactida-co-glicolida)-bloque-óxido de etileno-bloque-(D,L-lactida-co-glicolida)] PLGA-PEO-PLGA, copolímero tribloque de poli(ε-caprolactona-bloque-óxido de etileno-bloque-ε-caprolactona) PCL-PEO-PCL, copolímero tribloque de poli[(D,L-lactida-co-ε-caprolactona)-bloque-óxido de etileno-bloque-(D,L-lactida-co-ε-caprolactona)] PLC-PEO-PLC. Los solicitantes prevén que cualquier otro copolímero tribloque según se aprecia por un experto en la técnica también puede usarse para la presente invención.

Los hidrogeles se pueden preparar con biomoléculas naturales. Por ejemplo, pueden formarse hidrogeles naturales adecuados a partir de gelatina, agarosa, amilasa, amilopectina, derivados de celulosa tales como metilcelulosa, hialuronano, quitosano, carragenanos, colágeno, Gellan®, alginato y otros polímeros derivados naturalmente. Por ejemplo, el colágeno se puede usar para formar hidrogel. El colágeno puede usarse para crear una matriz extracelular

artificial que puede usarse como andamiajes de infiltración celular para inducir la regeneración y remodelación de tejidos. Los hidrogeles naturales adecuados también incluyen alginato. El alginato es un polisacárido natural extraído de algas o producido por bacterias. El alginato puede ser un polímero aniónico lineal compuesto por ácido β -D-manurónico ligado a 1,4 y residuos de ácido α -L-gulurónico. En una realización, el alginato biocompatible forma hidrogeles en presencia de cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}). Por consiguiente, la síntesis de hidrogeles de alginato puede realizarse en una condición fisiológica en la que las proteínas, cuya liberación se va a controlar, conservan su función natural. Los hidrogeles de alginato pueden usarse para la encapsulación de perlas recubiertas con aptámeros funcionalizados y para usarse en la liberación controlada de la proteína para la regeneración tisular, y la administración de proteínas *in vitro* e *in vivo*. En otra realización, se puede usar agarosa para formar un hidrogel.

Los hidrogeles se han utilizado ampliamente como vehículos de administración de fármacos con aplicaciones biomédicas (Roy, I.; Gupta, M. N. Chem. Biol. 2003, 10, 1161-1171). Los "hidrogeles inteligentes", que responden a desencadenantes específicos, se pueden sintetizar para administrar y liberar fármacos invitados en un sitio diana específico (Bajpai, A. K.; Shukla, S. K.; Bhanu, S.; Kankane, S. Prog. Polym. Sci. 2008, 33, 1088-1118; Gupta, P.; Vermani, K.; Garg, S. Drug Discov. Today 2002, 7, 569-579; Qiu, Y.; Park, K. Adv. Drug Delivery Rev. 2001, 53, 321-339; Kiyonaka, S.; Sugiyasu, K.; Shinkai, S.; Hamachi, I. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 10954-10955; Mano, J. F. Advanced Engineering Materials 2008, 10, 515-527). En particular, los hidrogeles sensibles al pH se usan con frecuencia en la administración de fármacos porque los diferentes tipos de células y compartimentos de las células tienen pH discretos, lo que permite la liberación específica del sitio de una carga útil. Por ejemplo, el pH de la matriz extracelular (ECM) es típicamente aproximadamente 7,4, mientras que el citosol tiene un pH más bajo y las células cancerosas también son más ácidas que las células normales (Ingber, D. E.; Prusty, D.; Frangioni, J. V.; Cragoe, E. J.; Lechene, C.; Schwartz, M. A. J. Cell Biol. 1990, 110, 1803-1811; Wei, F.; Zhuyuan, W.; Shenfei, Z.; Hui, C.; Dan, Z.; Yuan, Z.; Yiping, C. Biosens. Bioelectron. 2014, 57, 10-15). Además, el pH en el estómago está entre pH 2 y 4, dependiendo de si el estómago está vacío o si se ha ingerido alimento (Qiu, Y.; Park, K. Adv. Drug Delivery Rev. 2001, 53, 321-339). Por lo tanto, la investigación sobre hidrogeles sensibles al pH es un campo de interés importante. Se ha informado de una investigación significativa sobre la administración oral de productos terapéuticos utilizando hidrogeles sensibles al pH. Estos hidrogeles se dirigen al estómago para la administración de sitio específico de antibióticos, proteínas terapéuticas, y péptidos (Lowman, A. M.; Morishita, M.; Kajita, M.; Nagai, T.; Peppas, N. A. J. Pharm. Sci. 1999, 88, 933-937; Patel, V.; Amiji, M. Pharm. Res. 1996, 13, 588-593; Besheer, A.; Wood, K. M.; Peppas, N. A.; Mader, K. J. Control. Release 2006, 111, 73-80; Guo, B.-L.; Gao, Q.-Y. Carbohydr. Res. 2007, 342, 2416-2422; Nho, Y. C.; Park, S. E.; Kim, H. I.; Hwang, T. S. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 2005, 236, 283-288. Sajeesh, S.; Sharma, C. P. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials 2006, 76B, 298-305; Shantha, K. L.; Harding, D. R. K. Int. J. Pharm. 2000, 207, 65-70). Debido a que el sitio objetivo es el estómago, los hidrogeles solo deben liberar sus agentes terapéuticos en condiciones más ácidas que el pH 3. Esta liberación se produce al cambiar el grado de hinchazón en el hidrogel o al escindir el reticulante.

Un hidrogel puede definirse como una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfílica capaz de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de reticulantes covalentes químicos o físicos (iónicos, interacciones hidrófobas, enredos). Los reticulantes 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. Las cadenas de la red están conectadas de tal manera que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros tiene dimensiones entre 1 nm y 10 μm .

El término "reticulación" o "reticulante", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que es capaz de unir al menos una segunda molécula al menos a una tercera molécula a través de enlaces covalentes o enlaces iónicos. En una realización, al menos una de la segunda o tercera molécula es un polímero. En una realización, el reticulante es un PEG con brazos o un PEG en estrella.

El término "reticulante de trehalosa", como se usa en el presente documento, se refiere a un reticulante que comprende al menos un grupo trehalosa.

El término "reticulante a base de ácido borónico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o reticulante, que se produce a partir de la reacción de un ácido borónico con otro compuesto. El otro compuesto generalmente tiene una estructura típica para reticular, por ejemplo, estructuras de PEG con múltiples brazos.

El término "polietilenglicol" o "PEG", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto de poliéter con muchas aplicaciones desde la fabricación industrial hasta la medicina. La estructura del PEG es: $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$.

El término "PEG con brazos" o "PEG ramificado", o "PEG con múltiples brazos" como se usa en el presente documento, se refiere a PEG que tienen de tres a diez cadenas de PEG que emanan de un grupo núcleo central. El término "PEG en estrella" se refiere a PEG que tienen de 10 a 100 cadenas de PEG que emanan de un grupo de núcleo central.

El término "monómero a base de trehalosa", como se usa en el presente documento, se refiere a un monómero que incluye al menos una trehalosa que está unida covalentemente a la cadena lateral del monómero. La administración

controlada *in vivo* de biomoléculas mientras se mantiene la estabilidad es fundamental para su uso terapéutico eficiente. El interés por los hidrogeles que contienen ácido borónico para aplicaciones en una amplia diversidad de campos biomédicos está creciendo (Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S. *Polymer* 2011, 52, 4631-4643; Guan, Y.; Zhang, Y. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 8106-8121; Ravaine, V.; Ancla, C.; Catargi, B. J. *Control. Release* 2008, 132, 2-11). Debido a que los ácidos borónicos forman complejos covalentes reversibles con 1,2- o 1,3-dioles, su incorporación en hidrogeles da como resultado materiales sensibles a la glucosa (Kuivila, H. G.; Keough, A. H.; Soboczenski, E. J. *J. Org. Chem.* 1954, 19, 780-783; Springsteen, G.; Wang, B. H. *Tetrahedron* 2002, 58, 5291-5300; Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. *Tetrahedron* 2004, 60, 11205-11209; Barker, S. A.; Chopra, A. K.; Hatt, B. W.; Somers, P. J. *Carbohydr. Res.* 1973, 26, 33-40). Debido a este resto sensible a la glucosa, estos hidrogeles se usan comúnmente como dispositivos para la administración de insulina (Matsumoto, A.; Yamamoto, K.; Yoshida, R.; Kataoka, K.; Aoyagi, T.; Miyahara, Y. *Chem. Commun.* 2010, 46, 2203-2205; Wang, D.; Liu, T.; Yin, J.; Liu, S. *Macromolecules* 2011, 44, 2282-2290; Ancla, C.; Lapeyre, V.; Gosse, I.; Catargi, B.; Ravaine, V. *Langmuir* 2011, 27, 12693-12701; Matsumoto, A.; Ishii, T.; Nishida, J.; Matsumoto, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y. *Angewandte Chemie-International Edition* 2012, 51, 2124-2128; Zhang, C.; Losego, M. D.; Braun, P. V. *Chem. Mater.* 2013, 25, 3239-3250; Yuan, W.; Shen, T.; Wang, J.; Zou, H. *Polymer Chemistry* 2014, 5, 3968-3971; Yang, T.; Ji, R.; Deng, X.-X.; Du, F.-S.; Li, Z.-C. *Soft Matter* 2014, 10, 2671-2678). La mayoría de estos hidrogeles de ácido borónico de administración de insulina se prepararon copolimerizando ácido borónico y monómeros reticulables para formar un hidrogel que se hincha en presencia de glucosa, liberando así insulina.

El término "síntesis de un solo paso", como se usa en el presente documento, se refiere a una estrategia para mejorar la eficacia de una reacción química mediante lo cual un reactivo se somete a reacciones químicas sucesivas en un solo reactor. Esto es muy deseado por los químicos debido a que evitar un largo proceso de separación y purificación de los compuestos químicos intermedios ahorrará tiempo y recursos aumentando al mismo tiempo el rendimiento químico y reduciendo el desperdicio.

LA INVENCION

La presente invención divulga nuevas composiciones de matriz porosa de afinidad biocompatible, formulaciones y métodos para controlar la liberación de biomoléculas (por ejemplo, péptidos o proteínas) adecuadas para una amplia gama de aplicaciones médicas, farmacéuticas y agrícolas. La presente invención generalmente se refiere a una tecnología que proporciona composiciones y formulaciones reproducibles y fáciles de fabricar para la liberación de péptidos o proteínas. En una realización, la nueva composición de matriz porosa de afinidad biocompatible es un hidrogel.

Específicamente, la presente invención se refiere a hidrogeles, en particular hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la presente invención se refiere a hidrogeles para proteger y controlar la liberación de un péptido o proteína. En una realización específica, el péptido o proteína es una insulina.

En vista del hecho de que la exposición de la insulina a los cambios de temperatura durante el almacenamiento puede conducir a la inactivación de la proteína que da como resultado complicaciones para la salud, la presente invención divulga hidrogeles y métodos para usar hidrogeles para estabilizar insulinas a temperaturas elevadas. Específicamente, la presente invención divulga hidrogeles y métodos para usar hidrogeles para mejorar la estabilidad térmica y mecánica de la insulina. Al mismo tiempo, la presente invención también divulga hidrogeles y métodos de uso de hidrogeles para controlar las insulinas de liberación.

Por ejemplo, la presente invención divulga métodos para fabricar hidrogeles a base de trehalosa para estabilizar moléculas de insulina, en los que las moléculas de insulina pueden estar unidas covalentemente o no covalentemente a los hidrogeles. Dichos hidrogeles son sensibles a los entornos circundantes, por ejemplo, la presencia de glucosa. Por lo tanto, al controlar los entornos circundantes, por ejemplo, la concentración de glucosa, la insulina puede liberarse de manera controlada a partir de los hidrogeles presentes.

En otra realización, el péptido o proteína es una enzima de alimentación tal como la fitasa.

En vista del hecho de que la conversión de ácido fítico es esencial para especies de estómago simple tales como cerdos, aves y peces para utilizar esta forma de almacenamiento de fosfato presente en granos de pienso comunes tal como maíz, soja, y trigo, la presente invención divulga hidrogeles y métodos para usar hidrogeles para la estabilización de enzimas (por ejemplo, fitasa) a temperaturas elevadas (por ejemplo, más altas que la temperatura ambiente).

En una realización específica, la presente invención se refiere a un hidrogel a base de trehalosa que se puede sintetizar en dos etapas a partir de materiales de partida comerciales con procedimientos de purificación mínima. En una realización, los monómeros de trehalosa mono y multifuncionales pueden reticularse mediante polimerización por radicales iniciada por redox para formar un hidrogel. En una realización específica, fitasa, una enzima importante utilizada en la alimentación animal, puede usarse para mostrar la eficacia del hidrogel de trehalosa para estabilizar las proteínas contra el calor.

Por ejemplo, la adición de la solución de fitasa al hidrogel dio como resultado la internalización de la enzima según lo confirmado por microscopía confocal. La fitasa en el hidrogel conservó el 100 % de la actividad tras el calentamiento a 90 °C en comparación con el 39 % cuando el hidrogel estaba ausente. La enzima también podría recuperarse del hidrogel. Los solicitantes prevén que la síntesis de hidrogel de trehalosa informada en el presente documento debería ser fácilmente escalable para la estabilización térmica de una amplia diversidad de enzimas.

Específicamente, tal como se describe más adelante, los Solicitantes encontraron que la fitasa conserva el 100 % de la actividad cuando se calienta a 90 °C en presencia de hidrogeles de trehalosa. El ejemplo 3 muestra los experimentos detallados de hidrogeles para proteger y controlar la liberación de un péptido o proteína, por ejemplo, fitasa.

En un aspecto, la presente invención divulga un método para crear un hidrogel a base de trehalosa. Dichos hidrogeles a base de trehalosa se pueden usar para estabilizar y administrar una proteína. En una realización específica, la proteína es una insulina. En una realización, la proteína (por ejemplo, insulina) se puede añadir antes de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la proteína (por ejemplo, insulina) se puede añadir durante la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la proteína (por ejemplo, insulina) se puede añadir después de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa.

En una realización específica, la proteína es una enzima de alimentación tal como fitasa. En una realización, la enzima (por ejemplo, fitasa) se puede añadir antes de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la enzima (por ejemplo, fitasa) se puede añadir durante la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la enzima (por ejemplo, fitasa) se puede añadir después de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa.

En una realización, un método para crear un hidrogel a base de trehalosa, que comprende las etapas de (a) formar un homopolímero o copolímero de trehalosa; (b) preparar un reticulante; y (c) hacer reaccionar el homopolímero o copolímero de trehalosa con el reticulante para formar el hidrogel a base de trehalosa.

En una realización del presente método, se usa un hidrogel a base de trehalosa para estabilizar y administrar una proteína. En una realización, la proteína se puede añadir antes de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la proteína se puede añadir durante la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la proteína se puede añadir después de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa.

En una realización, los homopolímeros o copolímeros de trehalosa tienen las estructuras generales de $R_5-[R_1R_2C-CR_3R_4]_n-R_6$, en las que R_1-R_4 se seleccionan independientemente de hidrógeno o una cadena lateral que comprende al menos un átomo de carbono, y en las que al menos uno de R_1-R_4 es una cadena lateral que comprende -L-trehalosa, en las que L es una molécula enlazadora que une trehalosa al monómero a través de al menos uno de los grupos hidroxilo de trehalosa (-OH), y en las que R_5 y R_6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -Alquilo, -Alqueno, -Alquino, -arilo, -C(CN)(Alquilo)₂, -S₂C-S-Alquilo, -C(CO)(Alquilo)-(OCH₂CH₂)_n-COO-CH₂CH₂-CO-Alquilo (n = 1-10), y biomoléculas.

La solicitud de patente anterior de los Solicitantes WO 2013/112897 divulgó métodos para fabricar homopolímeros o copolímeros de trehalosa. Los solicitantes prevén que otros homopolímeros o copolímeros de trehalosa también pueden ser adecuados para la presente invención.

En una realización, los reticulantes son polietilenglicoles o derivados de polietilenglicol (PEG). Preferiblemente, los reticulantes son derivados de polietilenglicol (PEG) con múltiples brazos. En el Esquema 1 se muestra un derivado ejemplar de polietilenglicol (PEG).

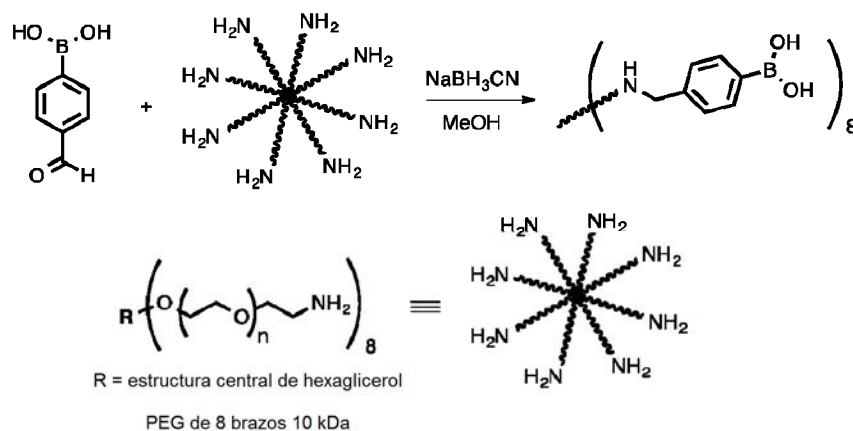
En una realización, el reticulante en la presente invención es un compuesto a base de ácido borónico. El ácido borónico es biocompatible y puede unirse reversiblemente a la glucosa, lo que lo convierte en un resto prometedor para la administración de insulina. La unión del ácido borónico al diol depende del pH, siendo la forma de boronato la principal responsable de la unión a azúcares. Un agente de reticulación basado en ácido borónico puede unirse a los dioles en el polímero de trehalosa. Tras la adición de glucosa, la glucosa puede desplazar al polímero de trehalosa debido a su mayor afinidad de unión con el borato.

En una realización, el ácido borónico que es adecuado para la presente invención tiene una estructura de $R-B(OH)_2$, en la que R = arilo, alquilo o alqueno. En una realización preferida, R = arilo. Los solicitantes prevén que cualquier compuesto estructuralmente similar, incluyendo los homólogos de heteroarilo, también puede usarse para la presente invención.

En una realización específica, el reticulante a base de ácido borónico es un reticulante de poli(etilenglicol) (PEG)-ácido borónico.

Por ejemplo, la amina PEG de 8 brazos puede funcionalizarse con ácido borónico mediante aminación reductora. El Esquema 1 describe la reacción de la amina PEG de 8 brazos con ácido borónico para formar un reticulante a base de ácido borónico ejemplar. El Ejemplo 1 incluye los materiales detallados y los procedimientos sintéticos para las

reacciones en el Esquema 1.



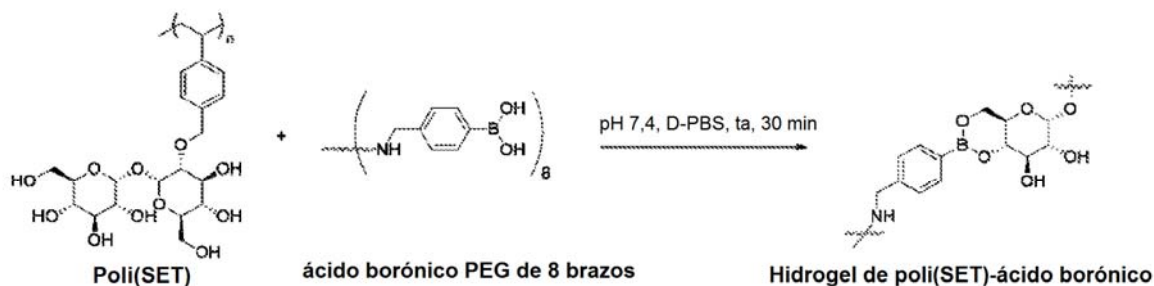
Esquema 1

5 Los Solicitantes prevén que se pueden usar otros compuestos de PEG con estructuras similares a la amina PEG de 8 brazos para producir reticulantes a base de ácido borónico adecuados. Por ejemplo, cualquier PEG con brazos (por ejemplo, PEG con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, o 10 brazos) puede usarse para la presente invención. Por ejemplo, cualquier PEG en estrella (por ejemplo, PEG con 10-1000, preferiblemente 10-500, más preferiblemente, con 10-100 brazos) también se puede usar para la presente invención.

10 En una realización, el presente hidrogel a base de trehalosa puede producirse mediante una reacción de cualquier homopolímero o copolímero de trehalosa con un reticulante a base de ácido borónico. Cualquier homopolímero o copolímero de trehalosa, tal como los descritos en el documento WO 2013/112897, puede ser adecuado para la presente invención. Cualquier reticulante a base de ácido borónico que pueda sintetizarse de manera similar al Esquema 1 puede ser adecuado para la presente invención.

15 Un homopolímero o copolímero de trehalosa que puede usarse para la presente invención puede incluir cualquier compuesto polimérico a base de trehalosa. En una realización, el homopolímero o copolímero de trehalosa puede ser un polímero a base de PEG o un polímero de esqueleto de poliestirenilo o un polímero a base de polimetacrilato o un polímero a base de poli(N-isopropilacrilamida).

20 El Esquema 2 muestra la reacción de un homopolímero o copolímero de trehalosa ejemplar, poli(estirenil éter trehalosa) (poli(SET)) con un reticulante a base de ácido borónico ejemplar, ácido borónico PEG de 8 brazos, para formar hidrogel de poli(SET)-ácido borónico. El Ejemplo 1 incluye los materiales detallados y los procedimientos sintéticos para las reacciones en el Esquema 2.



Esquema 2

30 En una realización, el presente hidrogel a base de trehalosa puede sintetizarse en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la reacción entre un homopolímero o copolímero de trehalosa (por ejemplo, poli(estirenil éter trehalosa) (poli(SET))) y un reticulante a base de ácido borónico puede tener lugar en condiciones de pH neutro (por ejemplo, pH 7,4) y a temperatura ambiente. En una realización, la reacción se produce rápidamente, por ejemplo, en minutos.

35 En una realización, la relación de un homopolímero o copolímero de trehalosa con respecto a un reticulante a base de ácido borónico en la reacción es aproximadamente 1:1.

En una realización, el presente hidrogel a base de trehalosa puede responder a los entornos circundantes, por ejemplo, la presencia de glucosa.

5 Como se muestra en el Ejemplo 1, los Solicitantes demuestran que el hidrogel de poli(SET)-ácido borónico es sensible a la glucosa. La Figura 3 muestra que la adición de glucosa condujo a la desreticulación del enlace de éster borónico entre trehalosa (polímero) y ácido borónico (reticulante) mediante el reemplazo competitivo del complejo de glucosa-ácido borónico debido a la mayor afinidad de unión de la glucosa a ácido fenilborónico.

10 La Figura 4 muestra que, en presencia de glucosa, el hidrogel libera insulina más rápidamente. Por ejemplo, Después de una hora, el hidrogel en una solución de glucosa de 10 mg/ml se disolvió por completo para producir una liberación de insulina del 100 %, mientras que durante el mismo periodo de tiempo se liberaron el 80 % y el 49 % de insulina en 5 mg/ml y 0 mg/ml de solución de glucosa, respectivamente. Como tal, los Solicitantes demuestran que estos geles pueden utilizarse para aplicaciones de administración de insulina.

15 La Figura 5 muestra que el hidrogel de trehalosa sensible a glucosa es eficaz para estabilizar la insulina contra el estrés por calentamiento. Por ejemplo, los Solicitantes demuestran que los hidrogeles a base de trehalosa estabilizaron notablemente la insulina y se detectó el 63 % de la proteína original después del calentamiento a 90 °C durante 30 min. La insulina también se estabilizó parcialmente en presencia de ácido borónico PEG de 8 brazos en solitario (señal del 39 %). Como tal, los Solicitantes también demostraron que los hidrogeles a base de trehalosa se pueden utilizar para estabilizar la insulina.

20 En un aspecto, la presente invención divulga métodos para estabilizar y administrar una proteína (por ejemplo, una insulina o un estabilizador de pienso para animales) usando los hidrogeles a base de trehalosa como se ha analizado anteriormente.

25 En una realización, un método para estabilizar y administrar una proteína, que comprende las etapas de a) preparar un hidrogel a base de trehalosa de acuerdo con cualquier método como se divulga en el presente documento; b) añadir una proteína al hidrogel a base de trehalosa en el momento de la formación del hidrogel o después de la formación para formar un complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa; y c) añadir una solución de azúcar en el complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa, o reducir el pH de la solución para liberar la proteína del complejo.

30 En una realización, la presente invención se refiere a una composición y a un método de aplicaciones de un hidrogel a base de trehalosa como se analiza en el presente documento, que estabiliza notablemente las biomoléculas con respecto a factores estresantes ambientales mezclando una cantidad adecuada de un hidrogel a base de trehalosa con la biomolécula. En esta realización, no es necesaria la formación de enlaces químicos entre el hidrogel a base de trehalosa y la biomolécula. Los hidrogeles a base de trehalosa no están unidos covalentemente a la biomolécula, sino que se añaden como excipiente.

35 Una concentración adecuada del hidrogel a base de trehalosa puede ser 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 700 µg/ml, 900 µg/ml, 1 mg/ml, o 5 mg/ml, preferiblemente 100 µg/ml. Una relación adecuada de los polímeros o copolímeros con respecto a la biomolécula puede ser 1:1, 10:1, 20:1, 50:1, 100:1, o 200:1, y preferiblemente 50:1 o 100:1. En una realización, la relación preferida de los polímeros o copolímeros con respecto a la biomolécula puede ser 1:1.

40 En otro aspecto, la presente invención divulga métodos para preparar hidrogeles de trehalosa sensibles al pH. Dichos hidrogeles de trehalosa se pueden usar para "hidrogeles inteligentes", que responden a desencadenantes específicos, se pueden sintetizar para administrar y liberar medicamentos invitados en un sitio diana específico. En una realización, los hidrogeles de trehalosa no solo son vehículos de administración sino también estabilizadores contra los factores estresantes ambientales durante el almacenamiento y el transporte.

45 En una realización, los presentes hidrogeles de trehalosa sensibles al pH pueden producirse mediante polimerización de un monómero a base de trehalosa en presencia de un reticulante a base de trehalosa. En una realización, la reacción de polimerización es una polimerización por radicales libres o una polimerización iniciada por Redox.

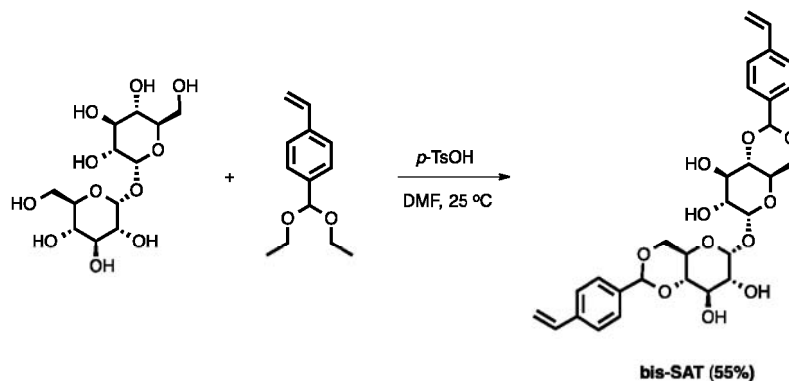
50 En una realización, un método para crear un hidrogel a base de trehalosa sensible al pH, que comprende los pasos de a) preparar un reticulante de trehalosa; b) preparar un monómero a base de trehalosa; y c) hacer reaccionar el reticulante de trehalosa con un monómero a base de trehalosa para formar el hidrogel a base de trehalosa.

55 En una realización, el reticulante de trehalosa se sintetiza usando métodos similares a los utilizados para preparar un monómero a base de trehalosa. La solicitud de patente anterior de los Solicitantes WO 2013/112897 divulgó muchos monómeros a base de trehalosa que pueden usarse para la presente invención.

60 El Esquema 3 muestra una reacción ejemplar. Los Solicitantes prevén que se pueden usar muchas relaciones entre el monómero de acetal y la trehalosa para producir el reticulante de trehalosa. En una realización específica, para

aumentar el rendimiento para el reticulante bifuncionalizado sobre el monómero, la relación molar entre acetal y trehalosa es mayor de uno. Por ejemplo, se añadieron 2,2 equivalentes molares de 4-vinilbenzaldehído dietil acetal a la trehalosa (Esquema 3). El reticulante bis-SAT se preparó a través de transacetalización con un alto rendimiento (entre el 55 % y el 72 %).

5



Esquema 3

En una realización, se prepara un monómero a base de trehalosa. La solicitud de patente anterior de los Solicitantes WO 2013/112897 divulgó muchos monómeros a base de trehalosa que pueden usarse para la presente invención.

10

En una realización específica, el reticulante de trehalosa se sintetiza usando una química idéntica a la que se usa para preparar el monómero a base de trehalosa. Por ejemplo, se pueden usar el monómero de estirenil acetal trehalosa (**SAT**) y el monómero de estirenil éter trehalosa (**SET**) para preparar el hidrogel a base de trehalosa sensible al pH.

15

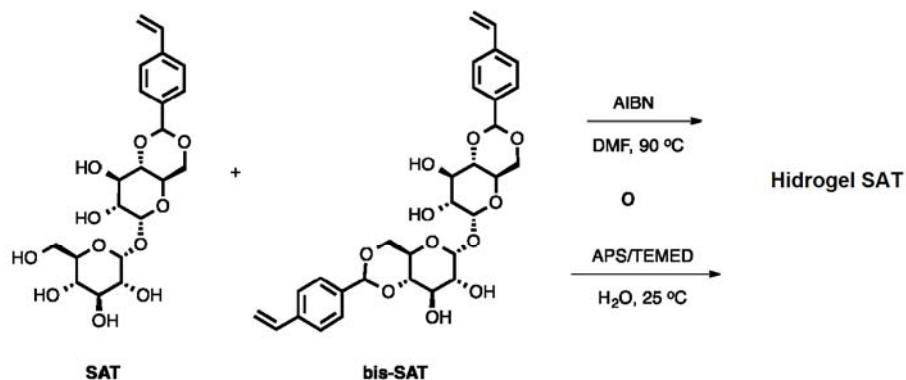
En una realización, el reticulante de trehalosa y el monómero a base de trehalosa pueden copolimerizarse en cualquier polimerización adecuada como aprecia un experto en la técnica. En una realización, el reticulante de trehalosa y el monómero a base de trehalosa pueden copolimerizarse a través de una polimerización por radicales libres. La polimerización por radicales libres puede iniciarse de muchas maneras, incluyendo calor, redox, luz, etc.

20

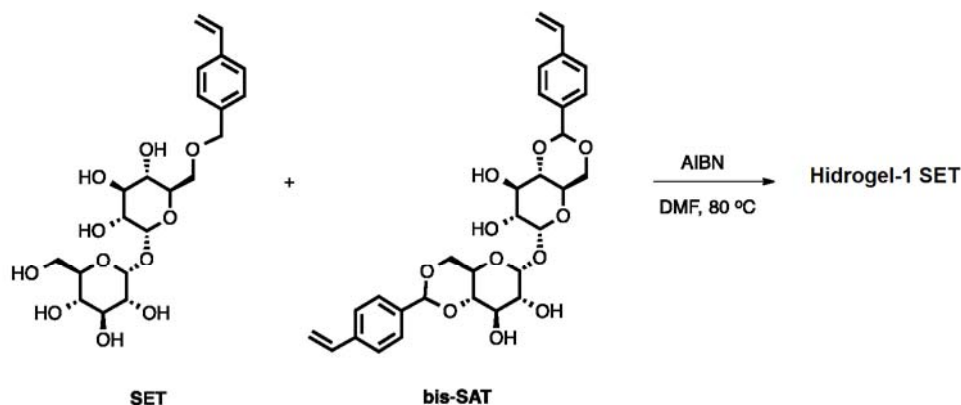
En una realización específica, el reticulante de trehalosa y el monómero a base de trehalosa pueden copolimerizarse a través de una polimerización por radicales libres iniciada por calor o una polimerización por radicales libres iniciada por redox, o polimerización por radicales libres fotoiniciada.

25

Por ejemplo, como se muestra en los Esquemas 4 y 5, el reticulante **bis-SAT** puede copolimerizarse para formar hidrogeles tanto SAT como SET a través de polimerización por radicales libres iniciada por calor o iniciada por redox. El Ejemplo 2 describe los procedimientos sintéticos detallados de las reacciones.



Esquema 4



Esquema 5

En una realización, los hidrogeles de trehalosa sensibles al pH pueden ser tanto vehículos de administración de proteínas como estabilizadores de proteínas, por ejemplo, contra factores estresantes ambientales durante el almacenamiento y el transporte.

En una realización específica, los hidrogeles de trehalosa sensibles al pH pueden permanecer gelificados en soluciones cuando el pH es mayor de 5. En otra realización, los hidrogeles de trehalosa sensibles al pH se disuelven en la solución cuando el pH es menor de 5.

El Ejemplo 2 muestra hidrogeles de trehalosa sensibles al pH ejemplares y sus propiedades. Por ejemplo, la Figura 9 muestra poli(SAT) como un hidrogel de trehalosa sensible al pH ejemplar. Como se muestra en la Figura 9, se disolvió poli(SAT) en una serie de pH ácidos para inducir la hidrólisis del enlace de acetal entre la trehalosa y el resto colgante en el esqueleto del polímero. Cuando el polímero se trató con TFA al 10 %, los picos de ^1H RMN correspondientes a los protones de trehalosa (Figura 9; arriba; 3,0-5,5 ppm) desaparecieron y se hizo visible un pico de aldehído. El espectro de ^1H RMN del polímero resultante parecía idéntico a la traza esperada para un polímero de 4-benzaldehído (Figura 9; abajo).

La Figura 10 muestra otro hidrogel de trehalosa sensible al pH ejemplar de hidrogel-1 SET y su propiedad. Aunque que el hidrogel de **poli(SAT)** no se disolvería en tampón acuoso, el **hidrogel-1 SET** en TFA al 10 % se disolvió completamente en 3 min. El gel permaneció tanto a pH 7,4 como a pH 5, incluso después de 48 h de incubación a 25 °C, lo que sugiere que se requiere un pH bajo para revertir el enlace del reticulante acetal.

En una realización, el presente hidrogel de trehalosa sensible al pH puede usarse como vehículos para la administración de proteínas o péptidos terapéuticos al estómago o estabilizadores para enzimas usadas en síntesis química activada por ácido y purificación de agua.

En una realización, la proteína se puede añadir antes de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la proteína se puede añadir durante la preparación de hidrogeles a base de trehalosa. En una realización, la proteína se puede añadir después de la preparación de hidrogeles a base de trehalosa.

En una realización, la proteína puede ser una enzima.

En una realización, la proteína se estabiliza cuando se expone al calor. En una realización, la proteína se estabiliza por encima de 4 °C. En una realización preferida, la proteína se estabiliza a 70-90 °C.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de hidrogel basado en el disacárido trehalosa natural como un excipiente eficiente para mejorar la termoestabilidad de las proteínas. En una realización, el hidrogel de trehalosa puede prepararse en solo dos etapas a partir de trehalosa usando etapas de purificación simples, que pueden aplicarse directamente industrialmente para la estabilización de proteínas.

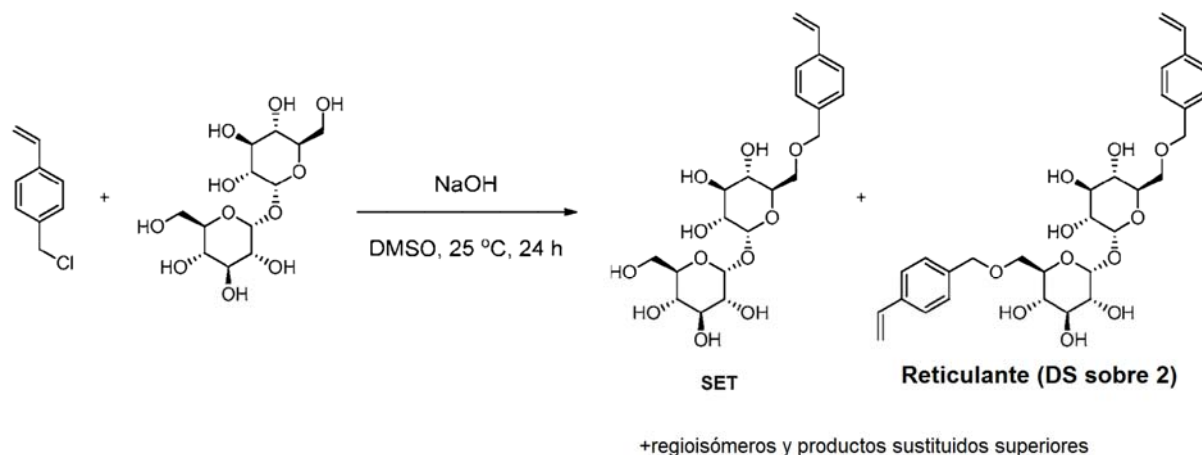
En una realización, un método para crear un hidrogel a base de trehalosa, que comprende las etapas de a) preparar reticulantes de trehalosa y un monómero a base de trehalosa; y b) hacer reaccionar el reticulante de trehalosa con el monómero a base de trehalosa para formar el hidrogel a base de trehalosa.

En una realización, los reticulantes de trehalosa y un monómero a base de trehalosa se producen a través de la misma reacción. En una realización, los reticulantes de trehalosa pueden incluir disustituciones y cualquier otro compuesto

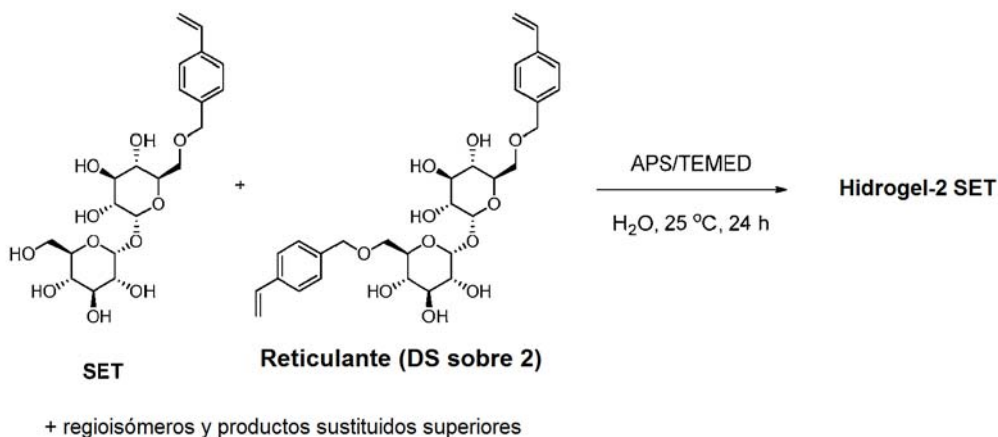
que tenga un grado de sustitución (DS) sobre dos.

En una realización, los reticulantes de trehalosa y un monómero a base de trehalosa producido a partir de la misma reacción pueden no purificarse. La mezcla de reacción que incluye los reticulantes de trehalosa y un monómero a base de trehalosa puede usarse directamente para la gelificación.

En una realización, un hidrogel a base de trehalosa puede incluir una síntesis de un solo paso. Específicamente, los reticulantes de trehalosa y un monómero a base de trehalosa pueden producirse a partir de una reacción de un solo paso.



Esquema 6



Esquema 7

Los Esquemas 6 y 7 muestran una reacción ejemplar para preparar hidrogeles a base de trehalosa a través de una síntesis de un solo paso. El Ejemplo 3 muestra el procedimiento sintético detallado para producir hidrogeles a base de trehalosa. Aunque se usó un monómero a base de estireno como ejemplo, la presente invención es aplicable a otros monómeros como aprecia un experto en la técnica. Por ejemplo, también pueden usarse metacrilatos en la presente invención.

Como se muestra en el Esquema 6, se pueden producir tanto un monómero a base de trehalosa (por ejemplo, SET) como reticulantes de trehalosa a partir de una reacción de un solo paso. En una realización, la mezcla en bruto resultante de un monómero a base de trehalosa (por ejemplo, SET) y los reticulantes de trehalosa puede precipitarse en diclorometano (DCM) y filtrarse para eliminar DMSO y trehalosa con un alto DS.

En una realización, el producto en bruto de la mezcla puede contener varios regioisómeros (por ejemplo, trehalosa

con estireno en la 2ª, 3ª, 4ª y 6ª posición), trehalosa bisfuncionalizada y trifuncionalizada, así como trehalosa no modificada. La SET en bruto se puede usar directamente para la gelificación.

En una realización, los hidrogeles a base de trehalosa muestran una fracción sustancial de los poros que tienen dimensiones entre 1 nm y 10 µm, preferiblemente, 1-5 µm.

En una realización, los hidrogeles a base de trehalosa pueden estabilizar biomoléculas (por ejemplo, enzima o fitasa) frente a condiciones de calor extremo. Como se muestra en la Figura 17, los resultados muestran la síntesis de un hidrogel de trehalosa para la estabilización de proteínas a escala industrial. El hidrogel a base de trehalosa se puede preparar mediante síntesis simples y etapas de purificación, lo cual es una consideración importante en los procesos industriales.

En una realización, los hidrogeles a base de trehalosa pueden usarse para estabilizar diversas enzimas o proteínas frente al procedimiento de granulación u otros procesos a alta temperatura.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para estabilizar una proteína, que comprende las etapas de a) preparar un hidrogel a base de trehalosa de acuerdo con cualquier método como se ha analizado anteriormente; y b) añadir una proteína al hidrogel a base de trehalosa en el momento de la formación del hidrogel o después de la formación para formar un complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa, en el que la proteína se estabiliza.

En una realización, la proteína es una enzima.

En una realización, la proteína se estabiliza en presencia de calor. El presente método puede estabilizar una proteína cuando se expone al calor.

En una realización, la proteína se estabiliza por encima de 4 °C. En una realización, la proteína se estabiliza a 70-90 °C.

En una realización, la proteína se libera del complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa por dilución con agua. En una realización, la proteína se libera del complejo de la proteína y del hidrogel a base de trehalosa disminuyendo el valor de pH de la solución.

Ejemplos

Ejemplo 1

Hidrogeles de trehalosa para la estabilización y administración de proteínas

Materiales

Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich y Fisher Scientific. La amina PEG de 8 brazos se adquirió en Jenkem Technology (Allen, TX). La trehalosa se adquirió en The Healthy Essential Management Corporation (Houston, TX), se secó con etanol y se mantuvo al vacío antes de su uso. Se recristalizó azobisisobutironitrilo (AIBN) en acetona antes de su uso. El monómero de estirenil éter trehalosa (**SET**) se preparó utilizando procedimientos previamente informados (Lee et al., 2013).

Técnicas analíticas

Se obtuvieron espectros de RMN en espectrómetros Bruker DRX 500 MHz. Los espectros de ¹H RMN se adquirieron con un retraso de relajación de 30 s para los polímeros.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker DRX 500 MHz. La cromatografía de permeación en gel (GPC) se realizó en un sistema HPLC Shimadzu equipado con un detector de índice de refracción RID-10A y dos columnas D mixtas de 5 µm de Polymer Laboratories PLgel (con columna de protección). Se usó bromuro de litio (0,1 M) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) a 40 °C como disolvente (caudal: 0,6 ml/min). Se emplearon patrones de poli(metacrilato de metilo) casi monodispersos (Polymer Laboratories) para la calibración. Los espectros infrarrojos se obtuvieron con un instrumento Perkin-Elmer Spectrum One equipado con un accesorio universal ATR. El análisis por HPLC de fase inversa preparativa se realizó en un sistema de HPLC Shimadzu equipado con un detector UV usando una columna Luna 5 µm C18 100A (preparativa: 5 µm, 250 × 21,2 mm) con monitorización a λ = 215 nm y 254 nm. Se usó un sistema de disolvente isocrático (agua:metanol = 50:50) como fase móvil a una velocidad de flujo de 10 ml/min. La medición de fluorescencia se realizó en una FlexStation II (Molecular Devices). La absorbancia de UV-Vis se midió usando un lector de microplacas ELx800 (BioTek Instruments, Winooski, VT).

Métodos

Síntesis del polímero de trehalosa. Se disolvieron AIBN (5,28 mg, $3,22 \times 10^{-2}$ mmol) y monómero de estirenil éter trehalosa (634 mg, 1,38 mmol) en una mezcla de DMF (2,31 ml) y H₂O (4,61 ml). Se eliminó el oxígeno mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y se inició la polimerización a 75 °C. La polimerización se detuvo después de 8,5 h sumergiendo la reacción en nitrógeno líquido. El polímero se purificó por diálisis contra H₂O (MWCO 3.500), dando como resultado un polímero con $M_n = 7,0$ kDa y $\bar{D} = 1,28$ (para el experimento de disolución de hidrogel) y $M_n = 7,6$ kDa y $\bar{D} = 1,33$ (para todos los demás experimentos). ¹H RMN (500 MHz en D₂O) δ : 7,01, 6,45, 5,05, 3,81, 3,71, 3,59, 3,48, 3,36, 1,50.

Síntesis de poli(estirenil éter trehalosa) (poli(SET)). Se disolvieron AIBN (5,28 mg, $3,22 \times 10^{-2}$ mmol) y SET (634 mg, 1,38 mmol) en una mezcla de DMF (2,31 ml) y H₂O (4,61 ml). Se eliminó el oxígeno mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y se inició la polimerización a 75 °C. La polimerización se detuvo después de 8,5 h sumergiendo la reacción en nitrógeno líquido. El polímero se purificó por diálisis contra H₂O (MWCO 3.500), dando como resultado un polímero con M_n de 7,0 kDa y PDI de 1,28. ¹H RMN (500 MHz en D₂O) δ : 7,01, 6,45, 5,05, 3,81, 3,71, 3,59, 3,48, 3,36, 1,50.

Síntesis de ácido borónico PEG de 8 brazos. Se disolvieron amina PEG de 8 brazos (400 mg, 10×10^{-2} mmol) y ácido 4-formil borónico (96 mg, $6,40 \times 10^{-1}$ mmol) en 2,8 ml de MeOH. Se añadió NaBH₃CN (18,85 mg, $3,00 \times 10^{-1}$ mmol) y la reacción se agitó a 25 °C. Después de 5 días, la solución de reacción se purificó por diálisis contra MeOH durante 2 días y H₂O durante 2 días. La muestra se liofilizó y el análisis de ¹H RMN mostró una modificación del 100 % de grupos terminales amina en el PEG. ¹H RMN (500 MHz en D₂O) δ : 7,75 (16H), 7,41 (16H), 4,14, 3,69, 3,18 (908H). IR: $\delta = 3390, 2869, 1699, 1456, 1410, 1348, 1297, 1247, 1079, 1041, 986, 947, 839$ cm⁻¹.

Síntesis de hidrogel de poli(SET)-ácido borónico. Se disolvieron poli(SET) y ácido borónico PEG de 8 brazos (10 kDa) en tampón D-PBS a pH 7,4 a concentraciones de 500 mg/ml y 200 mg/ml, respectivamente. Se mezclaron 3 μ l de una solución de poli(SET) y 20,5 μ l de una solución de PEG amina de 8 brazos (1 : 1 = unidad de trehalosa: unidad de ácido borónico) para dar como resultado en el hidrogel.

Estudio de sensibilidad a la glucosa. Se sumergieron quince hidrogeles de poli(SET)-ácido borónico preparados por separado en 150 μ l de tampón D-PBS a pH 7,4 durante 1 h. Los hidrogeles se secaron al aire durante 15 min y sus pesos se midieron. Después, cada uno de los hidrogeles se sumergió en 150 μ l de tampón D-PBS a pH 7,4, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 20 mg/ml de solución de glucosa en tampón D-PBS a pH 7,4 (tres hidrogeles por condición). Cada punto temporal se recogió mediante secado al aire de hidrogeles durante 15 min y pesando los hidrogeles secos.

Cinética de disolución de hidrogel. El polímero de trehalosa (500 mg/ml) y las soluciones madre de reticulante de PEG (200 mg/ml) se prepararon en D-PBS, pH 7,4. Los geles se prepararon mediante la adición de 3 μ l de la solución madre de polímero de trehalosa y 20,5 μ l de la solución madre de reticulante PEG e incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los geles se hidrataron en D-PBS durante 1 h, y después se transfirieron a 5 ml de D-PBS que contenía 0, 1, 5, 10 o 20 mg/ml de glucosa. En cada punto temporal, los geles se pesaron y después se reemplazaron en tampones respectivos.

Etiquetado FITC de insulina. La insulina se marcó con isómero de isotiocianato de fluoresceína I (FITC) disolviendo insulina (FITC) disolvieron insulina (0,65 mg, 0,112 μ mol) y FITC (3,48 mg, 8,94 μ mol) en 0,33 ml de tampón de bicarbonato sódico 1 M, pH 8,3. La mezcla se agitó durante dos horas, y el FITC libre se eliminó mediante centrifugación repetida a través de una membrana usando tubos Centriprep™ con un corte de peso molecular (MWCO) de 3.000 Da. El grado típico de etiquetado fue de aproximadamente 0,7 FITC por insulina según se determinó por la absorbancia UV (Schreiber y Haimovich, 1983).

Preparación de reticulante de ácido borónico e hidrogeles de trehalosa

El reticulante de ácido borónico se sintetizó mediante aminación reductora, usando ácido 4-formil borónico y amina PEG de 8 brazos como materiales de partida (Esquema 1). La modificación completa de las aminas PEG de 8 brazos con ácido fenilborónico se confirmó mediante espectroscopía de ¹H RMN (Figura 1).

Después, se mezcló ácido borónico PEG de 8 brazos con poli(SET) en una relación de unidad de ácido borónico con respecto a trehalosa 1:1 (Esquema 2). La gelificación tuvo lugar rápidamente en 3 min (Figura 2).

Liberación de insulina marcada con FITC a partir de hidrogel de trehalosa. Se añadió insulina marcada con FITC (13,22 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS, pH 7,4 o pH 8) al polímero de trehalosa para obtener una concentración de polímero de 500 mg/ml. El reticulante PEG se disolvió en D-PBS a una concentración de 200 mg/ml. A continuación, se añadieron 1 μ l del polímero de trehalosa y una solución madre de insulina marcada con FITC y 6,84 μ l de la solución madre de reticulante PEG a un tubo de centrifuga Eppendorf Lo-Bind®. El tubo se agitó en un ThermoShaker (Allsheng Instruments, China) a 1.500 rpm a 21 °C durante 1 h. Los geles se transfirieron a una placa de 24 pocillos llena con 1 ml de D-PBS y se dejaron hidratar durante 30 min. A continuación, los geles se transfirieron a una placa de 96 pocillos que se había bloqueado con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % p/vol en D-PBS para evitar la adsorción de proteínas y se llenó con 0,3 ml de D-PBS que contenía 0, 5 o 10 mg/ml de

glucosa. En cada punto temporal, toda la solución se dividió en alícuotas y los pocillos que contenían los geles se rellenaron inmediatamente con 0,3 ml del mismo tampón. Después del último punto temporal, los pocillos se trataron con 0,3 ml de D-PBS que contenía 100 mg/ml de glucosa y se incubaron a 37 °C durante 5 min para disolver completamente los geles. Después, se transfirió toda la solución para la medición, y se midió la fluorescencia de las alícuotas de los puntos temporales y las soluciones de insulina residual se recuperaron después de la disolución del gel.

Ensayo de calentamiento de hidrogel de trehalosa. La solución madre de insulina se preparó disolviendo primero la insulina en D-PBS, pH 7,4 a una concentración de 1 mg/ml, y después se concentró por centrifugación a través de una membrana usando tubos Centriprep™ con corte de peso molecular (MWCO) de 3000 Da. La concentración de proteína se cuantificó por absorbancia UV a 280 nm, y la solución se diluyó a 3,93 mg/ml de modo que la concentración final de insulina en las muestras fue de 0,5 mg/ml. La solución madre de polímero de trehalosa se preparó disolviendo el polímero de trehalosa en la solución madre de insulina a una concentración de 500 mg/ml. El reticulante PEG se disolvió en D-PBS a una concentración de 200 mg/ml. Los geles se prepararon añadiendo 1 µl de solución madre de polímero de insulina o trehalosa y 6,84 µl de solución madre de reticulante PEG o D-PBS a un tubo de centrifuga Eppendorf Lo-Bind®, y agitando el tubo en un ThermoShaker a 1.500 rpm a 21 °C durante 1 h para ayudar en la mezcla. Las muestras se calentaron a 90 °C durante 30 min y los controles se mantuvieron a 4 °C. Todas las muestras se trataron con 1 ml de 100 mg/ml de glucosa para disolver el hidrogel. La cantidad de insulina se analizó mediante ELISA, que se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 25 µl de las muestras diluidas a los pocillos recubiertos previamente con el anticuerpo de captura. Se añadió anticuerpo de detección que contenía tampón (100 µl), y la placa se incubó en un agitador a temperatura ambiente durante 1 h. Para evitar la unión del ácido bórico residual a los restos de azúcar en la peroxidasa de rábano picante utilizada para ELISA, se lavaron los pocillos 3-4 veces con 350 µl de agua desionizada acidificada con HCl (pH = 3,5) cinco veces después de la incubación, y después seis veces con 350 µl del tampón de lavado. Estas etapas de lavado adicionales no afectan a los resultados de ELISA según lo confirmado por los controles. Se añadió una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (200 µl), y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 min antes de la adición de 50 µl de solución de detención. La cantidad de insulina detectada se cuantificó por absorbancia a 450 nm en relación con los estándares suministrados por el fabricante.

Análisis estadístico. La prueba t de Student de una cola, suponiendo una varianza de muestra desigual, se usó para probar la diferencia entre los grupos experimentales. Los resultados se consideraron significativamente diferentes si $p < 0,05$.

Estudio de sensibilidad a la glucosa del hidrogel de poli(SET)- ácido borónico

Después, el **hidrogel de poli(SET)-ácido borónico** preparado se ensayó para determinar la sensibilidad a la glucosa. Dado que se espera que el enlace de éster borónico del complejo de trehalosa-ácido bórico tenga una afinidad de unión significativamente más débil que la de glucosa-ácido borónico (Nagai et al., 1993; Vandenberg et al., 1994), la glucosa debería reemplazar al enlace de éster borónico entre el polímero de trehalosa y el reticulante de ácido borónico. Esto eliminaría la desreticulación de las cadenas de polímero y el reticulante de ácido borónico invirtiendo el hidrogel. Dado que el polímero y el reticulante son todos solubles en agua y, por lo tanto, pueden difundirse en el tampón, el hidrogel debería perder peso durante este proceso. Como se muestra en la Figura 3, el hidrogel perdió el 34 % de su peso original después de sumergir el gel en tampón D-PBS a pH 7,4. Esto puede deberse a la difusión de polímero no reticulado o reticulante a partir del hidrogel. Sin embargo, cuando los hidrogeles se colocaron en el tampón con glucosa, su pérdida de peso fue claramente más rápida. Hubo una clara tendencia de que las soluciones de glucosa de mayor concentración desreticularon el hidrogel más rápidamente. Los pesos de los hidrogeles sumergidos en soluciones de glucosa de 10 mg/ml y 20 mg/ml no pudieron medirse después de 10 minutos porque se habían disueltos en la solución, mientras que los hidrogeles en soluciones de glucosa de 1 mg/ml y 5 mg/ml todavía eran geles a los 10 minutos.

Análisis. Hasta la fecha, aún no se han informado hidrogeles que usen la unión de trehalosa y ácido borónico. Los datos anteriores sugieren que los hidrogeles pueden prepararse utilizando un enlace de éster borónico entre los polímeros de trehalosa informados previamente y un PEG de múltiples brazos funcionalizado con ácido fenilborónico. La gelificación fue rápida en condiciones fisiológicas (pH 7,4). Además, el hidrogel resultante era sensible a la glucosa. La adición de glucosa condujo a la desreticulación del enlace de éster borónico entre trehalosa (polímero) y ácido borónico (reticulante) mediante el reemplazo competitivo del complejo de glucosa-ácido borónico debido a la mayor afinidad de unión de la glucosa a ácido fenilborónico. Como cabía esperar, los tampones de concentración de glucosa más altos aumentaron la velocidad de disolución del hidrogel. Esto sugiere que estos geles podrían utilizarse para aplicaciones de administración de insulina. De hecho, el trabajo futuro implicará estudios de estabilización y liberación de insulina de estos geles.

Conclusión. En el presente documento, se ha descrito la preparación de un hidrogel usando un polímero de cadena lateral de trehalosa y PEG funcionalizado con ácido borónico de 8 brazos. En una relación 1:1 de unidad de trehalosa con respecto a unidad de ácido borónico, el hidrogel se formó en 3 minutos. Al medir la pérdida de peso de los hidrogeles después de la incubación en diversas condiciones, se observó la deformación del hidrogel como se esperaba. Cuanto mayor es la concentración de glucosa, más rápido se disuelve el hidrogel. Se espera que este

hidrogel a base de trehalosa se pueda usar para la administración eficaz de insulina *in vivo* sensible a la glucosa, con la ventaja de usar el polímero de trehalosa como un estabilizador de insulina durante el almacenamiento antes del uso.

5 Hidrogel de trehalosa sensible a la glucosa para la estabilización y administración de insulina

El grupo ha demostrado previamente que los glucopolímeros de trehalosa son estabilizadores eficaces para las proteínas contra la liofilización y el calor, ya sea como conjugados o como excipientes (Lee et al., 2013; Mancini et al., 2012). Se presume que el glucopolímero de trehalosa, denominado PolyProtek™, podría usarse para atrapar la insulina formando complejos con un reticulante de ácido borónico y que el hidrogel resultante también estabilizaría la insulina contra los factores estresantes ambientales. Para probar esta hipótesis, se sintetizó un reticulante de ácido borónico a través de aminación reductora, usando ácido 4-formilfenilborónico y amina PEG de 8 brazos como materiales de partida (Esquema 1). La modificación completa de los grupos terminales amina con ácido fenilborónico se confirmó mediante espectroscopía de ¹H RMN (Figura 1; abajo). A continuación, el hidrogel de trehalosa se preparó mezclando el ácido borónico PEG de 8 brazos con poli(estirenil éter trehalosa) (PoliSET) a una relación molar 1:1 de ácido borónico con respecto a unidades de trehalosa (Esquema 2) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS). La gelificación tuvo lugar instantáneamente después de mezclar las soluciones de los dos componentes (Figura 2 para imágenes de los hidrogeles).

El hidrogel de éster borónico PoliSET preparado se probó entonces para determinar la capacidad de respuesta a la glucosa. Hay algunos informes de que la trehalosa no forma complejos con los ácidos borónicos (Nagai et al., 1993; Stones et al., 2004). Sin embargo, se ha observado la unión de trehalosa-ácido borónico para conjugados multivalentes de ácido borónico-ADN (Hargrove et al., 2011), y se midió que la constante de asociación del ácido bórico con trehalosa es menor que la glucosa (Van den Berg et al., 1994). Aunque la asociación débil de la trehalosa con el ácido borónico generalmente ha limitado su utilidad en aplicaciones de detección de azúcar (James et al., 1996), se prevé que la débil afinidad puede usarse ventajosamente para el desplazamiento rápido del polímero de trehalosa por glucosa para disolver el hidrogel y liberar insulina. Para probar esto, se controló la cinética de la disolución del hidrogel midiendo el peso del hidrogel tras la adición de glucosa.

Como se muestra en la Figura 3, cuando los hidrogeles se colocaron en el tampón que contenía glucosa, la tasa de porcentaje de pérdida de peso fue significativamente más rápida con el aumento de la concentración de glucosa. Los pesos de los hidrogeles sumergidos en soluciones de glucosa de 10 y 20 mg/ml no pudieron medirse después de 10 minutos porque los hidrogeles se habían disuelto completamente y no eran detectables en la solución, mientras que los hidrogeles en soluciones de glucosa de 1 mg/ml y 5 mg/ml seguían intactos después de 60 min. Se observó una pérdida de peso de aproximadamente el 34 % después de sumergir el gel en D-PBS sin glucosa durante 60 minutos. Dado que el enlace de éster de boronato está en equilibrio dinámico y el enlace a la trehalosa es débil (Van den Berg et al., 1994), el polímero de trehalosa puede difundirse lentamente desde la superficie del hidrogel incluso en ausencia de glucosa. Sin embargo, con la adición de glucosa, la pérdida de peso se aceleró notablemente, lo que demuestra la capacidad de respuesta a la glucosa de los geles.

Para probar la liberación de insulina tras la adición de glucosa, los hidrogeles de ácido borónico PoliSET se prepararon en presencia de insulina marcada con FITC (Figura 2b). El ácido borónico PEG de 8 brazos se disolvió en un tampón que contenía insulina marcada con FITC y se mezcló con PoliSET para preparar insulina, y estos hidrogeles se añadieron a D-PBS que contenía 0, 5 y 10 mg/ml de glucosa a un pH fisiológico (pH 7,4). Se tomaron alícuotas de las soluciones en cada punto temporal y se cuantificó la liberación de insulina (Figura 4). Al igual que con el experimento de disolución de gel, en presencia de glucosa, el hidrogel liberó insulina más rápidamente. Después de una hora, el hidrogel en una solución de glucosa de 10 mg/ml se disolvió por completo para producir una liberación de insulina del 100 %, mientras que durante el mismo periodo de tiempo se liberaron el 80 % y el 49 % de insulina en 5 mg/ml y 0 mg/ml de solución de glucosa, respectivamente. También, la liberación de insulina en el tampón básico (pH 8,0) fue más lenta para todas las condiciones (Figura 6), lo que sugiere que el pKa de ácido borónico puede adaptarse según se desee para una administración de insulina más rápida o retardada. Esto ha sido aprovechado en otro sistema (Matsumoto et al., 2012; Roy et al., 2009).

A continuación, se probó la capacidad del hidrogel de trehalosa para estabilizar la insulina contra el calentamiento. Las soluciones de insulina se prepararon por separado sin ningún aditivo, con PoliSET, con ácido borónico PEG de 8 brazos, y con el hidrogel de trehalosa. Las muestras se calentaron durante 30 min a 90 °C para acelerar la degradación y después se analizaron con ELISA de insulina para confirmar la integridad estructural de la insulina. Un grupo de control con insulina y el hidrogel de trehalosa almacenado a 4 °C demostró que el hidrogel no afectó a los resultados del ELISA (Figura 5).

Los datos muestran que el hidrogel de trehalosa sensible a glucosa es eficaz para estabilizar la insulina contra el estrés por calentamiento (Figura 5). La insulina sin ningún aditivo sufrió degradación y ya no se unió al anticuerpo tras calentarse y mostró menos del 2 % de señal por ELISA. Se detectó significativamente más insulina en presencia de aditivos. PoliSET estabilizó notablemente la insulina y se detectó el 63 % de la proteína original después del calentamiento a 90 °C durante 30 min. La insulina también se estabilizó parcialmente en presencia de ácido borónico PEG de 8 brazos en solitario (señal del 39 %). La bibliografía está dividida sobre el efecto del PEG sobre la estabilidad

de la proteína; se ha sugerido que el PEG puede acelerar la desnaturalización de la proteína a temperaturas más altas debido a la interacción del PEG hidrófobo con el estado desnaturalizado de la proteína (Lee y Lee, 1987; Senske et al., 2014). Sin embargo, la arquitectura específica del polímero PEG puede determinar si el PEG estabiliza o desestabiliza las proteínas. Por ejemplo, Amirgoulova et al. han informado que el PEG lineal interactúa con el estado desnaturalizado de una proteína para favorecer el despliegue, y en su lugar utiliza PEG en forma de estrella para sus aplicaciones de recubrimiento de superficie (Amirgoulova et al., 2004). La combinación tanto de poli(SET) como PEG ramificado como hidrogel dio como resultado una estabilización del 74 %, significativamente mejor que el ácido borónico PEG de 8 brazos ($p < 0,01$) y similar al poli(SET) en solitario. Estos resultados sugieren que aunque el poli(SET) está parcialmente unido al ácido borónico PEG de 8 brazos en el gel, las propiedades estabilizadoras se mantienen.

En resumen, se ha sintetizado un hidrogel sensible a la glucosa basado en un glucopolímero de trehalosa para la administración de insulina. Los resultados demuestran que los hidrogeles pueden prepararse fácilmente a partir de polímeros de trehalosa y reticulantes de ácido borónico. La gelificación se produjo en condiciones fisiológicas de pH, y el hidrogel resultante fue capaz de liberar insulina de manera sensible a la glucosa. La adición de glucosa condujo a la ruptura del enlace de éster de boronato entre el polímero de trehalosa y el reticulante de ácido borónico a través del desplazamiento competitivo por glucosa, que tiene una mayor afinidad de unión a ácido borónico (Van den Berg et al., 1994). Como cabía esperar, una mayor concentración de glucosa en el tampón aumentó la velocidad de disolución del hidrogel y dio como resultado una liberación más rápida de insulina cargada. Adicionalmente, el hidrogel de trehalosa puede proteger eficazmente la insulina contra el estrés por calor extremo. Dado que la mayor parte de los fármacos proteicos deben almacenarse a temperatura regulada para mantener sus actividades, los hidrogeles de trehalosa en general pueden usarse para mejorar la calidad de vida de los pacientes al no requerir refrigeración especializada. Además, dado que el ácido borónico se ha utilizado para crear materiales sensibles al pH (Roy et al., 2009), los hidrogeles de trehalosa-ácido borónico pueden tener aplicaciones potenciales como agente de administración de fármacos contra el cáncer para liberar el fármaco a un pH extracelular ácido cerca de los tumores (Lee et al., 2008).

Ejemplo 2

Hidrogeles de trehalosa sensibles a pH

Los solicitantes proponen un hidrogel único sensible al pH basado en trehalosa. Hasta donde se sabe, no se ha informado de hidrogel sensible al pH basado en trehalosa. La trehalosa generalmente se considera segura por la US Federal Drug Administration (FDA) y actúa como un estabilizador natural para las células y proteínas en los organismos, lo que la convierte en un candidato perfecto para la síntesis de hidrogel para uso biomédico (Teramoto et al., 2008). Ya se ha informado que los glucopolímeros de cadena lateral de trehalosa ayudan a mantener la actividad proteica contra el calor y la liofilización (Mancini et al., 2012; Lee et al., 2013). Por lo tanto, se espera que los hidrogeles de trehalosa actúen no solo como un vehículo de administración sino también como estabilizadores contra los factores estresantes ambientales durante el almacenamiento y el transporte. Para la síntesis de hidrogel, se sintetizó un reticulante mediante trehalosa de bifuncionalización con un grupo de estirenilo polimerizable con una unión de acetal escindible con ácido. Los hidrogeles a base de trehalosa se prepararon usando tanto radicales libres como polimerización redox. La solubilidad del hidrogel se probó en diferentes soluciones acuosas de pH. El hidrogel permaneció gelificado en soluciones mayores de pH 5 y se disolvió en TFA al 10 %.

Materiales

Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich y Fisher Scientific y se usaron sin purificación a menos que se indique de otro modo. La trehalosa se adquirió en The Healthy Essential Management Corporation (Houston, TX), se secó con etanol y se mantuvo al vacío antes de su uso. Se recrystalizó azobisisobutironitrilo (AIBN) en acetona antes de su uso. Se prepararon 4-vinilbenzaldehído dietil acetal, monómero de estirenil acetal trehalosa (**SAT**), monómero de estirenil éter trehalosa (**SET**), y **poli(SAT)** usando los procedimientos informados previamente como se ha analizado anteriormente (Mancini et al., 2012; Lee et al., 2013).

Técnicas analíticas

Se obtuvieron espectros de RMN en espectrómetros Bruker AV 500 y DRX 500 MHz. Los espectros de ^1H RMN se adquirieron con un retraso de relajación de 2 s para moléculas pequeñas y 30 s para polímeros. Los espectros de absorción infrarroja se registraron usando un PerkinElmer FT-IR equipado con un accesorio ATR. Los datos de ESI-MS se recopilaron en un premier Waters LCT con ACQUITY LC.

Síntesis de reticulante bis-estirenil acetal trehalosa (bis-SAT). En el matraz de reacción secado a la llama, se añadieron trehalosa (398 mg, 1,16 mmol) y DMF (4 ml). Se añadió p-TsOH (7,08 mg, $3,72 \times 10^{-2}$ mmol) y la reacción se agitó durante 10 min sumergida en un baño de aceite a 100 °C. A la reacción se le añadió lentamente 4-vinilbenzaldehído dietil acetal (600 mg, 2,91 mmol) y la reacción se agitó a 100 °C durante 2 h. Una vez completada la reacción, se eliminó el 80 % de DMF al vacío y la solución restante precipitó en benceno. El precipitado se filtró con NaHCO_3 saturado y se lavó ampliamente con H_2O . La torta del filtro se recogió y se recrystalizó en EtOH: H_2O = 2:1

dando como resultado 478,5 mg de polvo de color blanco con un rendimiento del 72 %. ^1H RMN (500 MHz en D_6DMSO) δ : 7,48-7,44 (m, 8H), 6,80-6,74 (m, 2H), 5,84-5,81 (d, $J = 18,15$ Hz, 2H), 5,56 (s, 2H), 5,29-5,27 (d, $J = 10,37$ Hz, 2H), 5,10-5,09 (m, 2H), 4,19-4,16 (m, 2H), 4,00-3,97 (m, 2H), 3,93-3,89 (m, 2H), 3,72-3,68 (t, $J = 10,81$ Hz, 2H), 3,58-3,53 (m, 2H), 3,47-3,44 (m, 4H), 3,32-3,30 (m, 2H). ESI-MS ($\pm 1,0$) observado (predicho): $\text{H}^+ 571,22$ (571,22).

Preparación de hidrogel SAT a través de polimerización por radicales libres. Se disolvieron **SAT** (200 mg, $4,38 \times 10^{-1}$ mmol), **bis-SAT** (13,16 mg, $2,31 \times 10^{-2}$ mmol), y AIBN (0,72 mg, $4,38 \times 10^{-3}$ mmol) en 1 ml de DMF. Se eliminó el oxígeno mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y se inició la polimerización sumergiendo el matraz de reacción en un baño de aceite a 90 °C. En 30 min, el gel comenzó a formarse y la reacción se detuvo después de 6 h sumergiendo el matraz de reacción en nitrógeno líquido. El gel se lavó con H_2O y MeOH para eliminar el monómero sin reaccionar y el reticulante.

Preparación de hidrogel SAT a través de polimerización Redox. Se disolvieron por separado **SAT** (20 mg, $4,38 \times 10^{-2}$ mmol) y **bis-SAT** (0,5 mg, $8,76 \times 10^{-4}$ mmol) en H_2O (150 μl) y DMF (50 μl), respectivamente. A la solución se le añadieron TEMED ($2,25 \times 10^{-1}$ μl , $1,5 \times 10^{-3}$ mmol) y APS (50 μl en $2,28 \times 10^{-3}$ mg/ml, $5,00 \times 10^{-4}$ mmol) para iniciar la gelificación. Se formó un hidrogel en 2 horas, y el gel resultante se purificó mediante lavado con H_2O y MeOH.

Preparación de hidrogel SET a través de polimerización por radicales libres. Se disolvieron **SET** (40,49 mg, $8,82 \times 10^{-2}$ mmol), **bis-SAT** (5 mg, $8,76 \times 10^{-3}$ mmol) y AIBN (0,29 mg, $1,77 \times 10^{-3}$ mmol) en 0,11 ml de DMF y 0,22 ml de H_2O . Después de tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación, la gelificación se inició a 80 °C y se detuvo después de 4 h mediante refrigeración con nitrógeno líquido. El gel resultante se lavó con H_2O y MeOH para purificar.

Estudio de hidrólisis de poli(SAT). Se disolvió 50 mg de **poli(SAT)** (33.700 g/mol, $1,48 \times 10^{-3}$ mmol) en pH 3, pH 4, pH 5, y una solución acuosa de TFA al 10 %. La reacción se agitó a 25 °C y se dializó contra H_2O (MWCO 3.500 g/mol) durante tres días y se liofilizó.

Estudio de hidrólisis de hidrogel SET. A los tres hidrogeles SET (0,3 mg cada uno) se les añadieron 500 μl de D-PBS a pH 7,4, PBS a pH 5, y una solución de TFA al 10 %. La solubilidad de cada muestra se controló a través del tiempo.

Preparación de reticulante de trehalosa e hidrogeles de trehalosa

Para sintetizar un reticulante de trehalosa, se utilizó el método previamente informado para la síntesis de monómero de trehalosa (Mancini et al., 2012). Para aumentar el rendimiento para el reticulante bisfuncionalizado sobre el monómero, se añadieron 2,2 equivalentes molares de 4-vinilbenzaldehído dietil acetal a la trehalosa (Esquema 3). El reticulante **bis-SAT** se preparó a través de transacetalización (Figura 8) con un rendimiento del 72 %.

Este reticulante **bis-SAT** se copolimerizó para formar hidrogeles tanto SAT como SET a través de la polimerización por radicales libres iniciada por calor y la polimerización redox (Esquema 4 y Esquema 5). Para el **hidrogel SAT**, ambas rutas sintéticas dieron como resultado hidrogeles. Durante la polimerización por radicales libres mediada por AIBN, la formación de hidrogel se observó en 30 min a 90 °C, mientras que la polimerización redox requirió 2 h para la gelificación a 25 °C. Por el contrario, el hidrogel SET solo se pudo obtener a través de la polimerización por radicales libres. Durante la reticulación por radicales libres en codisolvente de $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ ($= 2/1$), se observó que el monómero SET se eliminada por precipitación de la solución. Todos los hidrogeles se purificaron mediante lavado con H_2O y MeOH para eliminar los materiales de partida sin reaccionar o las cadenas de polímero no reticuladas.

Para estudiar la escisión del acetal en los hidrogeles, se usó **poli(SAT)** lineal como sistema modelo. se disolvió **poli(SAT)** en una serie de pH ácidos para inducir la hidrólisis del enlace de acetal entre la trehalosa y el resto colgante en el esqueleto del polímero. El aldehído resultante se observó por espectroscopía ^1H RMN. A pH 3-5, todos los picos de trehalosa permanecieron constantes y no se observó pico de aldehído (datos no mostrados). Sin embargo, cuando el polímero se trató con TFA al 10 %, los picos de ^1H RMN correspondientes a los protones de trehalosa (Figura 9; arriba, 3,0-5,5 ppm) desaparecieron y se hizo visible un pico de aldehído. El espectro de ^1H RMN del polímero resultante parecía idéntico a la traza esperada para un polímero de 4-benzaldehído (Figura 9; abajo).

A continuación, el **hidrogel-1 SET**, cuando el polímero contiene enlaces de éter estables y solo el reticulante tiene un enlace reversible, se trató con D-PBS, pH 7,4, PBS, pH 5, y una solución acuosa de TFA al 10 %. Debido a la reticulación, el hidrogel no se disolvería en tampón acuoso. Sin embargo, de forma similar al estudio de hidrólisis de **poli(SAT)**, el **hidrogel-1 SET** en TFA al 10 % se disolvió completamente en 3 min. El gel permaneció tanto a pH 7,4 como a pH 5 incluso después de 48 h de incubación a 25 °C, lo que sugiere que se requiere un pH bajo para revertir el enlace de reticulante acetal (Figura 10).

Análisis

Conjuntamente, los datos anteriores describen el desarrollo de hidrogeles a base de trehalosa sensibles al ácido. Primero, se sintetizó un reticulante de trehalosa usando una química idéntica a la utilizada para preparar el monómero **SAT**. Esto dio como resultado un hidrogel que contenía restos de trehalosa en el reticulante, así como en el esqueleto,

lo que puede aumentar el efecto de estabilización para proteínas terapéuticas encapsuladas. Aunque **SAT** podría formar un hidrogel con **bis-SAT** utilizando tanto la polimerización por radicales libres como la química redox, **SET** no pudo formar un hidrogel con el mismo reticulante. Esto probablemente se deba a la solubilidad diferencial de **SET** y **bis-SAT** en 25 °C, H₂O y DMF respectivamente. Se requiere una temperatura más alta para solubilizar el monómero y el reticulante. Una observación apreciable fue que el enlace acetal de **bis-SAT** (o **SAT**) no podía hidrolizarse ni siquiera a pH 3. Solo cuando se añadió TFA al 10 % se hidrolizó el enlace de acetal al aldehído. Esta estabilidad del ácido fue inesperada, ya que los enlaces de acetal se habían utilizado previamente como reticulantes sensibles al pH en hidrogeles (Bachelder et al., 2008; Li et al., 2006; Murthy et al., 2002; Chen et al., 2010). La sorprendente estabilidad del ácido podría deberse al esqueleto del polímero, que se encuentra en la posición *para* del benzaldehído acetal. Se sabe que el sustituyente en la posición *para* es importante *para* influir en la inestabilidad de ácido del enlace de acetal (Murthy et al., 2002; Fife y Jao, 1965). Además, el esqueleto hidrófobo puede evitar que el agua alcance el enlace de acetal evitando así la hidrólisis. Cuando se añadió una solución de TFA al 10 % a **poli(SAT)** lineal, todas las cadenas laterales se hidrolizaron liberando la trehalosa; solo quedaba el esqueleto de polibenzaldehído después de la purificación. Sin embargo, no hubo diferencia en los espectros de ¹H RMN cuando se añadió la solución acuosa de pH 3 a pH 5. También, cuando el **hidrogel-1 SET** se trató con una solución de TFA al 10 %, el gel se solubilizó, lo que sugiere que el **bis-SAT** se hidrolizó.

Conclusión

En este capítulo, hemos descrito la síntesis de diversos hidrogeles de trehalosa usando un reticulante de trehalosa funcionalizado con bis-estirenil acetal. Dos monómeros de trehalosa diferentes formaron geles con este reticulante a través de polimerización por radicales libres mediada por AIBN. La hidrólisis del enlace de acetal no se detectó hasta que se añadió a una solución de TFA al 10 %. Se espera que estos hidrogeles de trehalosa escindibles con ácido se puedan usar como vehículos para la administración de proteínas o péptidos terapéuticos al estómago o estabilizadores para enzimas utilizadas en la síntesis química activada por ácido y la purificación de agua.

Ejemplo 3

Hidrogeles de trehalosa para estabilización de enzimas

Introducción

La solicitud se refiere a un sistema de hidrogel basado en el disacárido trehalosa natural como un excipiente eficiente para mejorar la termoestabilidad de las proteínas. Este hidrogel de trehalosa puede prepararse en solo dos etapas a partir de trehalosa usando etapas de purificación simples, que pueden aplicarse directamente industrialmente para la estabilización de proteínas.

Los solicitantes optaron por estudiar la estabilización de la fitasa debido a su importancia en la industria de pienso para animales. La fitasa es una enzima fosfohidrolítica que cataliza la conversión de fosfato en ácido fítico no digerible en una forma altamente digerible (Lei et al., 2013; Kuhn y Partanen, 2012; Nahm, 2002; Silversides, et al., 2004). La conversión del ácido fítico es esencial para especies de estómago simple tales como cerdos, aves y peces para utilizar esta forma de almacenamiento de fosfato presente en granos de pienso comunes tal como maíz, soja y trigo (Lei et al., 2013). En 2011, la fitasa representó aproximadamente el 60 % del mercado global de enzimas de pienso de 550 millones de dólares (Adeola y Cowieson, 2011). Sin embargo, el mayor desafío en el uso de fitasa en piensos para animales es su baja termoestabilidad durante el calentamiento con vapor del proceso de granulación, durante el cual se alcanza la temperatura entre 70-90 °C (Lei et al., 2013; Slominski et al., 2007). A pesar de los esfuerzos previos para mejorar su estabilidad al calor (Lei et al., 2013; Slominski et al., 2007; Hughes y Soares, 1998; Cao et al., 2007), un método simple y rentable sigue siendo de gran interés. Como se describe a continuación, los Solicitantes encontraron que la fitasa conserva el 100 % de la actividad cuando se calienta a 90 °C en presencia de hidrogeles de trehalosa.

Materiales

Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich, Thermo Scientific y Fisher Scientific y se usaron sin purificación a menos que se indique de otro modo. La trehalosa se adquirió en The Endowment for Medical Research (Houston, TX) y se secó con etanol y se mantuvo al vacío antes de su uso. El kit de etiquetado de proteínas de microescala Alexa Fluor® 488 (A30006) se adquirió en life technologies. Todos los disolventes para cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) se adquirieron en VWR o Fisher Scientific en grado LCMS. La trehalosa se adquirió en The Healthy Essential Management Corporation (Houston, TX), y se secó azeotrópicamente con etanol y se mantuvo al vacío hasta su uso. Se proporcionó fitasa por Phytex, LLC.

Técnicas analíticas

Los espectros UV-Vis se obtuvieron usando un espectrofotómetro Thermo Scientific Nanodrop 2000. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron de un microscopio confocal Leica SP2 1P-FCS con resolución axial de 25 µm. Los experimentos de LCMS se realizaron en un Waters Acquity UPLC conectado a un instrumento de tiempo de vuelo

Waters LCT-Premier XE controlado por el software MassLynx 4.1. El espectrómetro de masas se equipó con una fuente multimodo operada en el modo de electronebulización. Las muestras de trehalosa se separaron usando una columna Acquity BEH C18 1,7 μm (2,1 $\times$ 50 mm) y se eluyeron con un gradiente del 5 - 50 % de disolvente B durante 6 min (disolvente A: agua, disolvente B: acetonitrilo, ambos con ácido fórmico al 0,2 % (vol/vol)). Los espectros de masas se registraron en el modo de ión negativo en el rango m/z de 70-2000 con leucina-enkefalina (Sigma L9133) como patrón de masa de bloqueo. El análisis por HPLC de fase inversa preparativa se realizó en un sistema de HPLC Shimadzu equipado con un detector UV usando una columna Luna 5 μm C18 100A (preparativa: 5 μm , 250 $\times$ 21,2 mm) con monitorización a λ = 215 nm y 254 nm. Se usó un sistema de disolvente de gradiente lineal (H_2O : metanol = 70:30 a 50:50) como la fase móvil a un caudal de 10 ml/min. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) se adquirieron en un FEI Nova Nano 230 SEM en la instalación de UCLA Molecular and Nano Archaeology (MNA) en un bajo vacío de 50 Pa y alta tensión de 5 o 2,5 kV con un tamaño de punto de 3,0. Las imágenes de fluorescencia de los hidrogeles se obtuvieron utilizando un microscopio de barrido láser confocal (Leica SP2 1P-FCS, Leica) en la CNSI Advanced Light Microscopy/Spectroscopy Shared Resource Facility en la UCLA. El diámetro de la fitasa (PDB: 1DKL) (Lim et al., 2000) se midió utilizando Swiss-PdbViewer (Swiss Institute of Bioinformatics) (Guex y Peitsch, 1997). Las mediciones de fluorescencia se realizaron en una FlexStation II (Molecular Devices). La absorbancia de luz para el ensayo de actividad de fitasa se midió usando un lector de placas de microtitulación EPOCH Biotek.

Una reacción de un solo paso para la síntesis de monómeros y reticulantes de trehalosa (SET en bruto). La reacción de un solo paso para los monómeros y los reticulantes se realizó modificando un procedimiento de la bibliografía previamente informado (Teramoto y Shibata, 2004). Se añadió hidróxido de sodio (NaOH, 4,44 g, $1,11 \times 10^{-1}$ mol) a dimetilsulfóxido (DMSO, 96 ml). Después de agitar durante 5 min, se añadió trehalosa (4,86 g, $1,42 \times 10^{-2}$ mol) a la reacción. Después de la disolución de toda la trehalosa, se añadió lentamente cloruro de 4-vinilbencilo (0,4 ml, $2,84 \times 10^{-3}$ mol) a la reacción y se agitó durante 24 h a 25 °C. Después, el producto en bruto se precipitó en 2 l de DCM para eliminar la trehalosa altamente modificada. El sólido resultante se secó al vacío y se usó para gelificación sin purificación adicional.

Preparación de hidrogel de trehalosa cargado con fitasa. La mezcla en bruto (3,23 g) de la eterificación previa de Williamson se disolvió en H_2O (3,23 ml) y después se trató con tetrametiletilendiamina (TEMED, 16 μl , $1,07 \times 10^{-4}$ mol). A continuación, se añadieron 807 μl de solución madre acuosa de 10 mg/ml de persulfato de amonio (APS, 8,07 mg, $3,54 \times 10^{-5}$ mol) para iniciar la gelificación. La solución comenzó a gelificarse en 10 min a 25 °C. Se usó LCMS para cuantificar el grado de conversión, comparando la cantidad relativa de trehalosa monosustituida en comparación con la trehalosa no modificada antes y después de la gelificación. El análisis por LCMS mostró que todos los reticulantes habían reaccionado después de 24 h. Después de la gelificación, el gel se lavó con un extractor Soxhlet durante 3 días con H_2O para eliminar los monómeros sin reaccionar. El hidrogel se liofilizó y después se molió en polvo fino. Se añadieron 10 μl de soluciones de fitasa de diferentes concentraciones a cada gel seco para obtener relaciones fitasa: hidrogel de 1:1, 1:10 y 1:40 equivalentes en peso. Los geles se incubaron a 4 °C con la solución de fitasa durante 24 h y se liofilizaron para producir un polvo de color blanco para analizar en el estudio de carga de calor.

Etiquetado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) de fitasa. Se disolvieron fitasa (2 mg, $3,57 \times 10^{-2}$ μmol) y FITC (0,3 mg, $7,71 \times 10^{-1}$ μmol) en tampón borato 50 mM, pH 8,5 (1 ml). La mezcla se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante una hora. El exceso de FITC se eliminó mediante centrifugación repetida a través de una membrana MWCO de 3.000 Da usando tubos de filtración centrífuga de 0,5 ml hasta que no se detectó FITC por UV-Vis en el filtrado. El grado de etiquetado fue de 0,28 FITC por fitasa según lo determinado por la absorbancia UV (Schreiber y Haimovich, 1983).

Liberación de fitasa del hidrogel de trehalosa. Se añadió fitasa marcada con FITC (74 mg/ml) en tampón acetato sódico 0,1 M (pH 5,0, 10 μl) a 4 mg de hidrogel de trehalosa. La mezcla se incubó a 4 °C durante 24 h, y después se liofilizó. Al gel se le añadieron 1000 μl de tampón para iniciar la difusión pasiva de la fitasa desde el hidrogel. Se tomaron alícuotas (200 μl) en los puntos temporales respectivos y las muestras se rellenaron inmediatamente con tampón nuevo. Las concentraciones de las alícuotas de punto temporal se calcularon a partir de la fluorescencia medida en un espectrofluorómetro usando una curva de calibración de fitasa marcada con FITC.

Estudios de carga de calor de HRP e hidrogel SET. Se preparó una solución madre de peroxidasa de rábano picante (HRP) en una concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ en H_2O . La solución madre (66,6 μl) se añadió al hidrogel seco de estirenil éter trehalosa (hidrogel SET) para obtener 1:10 o 1:50 de muestras equivalentes en peso de HRP:hidrogel SET. Las muestras de control no calentadas sin el hidrogel se almacenaron a 4 °C hasta el ensayo de actividad. La mezcla HRP-hidrogel se incubó a 4 °C durante aproximadamente 2 horas para que el hidrogel se hidratara completamente. El hidrogel se calentó a 70 °C a 500 rpm con agitación durante 30 min en un agitador térmico MSC-100 (Hangzhou Allsheng Instruments, Co., Ltd., China). Las muestras se enfriaron inmediatamente y se incubaron durante una noche en un refrigerador a 4 °C. Para el ensayo de actividad, se usó 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como el sustrato y se usó una solución 1 M de H_2SO_4 como la solución de detención. La actividad se midió a partir de la absorbancia a 450 nm. El estudio se realizó en total 12 veces ($n = 12$).

Preparación de HRP-AF488 para microscopio confocal. A la solución de 100 μl de peroxidasa de rábano picante (HRP) (1 mg/ml) en D-PBS a pH 7,4, se le añadió TFP éster alexa Fluor® 488 (AF488, 10 μl en una solución 1 M de bicarbonato sódico). La reacción se incubó a 25 °C durante 30 min y se purificó utilizando un tubo centriprep (MWCO

3.000 g/mol). El grado de etiquetado de HRP-AF488 después de la purificación fue de 5,24. El hidrogel SET preparado anterior se sumergió en 100 µl de HRP-AF488 a 4 °C durante 12 h y después de un breve lavado con H₂O, se tomó una imagen de microscopio confocal.

- 5 **Estudios de carga de calor de fitasa.** A la mezcla seca de hidrogel y fitasa, se añadió el 53 % en peso de H₂O con respecto a la fitasa. El hidrogel se incubó a 4 °C durante 24 h con suave balanceo para distribuir uniformemente la solución. Después, se calentó el hidrogel a 90 °C durante 1 min, y se diluyó con tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5, y se incubó durante al menos 24 h antes del ensayo de actividad.
- 10 **Ensayo de actividad de fitasa.** Los hidrogeles de control y tratados con calor (10 µl) se diluyeron primero en 10 ml de tampón de citrato de sodio 0,2 M a pH 5,5, y se transfirieron alícuotas de 0,5 ml de muestra diluida a cada uno de los cuatro tubos de reacción (1 blanco y 3 muestras). A todos los tubos de muestra, se añadieron 0,5 ml de una solución al 1 % de ácido fítico (tampón de citrato de sodio 0,2 M, pH 5,5) y los tubos se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Después, las reacciones se interrumpieron mediante la adición de 1,0 ml de ácido tricloroacético al 15 %, y se añadieron 0,5 ml de ácido fítico a los tubos en blanco. Las muestras (30 µl) se diluyeron diez veces con agua destilada, y las soluciones diluidas (150 µl) se trataron con 150 µl de solución 1:3:1 de molibdato de amonio al 2,5 %: ácido sulfúrico al 10 %: ácido ascórbico al 10 % en una placa de microtitulación. La placa se incubó en un baño de agua a 50 °C durante 15 minutos, se enfrió a 4 °C durante 15 minutos, y se midió la absorbancia de 820 nm de los pocillos individuales. La actividad fitasa (FTU) se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1,0 micromoles de fosfato inorgánico por minuto a partir de ácido fítico al 1 % en tampón a pH 5,5 a 37 °C.

Análisis Estadístico. Se utilizó una prueba t de Student de una cola, suponiendo que se utilizó una varianza de muestra desigual. Los resultados se consideraron significativamente diferentes si $p < 0,05$.

- 25 **Liberación de fitasa del hidrogel que no se había liofilizado.** Se añadió fitasa marcada con FITC (30 mg/ml) en tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) a 0,5 mg de hidrogel de trehalosa para hidratar completamente el gel (25 µl de agua por 1 mg de hidrogel). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 12 h, y después se añadieron 200 µl de tampón para iniciar la difusión pasiva de la fitasa desde el hidrogel. La mitad de la solución se eliminó en varios puntos temporales y se añadió tampón recién preparado. Las concentraciones de las alícuotas de punto temporal se calcularon a partir de la fluorescencia medida en un espectrofluorómetro usando una curva de calibración de fitasa marcada con FITC.

Síntesis de monómero de trehalosa y reticulante

35 Síntesis de SET en bruto

Las etapas de síntesis simples y purificación son uno de los factores más importantes en las reacciones a escala industrial. Originalmente, se purificaron los monómeros de trehalosa precipitando la mezcla de reacción en DCM seguido de una purificación adicional para eliminar todos los productos secundarios, algunos de los cuales tienen un grado de sustitución (DS) sobre dos. Sin embargo, se prevé la síntesis de hidrogel a base de trehalosa directamente usando estos productos secundarios como reticulantes (Esquema 6). Debido a la presencia de reticulante en el monómero, el producto en este caso sería un hidrogel en lugar de un polímero lineal. En este capítulo, se describe la síntesis de hidrogel usando el monómero SET, ya que se puede producir una mezcla en bruto de monómero y reticulante a partir de los materiales de partida de cloruro de 4-vinilbencilo y trehalosa en una etapa (Teramoto y Shibata, 2004). Primero, se hizo reaccionar cloruro de 4-vinilbencilo con exceso de trehalosa en condiciones básicas. Después, la mezcla en bruto resultante se precipitó en DCM y se filtró para eliminar DMSO y trehalosa con un alto DS. El producto en bruto contenía varios regioisómeros (trehalosa con estireno en la 2^a, 4^a y 6^a posición), trehalosa bisfuncionalizada y trifuncionalizada, así como trehalosa no modificada. Después, la SET en bruto se usó directamente para la gelificación.

50

Síntesis de hidrogel SET

Se usó polimerización con persulfato de amonio (APS) y tetrametilendiamina (TEMED) como iniciadores por radicales para formar un hidrogel SET a partir del SET en bruto (Esquema 7). El SET en bruto se disolvió en H₂O a una concentración de 1 mg/ml y se añadió TEMED (Figura 11a). Inicialmente, la solución permaneció en la fase sol. Sin embargo, después de añadir APS, la solución comenzó a gelificarse en 10 min a 25 °C (Figura 11b). El hidrogel resultante tenía el mismo color amarillo que la mezcla en bruto. La red de hidrogel permaneció intacta después de la liofilización y la reinmersión en H₂O (Figura 11c y 11d). El lavado extenso con H₂O eliminó el color amarillo, dando como resultado un hidrogel SET incoloro (Figura 11e). Usando un mortero, el hidrogel SET purificado se molió entonces en un polvo para aumentar el área de superficie para la estabilización de proteínas y también para facilitar la manipulación. Después, se incubó HRP con la proteína a 70 grados C durante 30 minutos y posteriormente se determinó la actividad de la proteína. Se encontró que la proteína era significativamente más activa en presencia del hidrogel en comparación con ningún aditivo (Figura 12).

65 Análisis

Los datos demuestran que el **hidrogel SET** puede estabilizar HRP contra HRP extrema. La ventaja de utilizar el hidrogel es que su síntesis evita la purificación del monómero por HPLC. Otra ventaja de la formulación de hidrogel es su facilidad de eliminación. Dado que el hidrogel no es soluble en H₂O o disolventes orgánicos, se puede separar de la mezcla mediante filtración simple o centrifugación. El **hidrogel-2 SET** puede estabilizar una amplia gama de enzimas y proteínas que necesitan someterse a un duro tratamiento térmico. Dado que este grupo ya ha demostrado la estabilización de diversas proteínas contra el calentamiento utilizando polímeros de trehalosa lineales, el hidrogel a base de trehalosa descrito puede ser fácilmente aplicable a la estabilización térmica de otras enzimas o proteínas de importancia industrial (Mancini et al., 2012; Lee et al., 2013).

Aunque se ha demostrado que el **hidrogel SET** puede estabilizar la fitasa contra el calentamiento, todavía hay que confirmar si la fitasa está ubicada dentro del gel o adsorbida en la superficie. Para comenzar a determinar la ubicación de la proteína, se usó HRP modificada con el tetrafluorofenil éster Alexa Fluor® 488 (AF488) como sistema modelo. El **hidrogel SET** con HRP-AF488 se preparó de manera similar al **hidrogel SET** que mostró una estabilización del 100 % de la fitasa. Como se muestra en la Figura 13, las imágenes preliminares de microscopía confocal indicaron que la HRP-AF488 está presente dentro del hidrogel.

Conclusión

Se ha detallado la síntesis de un hidrogel de trehalosa para la estabilización de proteínas a escala industrial. Este hidrogel puede prepararse mediante simples etapas de síntesis y purificación, lo cual es una consideración importante en los procesos industriales. El hidrogel de trehalosa es un sistema prometedor para estabilizar diversas enzimas o proteínas contra el procedimiento de granulación u otros procesos de alta temperatura.

Hidrogel de trehalosa para la estabilización de enzimas al calentamiento

Las enzimas pueden catalizar diversas reacciones con alta selectividad y están involucradas en muchos procesos biológicos importantes. Sin embargo, la inestabilidad general de las enzimas contra la alta temperatura a menudo limita su aplicación. Para abordar esto, se sintetiza un hidrogel a base de trehalosa en dos etapas a partir de materiales de partida comerciales con procedimientos de purificación mínimos. Los monómeros de trehalosa mono y multifuncionales se reticularon por polimerización por radicales iniciada por redox para formar un hidrogel. La fitasa, una enzima importante utilizada en la alimentación animal, se empleó para estudiar la eficacia del hidrogel de trehalosa para estabilizar las proteínas contra el calor. La adición de la solución de fitasa al hidrogel dio como resultado la internalización de la enzima según lo confirmado por microscopía confocal. La fitasa en el hidrogel conservó el 100 % de la actividad tras el calentamiento a 90 °C en comparación con el 39 % cuando el hidrogel estaba ausente. La enzima también podría recuperarse del hidrogel. La síntesis de hidrogel de trehalosa informada en el presente documento debería ser fácilmente escalable para la estabilización térmica de una amplia diversidad de enzimas.

Resultados y análisis

La síntesis directa, los materiales de partida disponibles comercialmente, y las etapas de purificación simple son algunos de los factores más importantes en las reacciones a escala industrial (Kuttruff et al., 2014). Por lo tanto, el hidrogel se sintetizó en solo dos etapas. Primero, la eterificación de Williamson usando cloruro de 4-vinilbencilo y trehalosa produjo una mezcla de producto en bruto que posteriormente se precipitó en DCM. El lavado de DCM contenía principalmente DMSO y algunos productos de trehalosa y monosustituidos y disustituidos, mientras que el precipitado que se usó para la gelificación consistió en productos de trehalosa y sustituidos con vinilo sin modificar (monosustituidos al 79 %, disustituidos al 16 % y trisustituidos al 5 %) según se mide por HPLC y LCMS (Figuras 20 y 21 y Tabla 1). Se visualiza que los productos multisustituidos de la mezcla de reacción de monómero en bruto podrían usarse como reticulantes para sintetizar un hidrogel a base de trehalosa directamente a partir de la mezcla de reacción en bruto (Esquema 6 y Esquema 7). Debido a la presencia de reticulantes, la polimerización produciría un hidrogel en lugar de un polímero lineal.

Después, la mezcla en bruto se polimerizó por polimerización por radicales usando un par iniciador redox, APS y TEMED. La mezcla en bruto se disolvió en agua con TEMED (Figura 11a). Después de la adición de APS, la solución comenzó a gelificarse en 10 min a 25 °C (Figura 11b). El hidrogel resultante tenía el mismo color amarillo que la mezcla en bruto. La red de hidrogel permaneció intacta después de la liofilización y la rehidratación (Figura 11c y 11d). Después de 1 día, toda la trehalosa di y tri-sustituida había reaccionado (Figura 20). El gel en bruto se lavó con un extractor Soxhlet durante 3 días para eliminar los monómeros sin reaccionar, el iniciador residual y la trehalosa, produciendo un hidrogel incoloro. El hidrogel de trehalosa purificado se molió en un polvo con un mortero para facilitar su manipulación y aumentar el área de superficie para la internalización de la fitasa (Figura 11e).

Tabla 1. Masas teóricas y observadas de [M+HCOO]⁻ ión trehalosa y sus derivados del cromatograma de LC-MS en la Figura 19

	Tiempo de retención (min)	Masa teórica (m/z)	Masa observada (m/z)	Δ m/z (ppm)
Trehalosa	0,6	387,1139	387,1143	-1,1

(continuación)

	Tiempo de retención (min)	Masa teórica (m/z)	Masa observada (m/z)	Δ m/z (ppm)
Monosustituida	2,5	503,1765	503,1762	0,5
	2,8	503,1765	503,1720	8,9
	2,9	503,1765	503,1765	-0,1
Disustituida	4,4	619,2391	619,2369	3,5
Trisustituida	5,5	735,3017	735,3012	0,6

El hidrogel purificado se caracterizó por un SEM de presión variable, como se muestra en la Figura 14. Las imágenes revelaron una arquitectura de hidrogel con poros de tamaño micrométrico. Dado que el diámetro de la fitasa es de aproximadamente 11,1 nm a lo largo del eje principal medido a partir de la estructura cristalina (PDB: 1DKL) (Oakley, 2010), por lo tanto, se esperaba que la fitasa se incorporase dentro del hidrogel. Para probar esta hipótesis, se observó el hidrogel bajo un microscopio confocal después de la incubación en una solución de fitasa marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) seguido de un breve lavado en agua (Figura 15). Una distribución uniforme del fluoróforo a través de la matriz de gel demostró que la fitasa estaba completamente internalizada en el hidrogel y no se adsorbió simplemente en la superficie del hidrogel. Debido al tamaño de poro, se anticipa que la enzima se liberaría del hidrogel cuando al diluirse con agua. De hecho, el perfil de liberación de la fitasa marcada con FITC del hidrogel después de la liofilización mostró que el 78 % de la fitasa se liberó en 6 horas (Figura 16). El perfil de liberación fue similar al gel que no ha sido liofilizado (Figura 21). Los resultados proporcionan evidencia adicional de que la fitasa se internaliza dentro del hidrogel y también demuestran que el gel puede usarse para recuperar la enzima después de la carga.

Actualmente en la industria de pienso para animales, la granulación es el proceso más común para preparar piensos para animales, ya que mejora su eficiencia y reduce la excreción de nutrientes en comparación con las formas trituradas (Nahm, 2002; Thomas y Van der Poel, 1996). Típicamente, las temperaturas alcanzan 70 - 90 °C durante unos minutos durante la granulación. Para la fitasa en particular, los ingredientes secos, incluida la fitasa, se mezclan en un acondicionador de molienda de granulación, alcanzando una temperatura de 80 - 90 °C durante 35 - 45 s, seguido de extrusión para producir los gránulos deseados. Por lo tanto, la fitasa se cargó en el hidrogel y se calentó en una condición que simulaba el proceso de granulación con vapor (90 °C, 1 min). La solución de fitasa se añadió a tres equivalentes en peso diferentes (1, 10 y 40) de hidrogel de trehalosa liofilizada y se incubó durante 24 h. La muestra se liofilizó de nuevo, se añadió el 53 % en peso de agua al hidrogel de trehalosa cargado con fitasa, y el gel se incubó durante 24 h más para replicar el nivel de humedad del proceso de calentamiento con vapor. El agua es esencial para el proceso de granulación, pero también acelera la desnaturalización de la fitasa bajo calentamiento extremo (Lee et al., 2013; Slominski et al., 2007). Los resultados mostraron que la fitasa calentada en presencia del hidrogel conservó una actividad significativamente mayor para todos los equivalentes en peso probados. Incluso cuando solo se usó 1 equivalente en peso de hidrogel, se conservó el 81 % de actividad en comparación con el control que no se había calentado, que solo tenía el 39 % de actividad, y 10 y 40 equiv. en peso conservaron el 100 % de la actividad enzimática (Figura 17). La actividad promedio indicó que 10 equivalentes en peso de hidrogel con respecto a fitasa era la cantidad óptima para retener completamente la actividad de fitasa original, mientras se utilizaba la cantidad mínima de hidrogel.

Los resultados demostraron que el hidrogel de trehalosa puede estabilizar la fitasa frente a condiciones de calor extremo. El hidrogel de trehalosa puede ser adecuado para aplicaciones a escala industrial, ya que la síntesis solo requiere dos etapas e implica una purificación mínima que se puede adaptar fácilmente a gran escala. Específicamente, el método propuesto utiliza purificación sin cromatografía, materiales de partida fácilmente accesibles, química sin grupos protectores, y un número mínimo de etapas (Kuttruff et al., 2014).

Otra ventaja de la formulación de hidrogel es su facilidad de eliminación. Los resultados de la liberación demuestran que la proteína de interés puede eliminarse del hidrogel. La liberación se produjo durante varias horas con una liberación de ~80 % a las 6 horas. Sin embargo, esto es con difusión pasiva. Dado que el hidrogel no es soluble en agua o disolventes orgánicos, se puede separar de la mezcla por simple filtración o centrifugación. Se puede anticipar que al aclarar o empujar el agua a través del sistema, o con la agitación que se produce en el tracto gastrointestinal en el caso del hidrogel cargado con fitasa, la enzima se liberaría más rápido. Esta es una ventaja potencial del sistema ya que el hidrogel podría añadirse y después eliminarse de la proteína después del estrés si así se desea.

Además, a pesar de mucha investigación sobre la ingeniería genética de las enzimas para mejorar su estabilidad térmica, usualmente se requieren iteraciones de optimización múltiples o estrategias de mutación específicas de la enzima, acompañadas de un coste más alto (Himmel et al., 2007). Por lo tanto, la estrategia descrita en el presente documento puede ser más flexible y rentable que las técnicas de ingeniería genética. Dado que este grupo ya ha demostrado que los polímeros de trehalosa lineales estabilizan diversas proteínas contra el calentamiento (Lee et al., 2013; Mancini et al., 2013), el hidrogel a base de trehalosa descrito por la presente puede ser fácilmente aplicable a la estabilización térmica de una amplia diversidad de enzimas y proteínas de importancia industrial.

Conclusiones

Se ha detallado la síntesis de un hidrogel de trehalosa para la estabilización térmica de la fitasa como una enzima modelo. Este hidrogel puede prepararse mediante simples etapas de síntesis y purificación, que son consideraciones importantes en los procesos industriales. El hidrogel de trehalosa resultante conservó completamente la actividad de la fitasa a temperaturas relevantes en el procedimiento de granulación para la preparación de pienso para animales. En la actualidad, muchas enzimas en los piensos para animales pierden la mayor parte de su actividad durante este proceso de granulación con vapor. Como lo demuestra la estabilización de la fitasa en este informe, el hidrogel de trehalosa es un material prometedor para estabilizar diversas enzimas y proteínas contra procesos de alta temperatura.

Bibliografía:

1. G. N. Somero, *Annu. Rev. Physiol.*, 1995, 57, 43-68.
2. A. J. Rader, B. M. Hespeneide, L. A. Kuhn and M. F. Thorpe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 2002, 99, 3540-3545.
3. C. Ó. Fágáin, *BBA-Protein Struct. M.*, 1995, 1252, 1-14.
4. V. Ravindran and J.-H. Son, *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*, 2011, 3, 102-109.
5. H. Samejima, K. Kimura and Y. Ado, *Biochimie*, 1980, 62, 299-315.
6. A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts and B. Witholt, *Nature*, 2001, 409, 258-268.
7. G. DeSantis and J. B. Jones, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, 10, 324-330.
8. O. Ryan, M. R. Smyth and C. Ó. Fágáin, *Enzyme Microb. Tech.*, 1994, 16, 501-505.
9. P. Frosst, H. J. Blom, R. Milos, P. Goyette, C. A. Sheppard, R. G. Matthews, G. J. H. Boers, M. Denheijer, L. A. J. Kluijtmans, L. P. Vandenheuvel and R. Rozen, *Nat. Genet.*, 1995, 10, 111-113.
10. B. W. Matthews, H. Nicholson and W. J. Becktel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 1987, 84, 6663-6667.
11. S. Kumar, C. J. Tsai and R. Nussinov, *Protein Eng.*, 2000, 13, 179-191.
12. T. Imanaka, M. Shibazaki and M. Takagi, *Nature*, 1986, 324, 695-697.
13. H. F. Gaertner and A. J. Puigserver, *Enzyme Microb. Tech.*, 1992, 14, 150-155.
14. M. A. Longo and D. Combes, *J. Chem. Technol. Biot.*, 1999, 74, 25-32.
15. Z. Yang, M. Domach, R. Auger, F. X. Yang and A. J. Russell, *Enzyme Microb. Tech.*, 1996, 18, 82-89.
16. D. Kazan and A. Erarslan, *Appl. Biochem. Biotech.*, 1997, 62, 1-13.
17. S. Tomita, Y. Nagasaki and K. Shiraki, *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109, 2543-2552.
18. R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, 349, 1289-1307.
19. K. Akiyoshi, Y. Sasaki and J. Sunamoto, *Bioconjug. Chem.*, 1999, 10, 321-324.
20. Q. Wang, Z. Yang, Y. Gao, W. Ge, L. Wang and B. Xu, *Soft Matter*, 2008, 4, 550-553.
21. K. Lippert and E. Galinski, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, 37, 61-65.
22. J. K. Kaushik and R. Bhat, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 26458-26465.
23. R. P. Baptista, S. Pedersen, G. J. Cabrita, D. E. Otzen, J. M. Cabral and E. P. Melo, *Biopolymers*, 2008, 89, 538-547.
24. N. Guo, I. Puhlev, D. R. Brown, J. Mansbridge and F. Levine, *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18, 168-171.
25. S. Hengherr, A. G. Heyer, H. R. Kohler and R. O. Schill, *FEBSJ.*, 2008, 275, 281-288.
26. J. H. Crowe, L. M. Crowe and D. Chapman, *Science*, 1984, 223, 701-703.
27. G. M. Beattie, J. H. Crowe, A. D. Lopez, V. Cirulli, C. Ricordi and A. Hayek, *Diabetes*, 1997, 46, 519-523.
28. P. Sundaramurthi and R. Suryanarayanan, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2009, 1, 510-514.
29. T. Duong, R. Barrangou, W. M. Russell and T. R. Klaenhammer, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 1218-1225.
30. P. Westh and H. Ramløv, *J. Exp. Zool.*, 1991, 258, 303-311.
31. K. A. C. Madin and J. H. Crowe, *J. Exp. Zool.*, 1975, 193, 335-342.
32. N. K. Jain and I. Roy, *Protein Sci.*, 2009, 18, 24-36.
33. S. Ohtake and Y. J. Wang, *J. Pharm. Sci.*, 2011, 100, 2020-2053.
34. J. Lee, E. W. Lin, U. Y. Lau, J. L. Hedrick, E. Bat and H. D. Maynard, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 2561-2569.
35. X. G. Lei, J. D. Weaver, E. Mullaney, A. H. Ullah and M. J. Azain, *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2013, 1, 283-309.
36. I. Kuhn and K. Partanen, *J. Anim. Sci.*, 2012, 90, 194-196.
37. K. H. Nahm, *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 2002, 32, 1-16.
38. F. G. Silversides, T. A. Scott and M. R. Bedford, *Poult. Sci.*, 2004, 83, 985-989.
39. O. Adeola and A. J. Cowieson, *J. Anim. Sci.*, 2011, 89, 3189-3218.
40. B. A. Slominski, T. Davie, M. C. Nyachoti and O. Jones, *Livestock Sci.*, 2007, 109, 244-246.
41. K. P. Hughes and J. H. Soares, Jr., *Aquacult. Nutr.*, 1998, 4, 133-140.
42. L. Cao, W. Wang, C. Yang, Y. Yang, J. Diana, A. Yakupitiyage, Z. Luo and D. Li, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, 40, 497-507.
43. D. Lim, S. Golovan, C. W. Forsberg and Z. Jia, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7, 108-113.
44. N. Guex and M. C. Peitsch, *Electrophoresis*, 1997, 18, 2714-2723.
45. C. A. Kuttruff, M. D. Eastgate and P. S. Baran, *Nat. Prod. Rep.*, 2014, 31, 419-432.
46. A. J. Oakley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 397, 745-749.
47. M. Thomas and A. Van der Poel, *Anim. Feed Sci. Tech.*, 1996, 61, 89-112.
48. M. E. Himmel, S. Y. Ding, D. K. Johnson, W. S. Adney, M. R. Nimlos, J. W. Brady and T. D. Foust, *Science*, 2007, 315, 804-807.
49. Guan, Y.; Zhang, Y. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 8106.

50. Ravaine, V.; Ancla, C.; Catargi, B. J. *Control. Release* 2008, 132, 2.
51. Kuivila, H. G.; Keough, A. H.; Soboczenski, E. J. *J. Org. Chem.* 1954, 19, 780.
52. Springsteen, G.; Wang, B. H. *Tetrahedron* 2002, 58, 5291.
53. Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. *Tetrahedron* 2004, 60, 11205.
54. Barker, S. A.; Chopra, A. K.; Hatt, B. W.; Somers, P. J. *Carbohydr. Res.* 1973, 26, 33.
55. Matsumoto, A.; Yamamoto, K.; Yoshida, R.; Kataoka, K.; Aoyagi, T.; Miyahara, Y. *Chem. Commun.* 2010, 46, 2203.
56. Wang, D.; Liu, T.; Yin, J.; Liu, S. *Macromolecules* 2011, 44, 2282.
57. Ancla, C.; Lapeyre, V.; Gosse, I.; Catargi, B.; Ravaine, V. *Langmuir* 2011, 27, 12693.
58. Zhang, C.; Losego, M. D.; Braun, P. V. *Chem. Mater.* 2013, 25, 3239.
59. Yuan, W.; Shen, T.; Wang, J.; Zou, H. *Polymer Chemistry* 2014, 5, 3968.
60. Yang, T.; Ji, R.; Deng, X.-X.; Du, F.-S.; Li, Z.-C. *Soft Matter* 2014, 10, 2671.
61. Vandenberg, R.; Peters, J. A.; Vanbekkum, H. *Carbohydr. Res.* 1994, 253, 1.
62. Roy, I.; Gupta, M. N. *Chem. Biol.* 2003, 10, 1161.
63. Bajpai, A. K.; Shukla, S. K.; Bhanu, S.; Kankane, S. *Prog. Polym. Sci.* 2008, 33, 1088.
64. Gupta, P.; Vermani, K.; Garg, S. *Drug Discov. Today* 2002, 7, 569.
65. Qiu, Y.; Park, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001, 53, 321.
66. Kiyonaka, S.; Sugiyasu, K.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 10954.
67. Mano, J. F. *Advanced Engineering Materials* 2008, 10, 515.
68. Ingber, D. E.; Prusty, D.; Frangioni, J. V.; Cragoe, E. J.; Lechene, C.; Schwartz, M. A. *J. Cell Biol.* 1990, 110, 1803.
69. Wei, F.; Zhuyuan, W.; Shenfei, Z.; Hui, C.; Dan, Z.; Yuan, Z.; Yiping, C. *Biosens. Bioelectron.* 2014, 57, 10.
70. Lowman, A. M.; Morishita, M.; Kajita, M.; Nagai, T.; Peppas, N. A. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 933.
71. Patel, V.; Amiji, M. *Pharm. Res.* 1996, 13, 588.
72. Besheer, A.; Wood, K. M.; Peppas, N. A.; Mader, K. J. *Control. Release* 2006, 111, 73.
73. Guo, B.-L.; Gao, Q.-Y. *Carbohydr. Res.* 2007, 342, 2416.
74. Nho, Y. C.; Park, S. E.; Kim, H. I.; Hwang, T. S. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 2005, 236, 283.
75. Sajeesh, S.; Sharma, C. P. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 2006, 76B, 298.
76. Shantha, K. L.; Harding, D. R. K. *Int. J. Pharm.* 2000, 207, 65.
77. Teramoto, N.; Sachinvala, N. D.; Shibata, M. *Molecules* 2008, 13, 1773.
78. Bachelder, E. M.; Beaudette, T. T.; Broaders, K. E.; Dashe, J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 10494.
79. Li, R. C.; Broyer, R. M.; Maynard, H. D. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2006, 44, 5004.
80. Murthy, N.; Thng, Y. X.; Schuck, S.; Xu, M. C.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 12398.
81. Chen, W.; Meng, F.; Cheng, R.; Zhong, Z. J. *Control. Release* 2010, 142, 40.
82. Fife, T. H.; Jao, L. K. *The Journal of Organic Chemistry* 1965, 30, 1492.
83. Teramoto, N.; Shibata, M. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 91, 46.
84. Brown, L. R. *Expert. Opin. Drug. Del* 2005, 2, 29-42.
85. Burdick, J.; Chase, H. P.; Slover, R. H.; Knievel, K.; Scrimgeour, L.; Maniatis, A. K.; Klingensmith, G. J. *Pediatrics* 2004, 113, e221-224.
86. Wu, Q.; Wang, L.; Yu, H.; Wang, J.; Chen, Z. *Chem. Rev.* 2011, 111, 7855-7875.
87. Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S. *Polymer* 2011, 52, 4631-4643.
88. Matsumoto, A.; Ishii, T.; Nishida, J.; Matsumoto, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y. *Angew. Chem. Int. Edit.* 2012, 51, 2124-2128.
89. Bapat, A. P.; Roy, D.; Ray, J. G.; Savin, D. A.; Sumerlin, B. S. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 19832-19838.
90. Wang, Y. Chai, Z.; Ma, L.; Shi, C.; Shen, T.; Song, J. *RSC Adv.* 2014, 4, 53877-53884.
91. Pryce, R. *BMJ* 2009, 338: a2218.
92. Weiss, R. C.; van Amerongen, D.; Bazalo, G.; Aagren, M.; Bouchard, J. R. *Managed care* 2011, 20, 42-47.
93. Hinds, K. D.; Kim, S. W. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002, 54, 505-530.
94. Heise, T.; Nosek, L.; Spitzer, H.; Heinemann, L.; Niemoller, E.; Frick, A. D.; Becker, R. H. *Diabetes Obes. Metab.* 2007, 9, 746-753.
95. Leobandung, W.; Ichikawa, H.; Fukumori, Y.; Peppas, N. A. *J. Control. Release* 2002, 80, 357-363.
96. Akiyoshi, K.; Kobayashi, S.; Shichibe, S.; Mix, D.; Baudys, M.; Kim, S. W.; Sunamoto, J. *J. Control. Release* 1998, 54, 313-320.
97. Lee, J.; Lin, E. W.; Lau, U. Y.; Hedrick, J. L.; Bat, E.; Maynard, H. D. *Biomacromolecules* 2013, 14, 2561-2569.
98. Mancini, R. J.; Lee, J.; Maynard, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 8474-8479.
99. Nagai, Y.; Kobayashi, K.; Toi, H.; Aoyama, Y. B. *Chem. Soc. Jpn.* 1993, 66, 2965-2971.
100. Stones, D.; Manku, S.; Lu, X. S.; Hall, D. G. *Chem-Eur. J.* 2004, 10, 92-100.
101. Hargrove, A. E.; Ellington, A. D.; Anslyn, E. V.; Sessler, J. L. *Bioconjugate chemistry* 2011, 22, 388-396.
102. Van den Berg, R.; Peters, J. A.; Van Bekkum, H. *Carbohydr. Res.* 1994, 253, 1-12.
103. James, T. D.; Sandanayake, K. R. A. S.; Shinkai, S. *Angew. Chem. Int. Edit.* 1996, 35, 1910-1922.
104. Roy, D.; Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S. *Chem. Commun.* 2009, 2106-2108.
105. Lee, L. L. Y.; Lee, J. C. *Biochemistry* 1987, 26, 7813-7819.
106. Senske, M.; Tork, L.; Born, B.; Havenith, M.; Herrmann, C.; Ebbinghaus, S. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136,

9036-9041.

107. Amirgoulova, E. V.; Groll, J.; Heyes, C. D.; Ameringer, T.; Rocker, C.; Moller, M.; Nienhaus, G. U. *Chemphyschem* 2004, 5, 552-555.

108. Lee, E. S.; Gao, Z.; Bae, Y. H. *J. Control. Release* 2008, 132, 164-170.

5 109. Schreiber, A. B.; Haimovich, J. *Method Enzymol* 1983, 93, 147-155.

110. Ye, J.; Chen, Y.; Liu, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2014, 53, 10386-10389.

111. Zhang, W.; Liu, W.; Li, P.; Xiao, H.; Wang, H.; Tang, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2014, 12697-12701.

REIVINDICACIONES

1. Un método para crear un hidrogel a base de trehalosa, que comprende las etapas de:

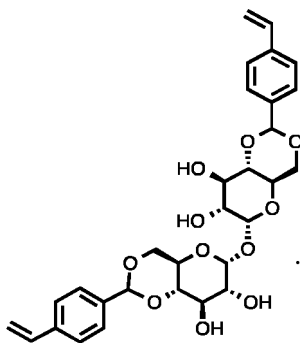
- a) preparar un reticulante de trehalosa;
- b) preparar un monómero a base de trehalosa; y
- c) hacer reaccionar el reticulante de trehalosa con el monómero a base de trehalosa para formar el hidrogel a base de trehalosa.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reticulante de trehalosa se sintetiza usando una química idéntica a la que se usa para preparar el monómero a base de trehalosa.

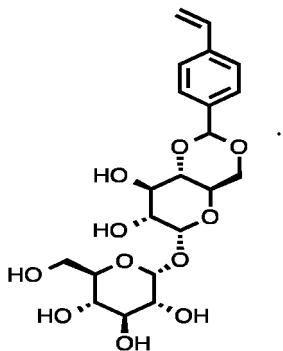
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reticulante de trehalosa se sintetiza durante la misma etapa que se usa para preparar el monómero a base de trehalosa.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción en la etapa b) es una polimerización por radicales libres iniciada por un iniciador Redox.

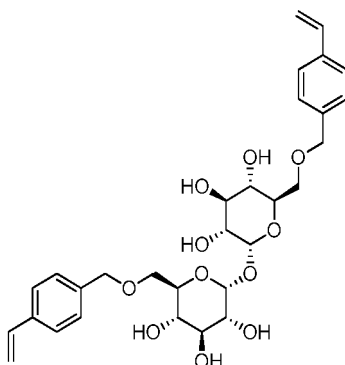
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reticulante de trehalosa tiene la estructura



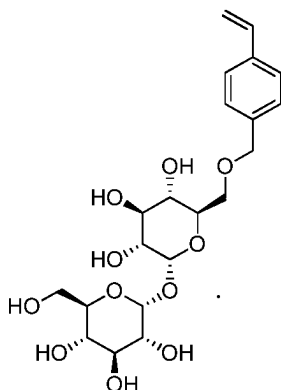
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el monómero a base de trehalosa tiene la estructura



7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reticulante de trehalosa comprende la estructura



8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el monómero a base de trehalosa tiene la estructura



9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que no es necesario ningún proceso de purificación por HPLC para purificar el monómero a base de trehalosa.

10. Un método para estabilizar una proteína, que comprende las etapas de:

- a) preparar un hidrogel a base de trehalosa de acuerdo con cualquier método de las reivindicaciones 1-9; y
- b) añadir una proteína al hidrogel a base de trehalosa en el momento de la formación del hidrogel o después de la formación para formar un complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa;

en el que la proteína se estabiliza.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la proteína es una enzima.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la proteína se estabiliza cuando se expone al calor.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la proteína se estabiliza por encima de 4 °C.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la proteína se estabiliza a 70-90 °C.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la proteína se libera del complejo de la proteína y el hidrogel a base de trehalosa por dilución con agua o reduciendo el pH.

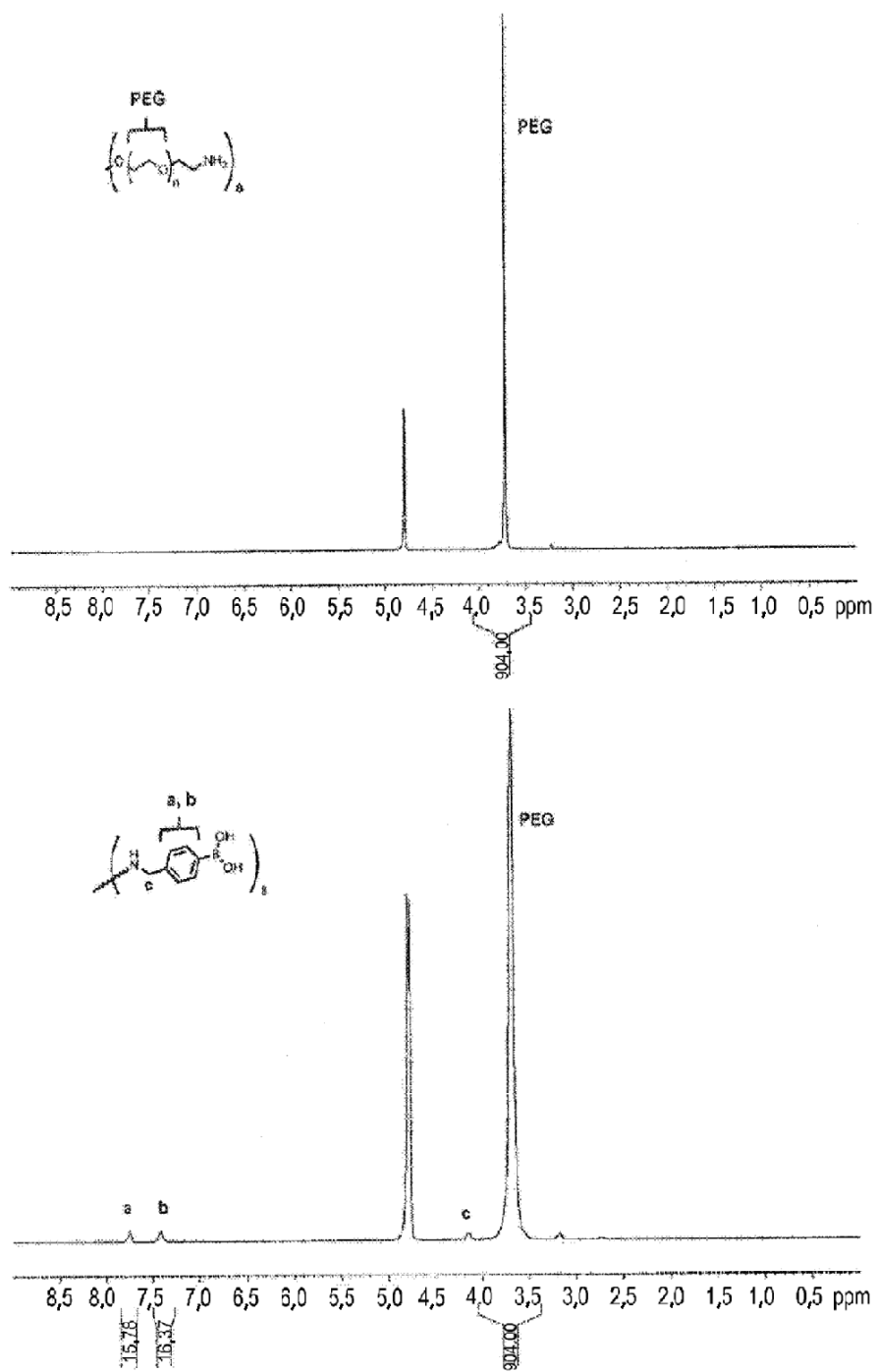


FIGURA 1

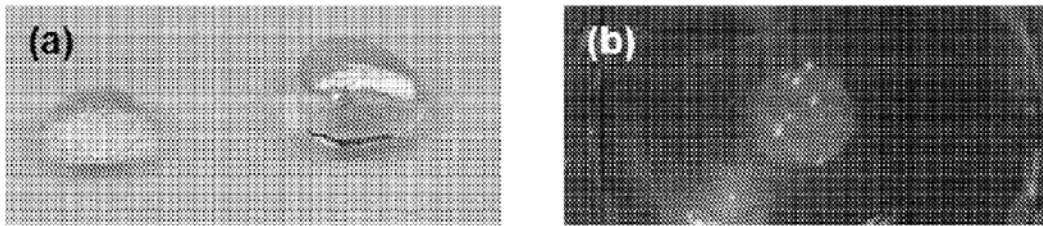


Figura 2 (a y b)

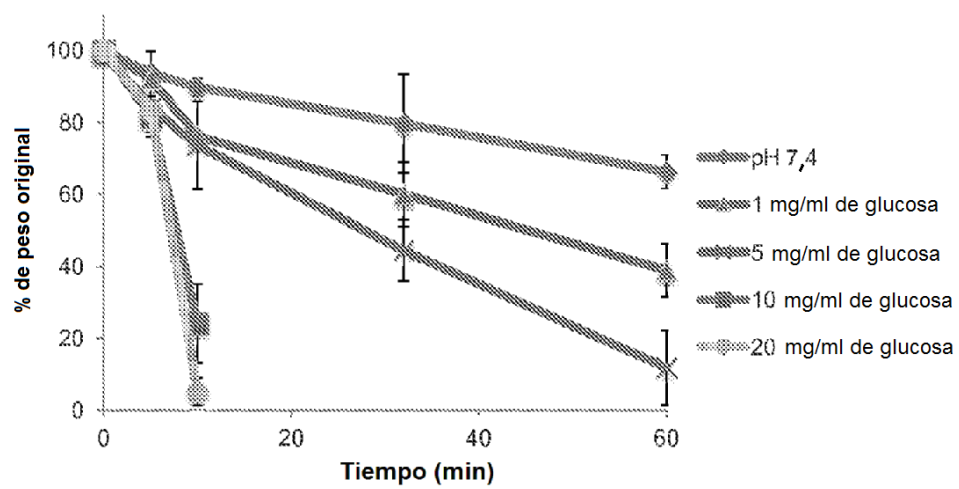


Figura 3

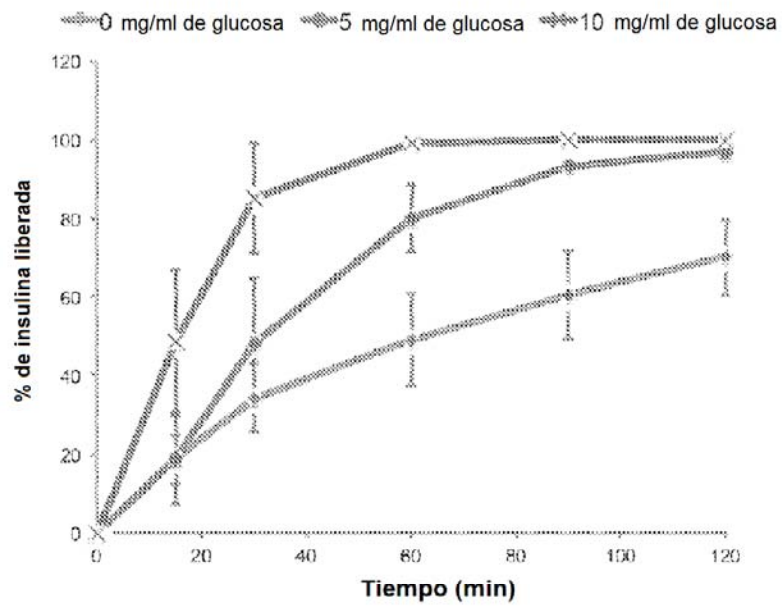


Figura 4

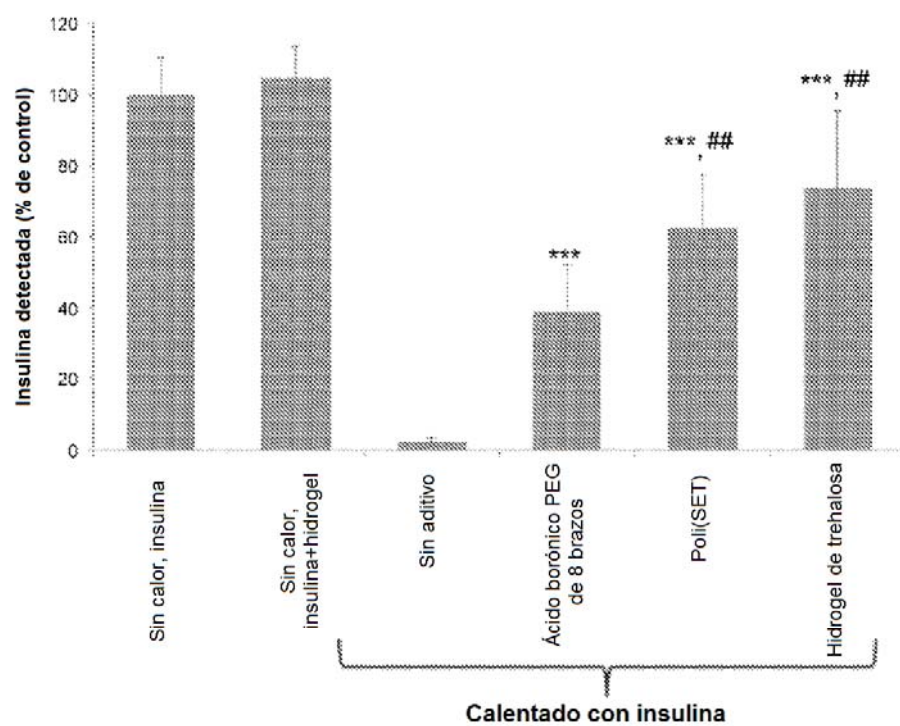


Figura 5

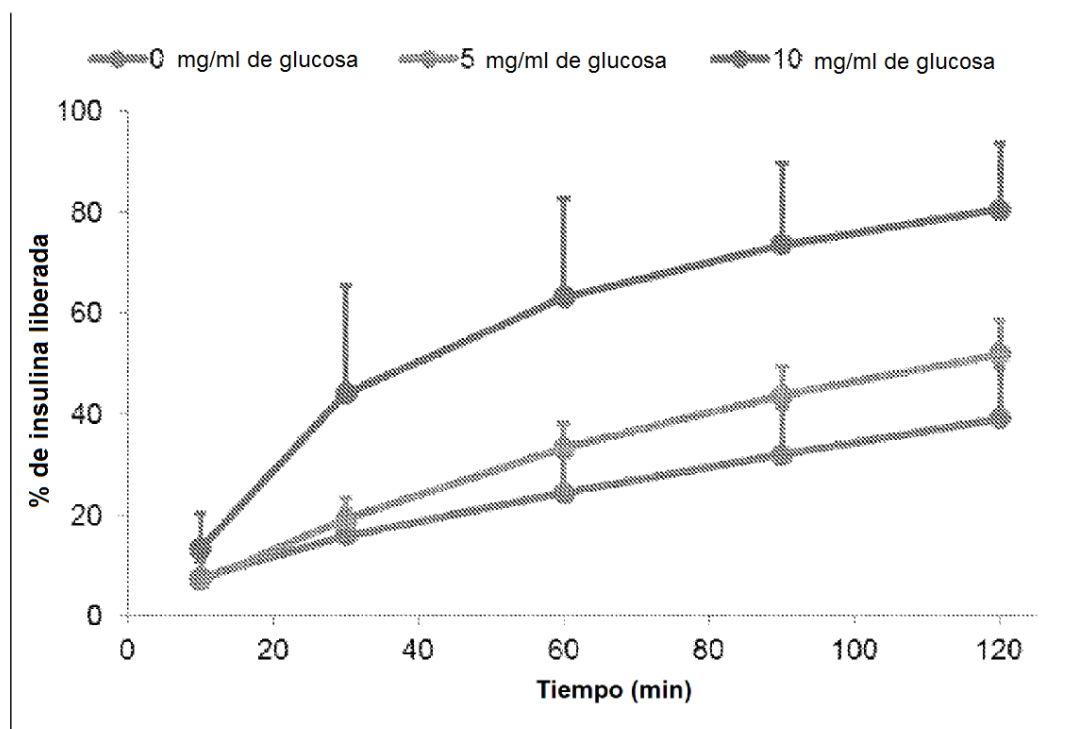


Figura 6

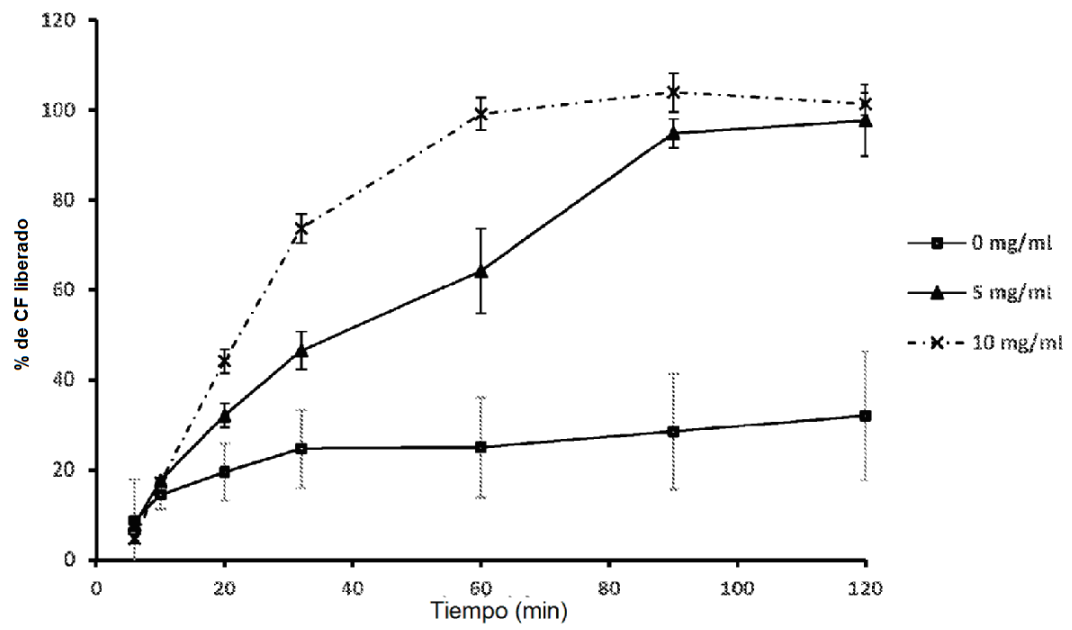


Figura 7

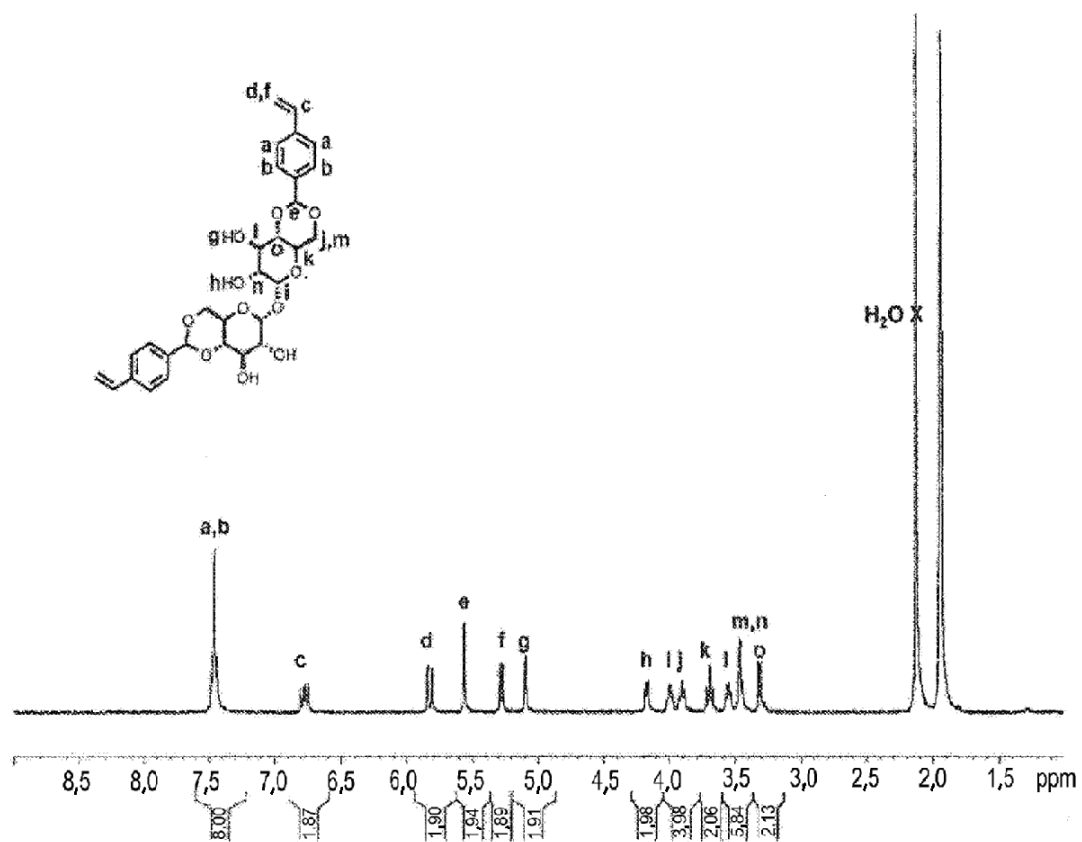


FIGURA 8

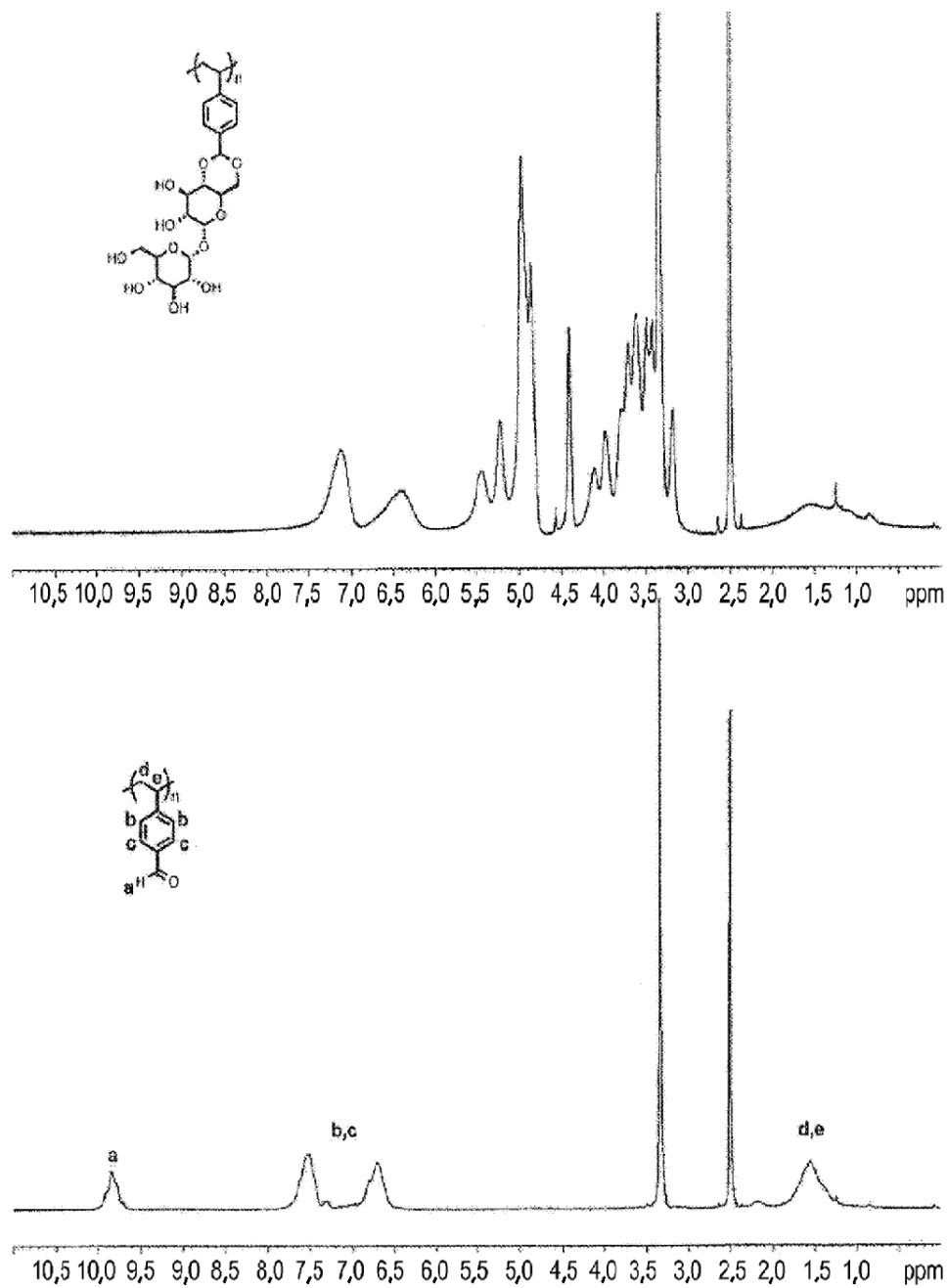


FIGURA 9

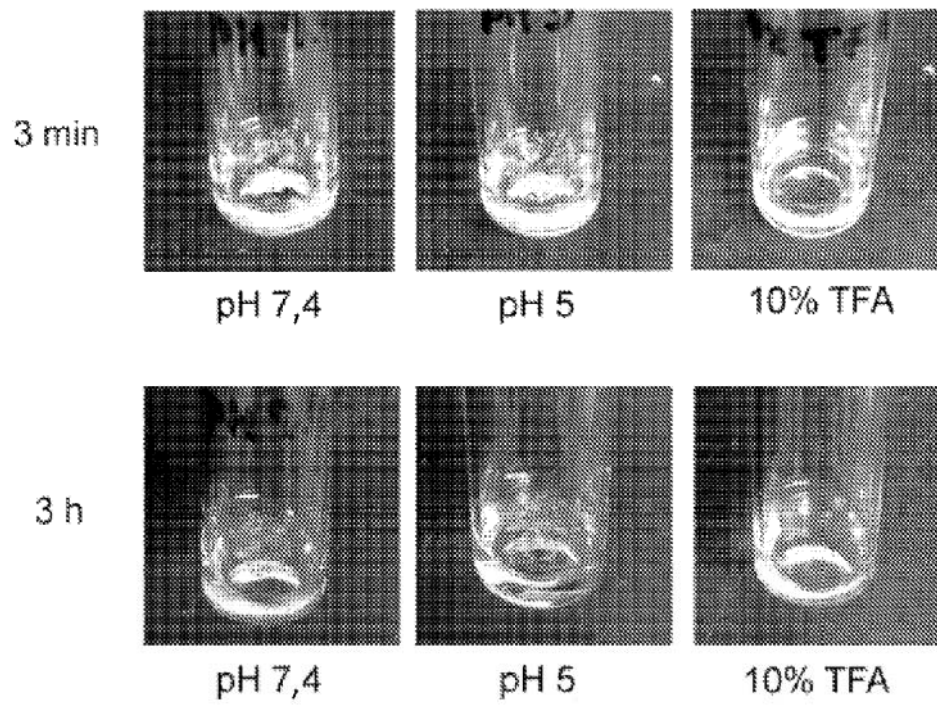


Figura 10

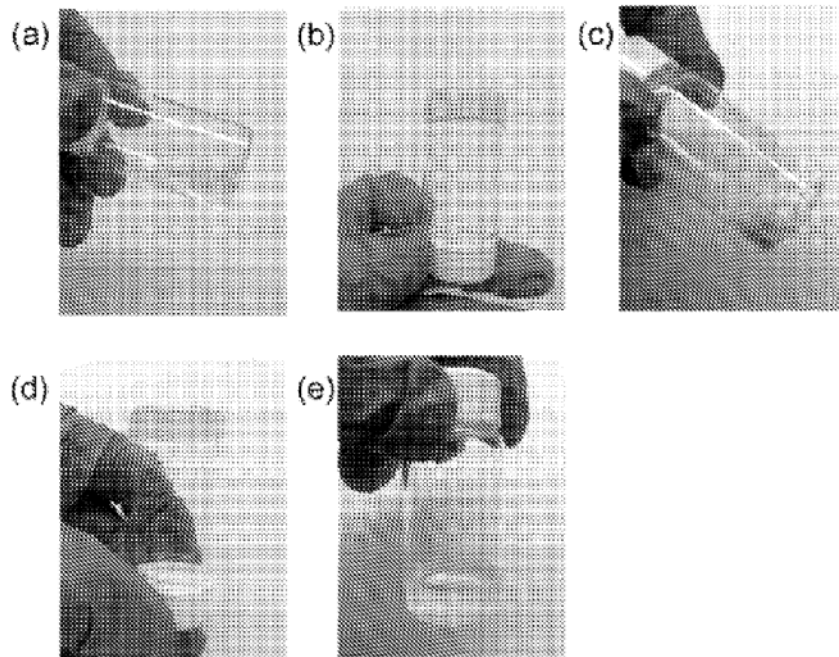


Figura 11(a-e)

Calor a 70 °C, 30 min (n = 12); p **<0,01, ***<0,001

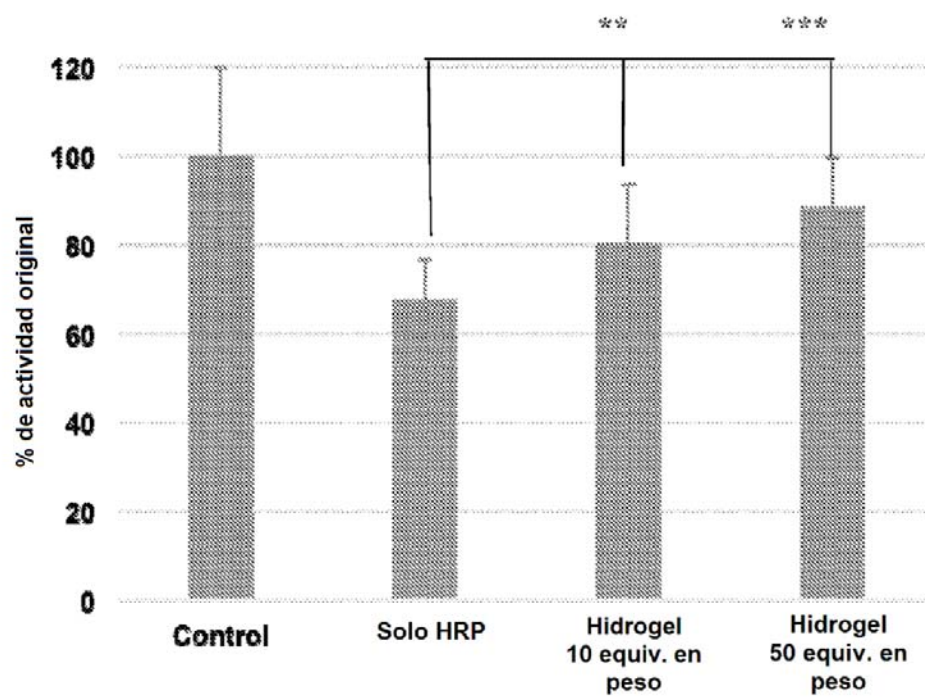


Figura 12

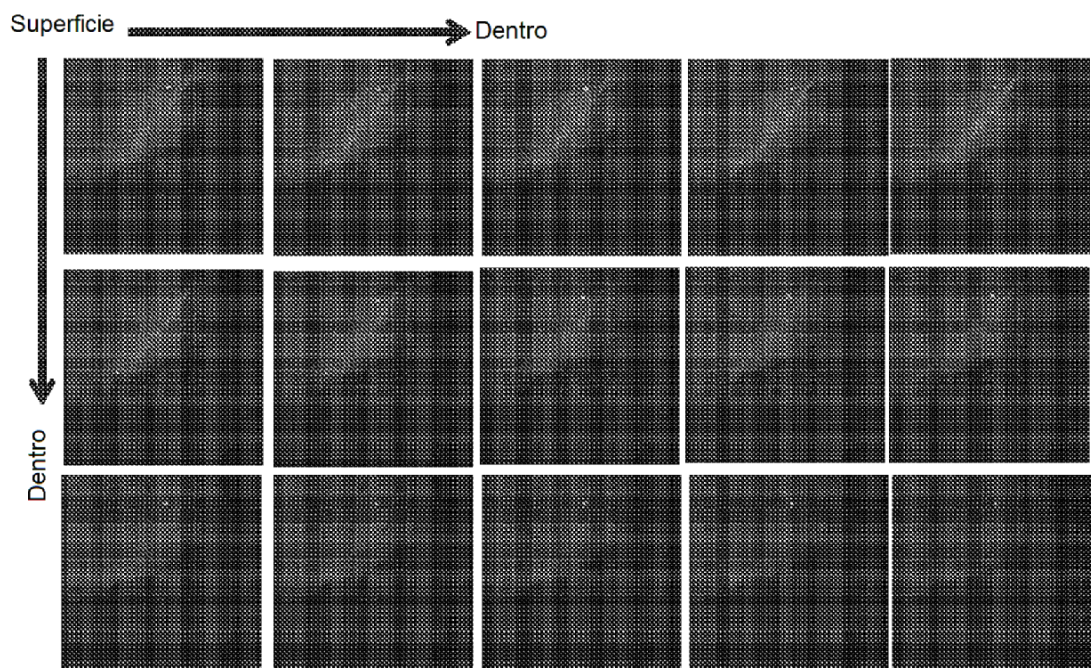


Figura 13

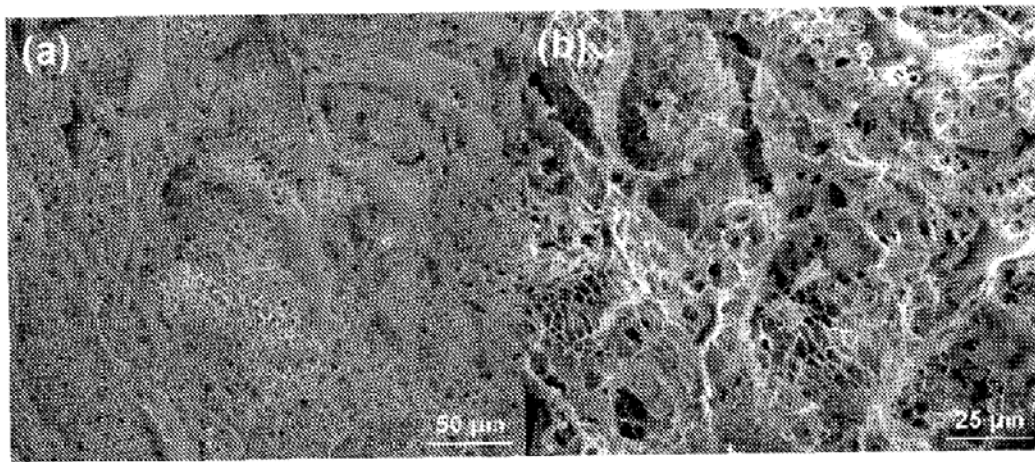


Figura 14 (a y b)

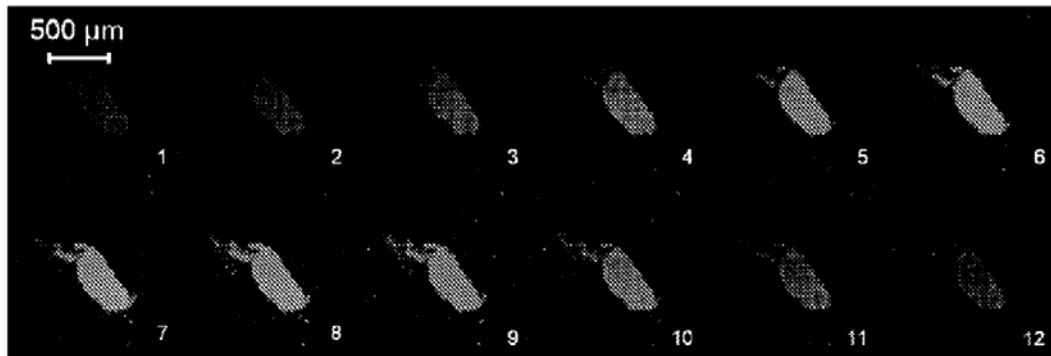


Figura 15

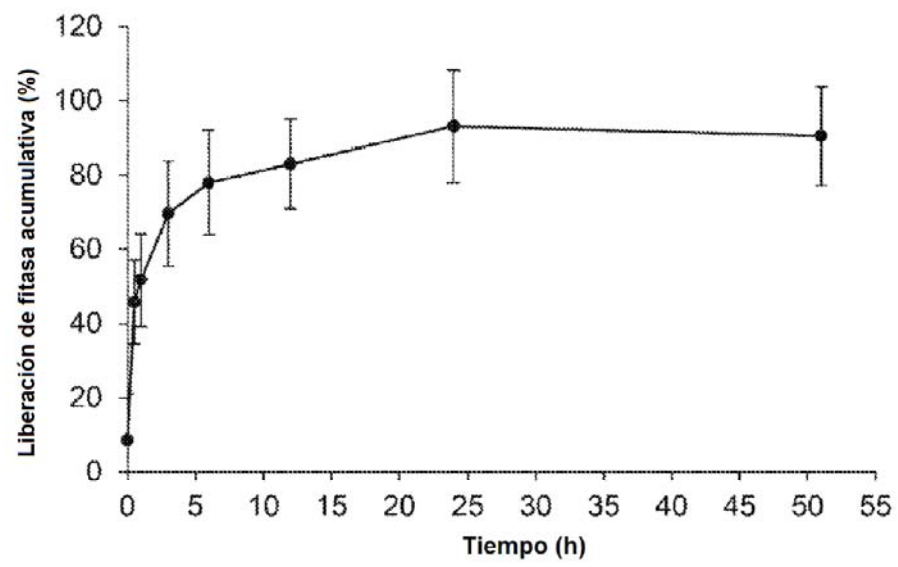


Figura 16

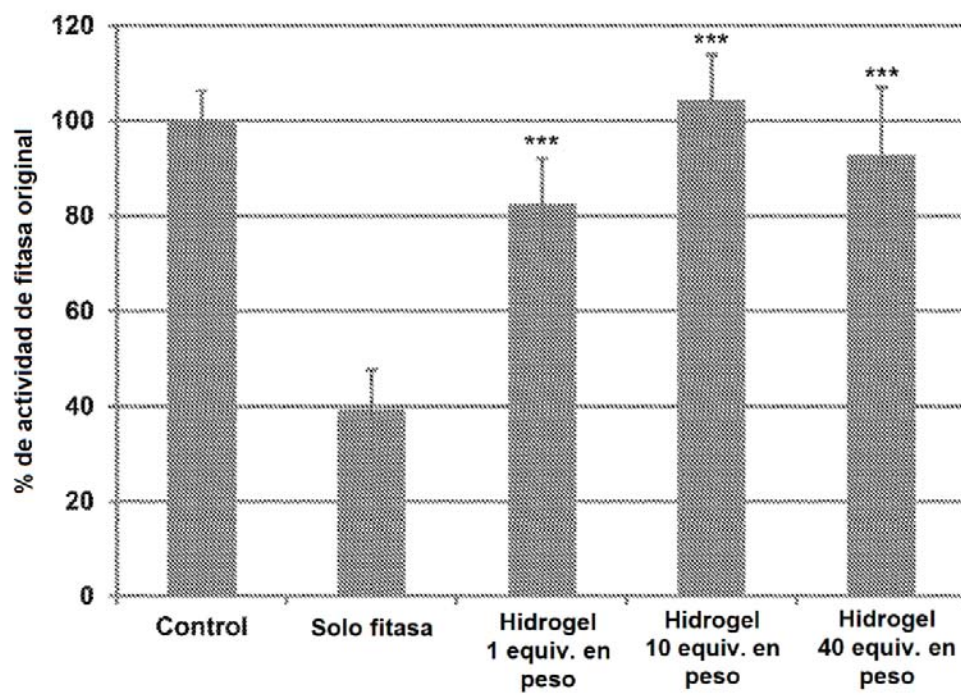


Figura 17

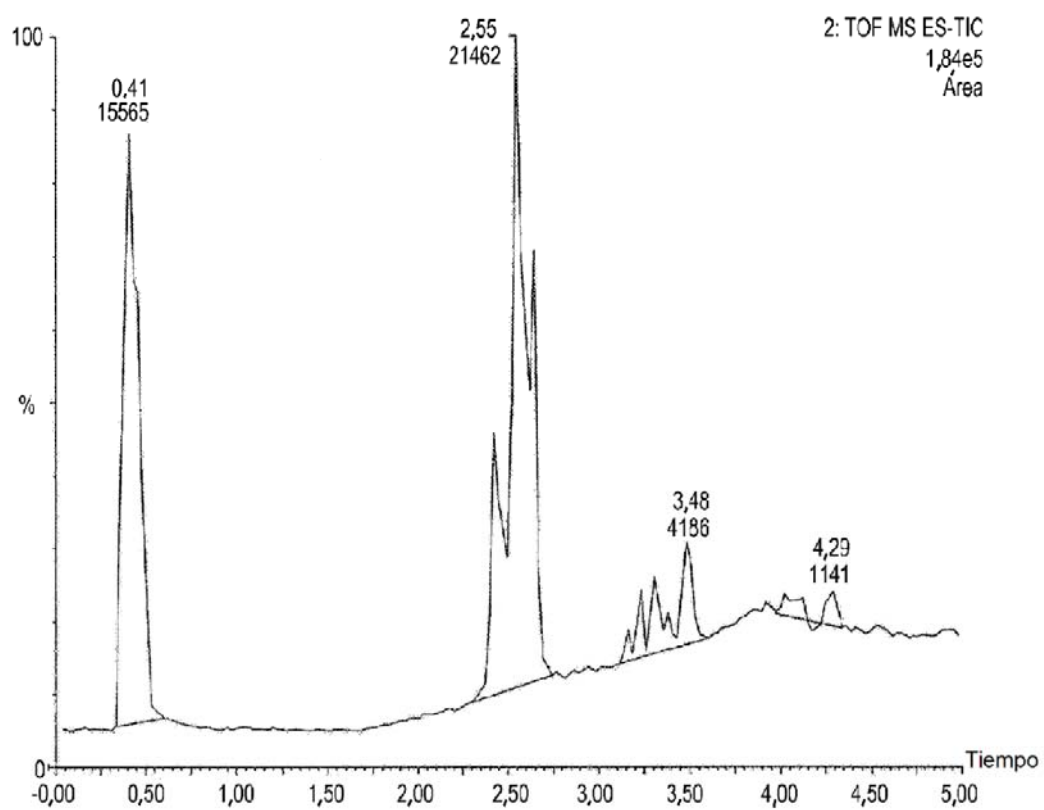


FIGURA 18

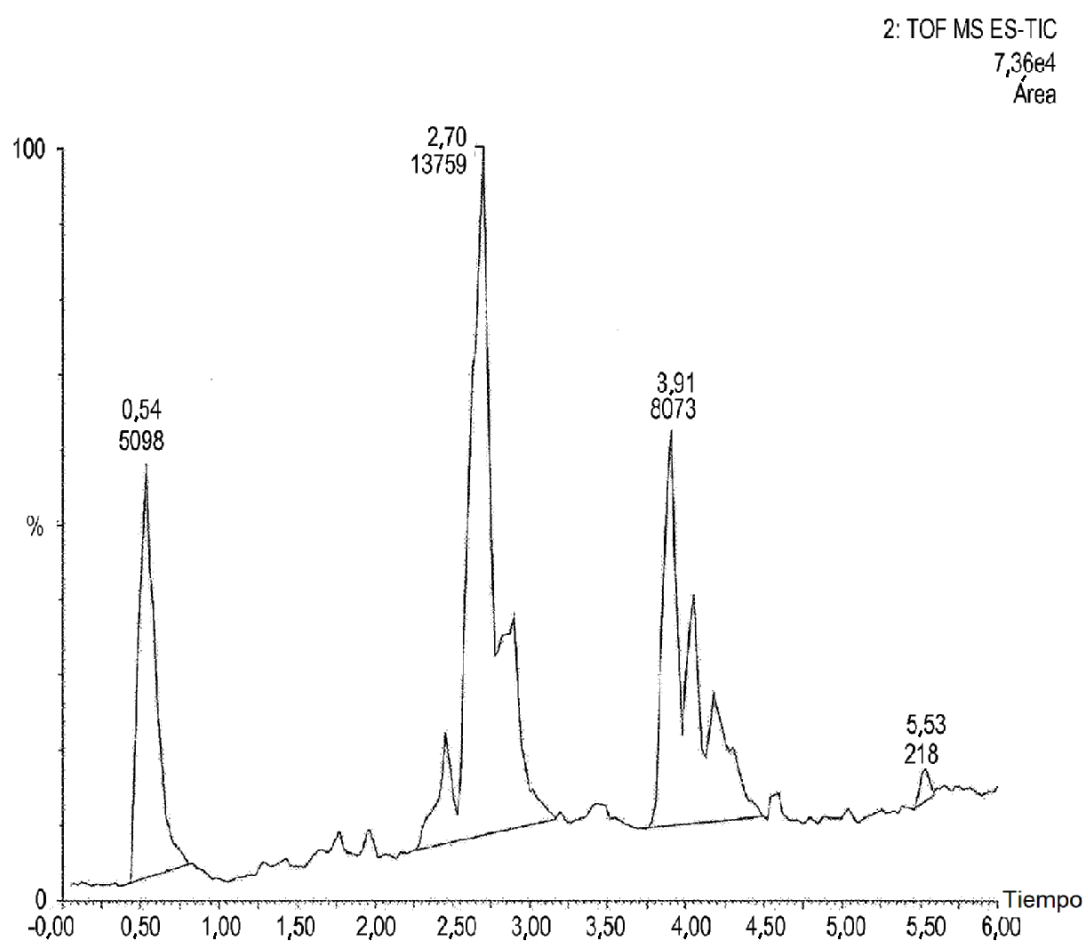


FIGURA 19

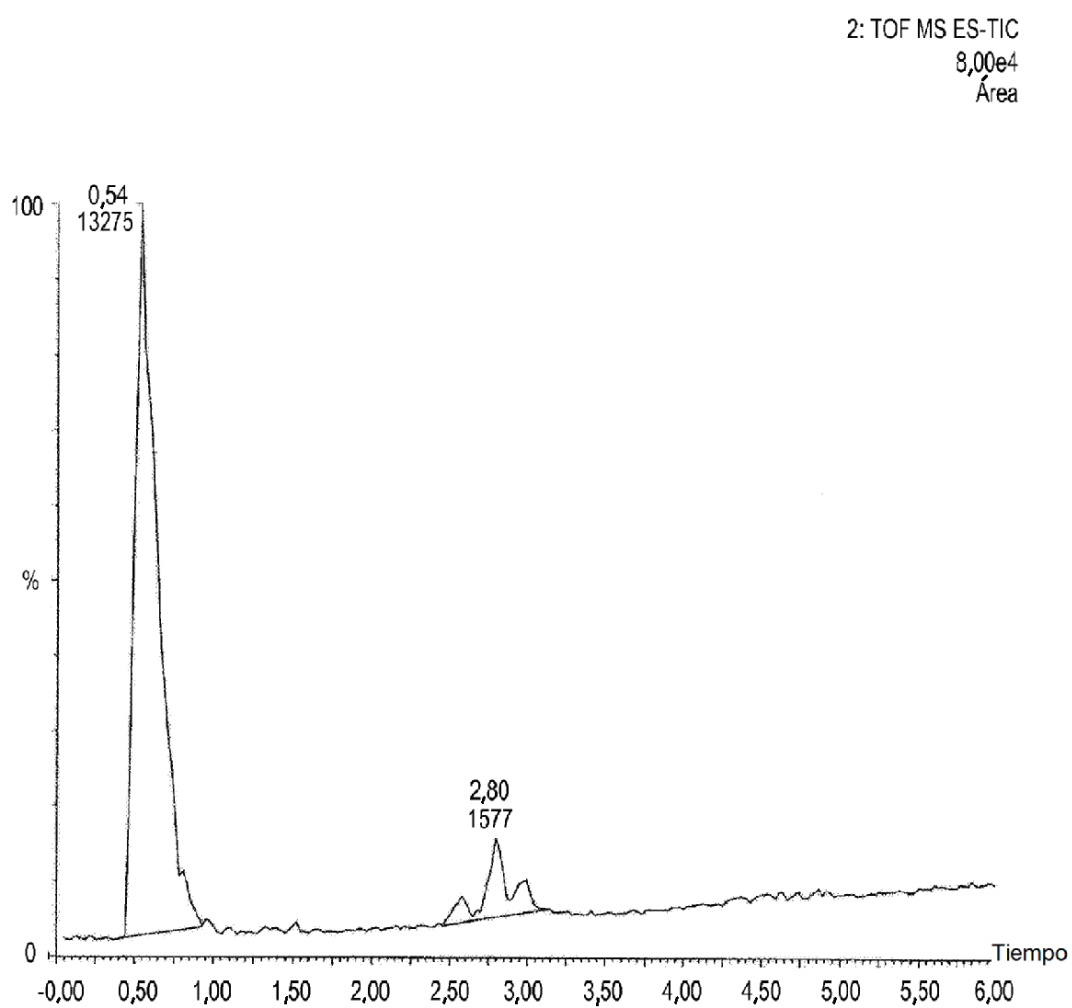


FIGURA 20

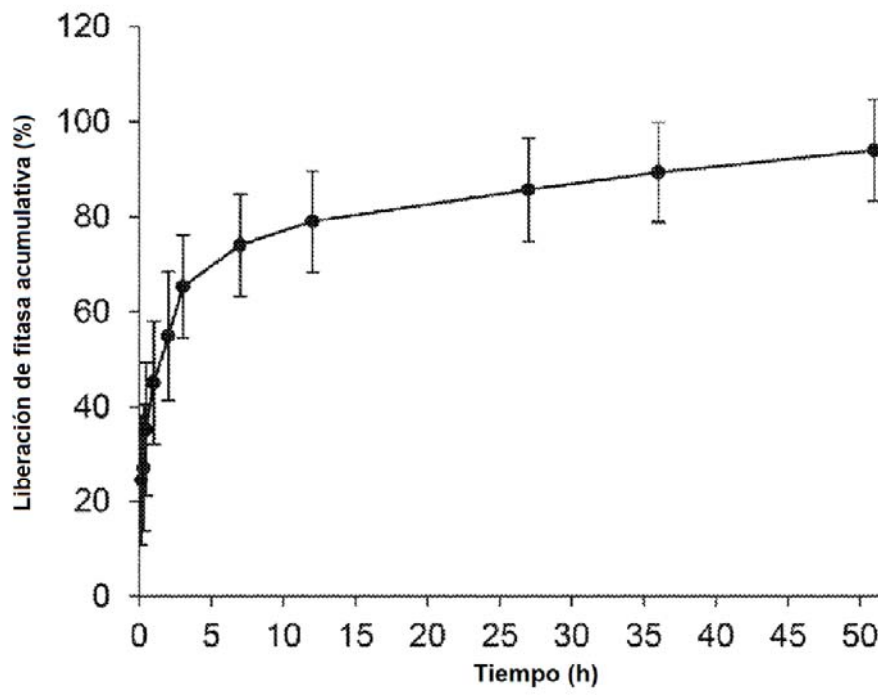


Figura 21

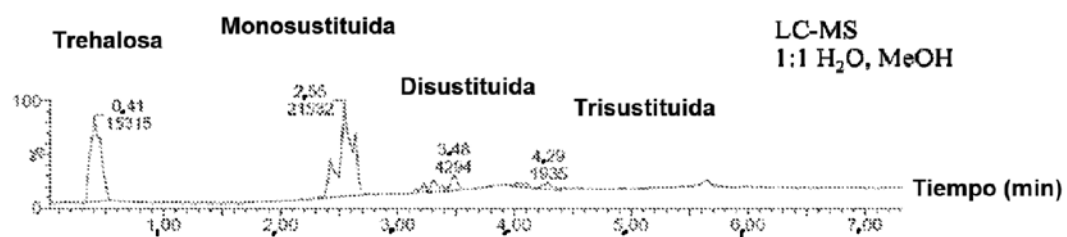


Figura 22