

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 579**

51 Int. Cl.:

**C07H 17/04** (2006.01)

**A61K 31/7048** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/US2013/023235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13112897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13741600 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2807177**

54 Título: **Estabilización de biomoléculas con polímeros de azúcar**

30 Prioridad:

**27.01.2012 US 201261591729 P**  
**18.04.2012 US 201261635159 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2020**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)**  
**1111 Franklin Street, 12th Floor**  
**Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**MAYNARD, HEATHER, D.;**  
**MANCINI, ROCK, J.;**  
**LEE, JUNEYOUNG y**  
**LIN, EN-WEI**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 763 579 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

Estabilización de biomoléculas con polímeros de azúcar

5 **Campo de la invención**

Se divulgan composiciones y métodos para estabilizar biomoléculas. Específicamente, las composiciones incluyen nuevos homopolímeros o copolímeros a base de trehalosa conjugados con o añadidos de forma no covalente a biomoléculas, en las que los homopolímeros o copolímeros protegen y/o estabilizan las biomoléculas.

10

**Antecedentes de la invención**

Existe un interés considerable en las proteínas, como productos terapéuticos y como reactivos bioquímicos y químicos. Sin embargo, la mayoría de las proteínas son inherentemente inestables y se degradan con el almacenamiento, el transporte y el uso, lo que requiere temperaturas reguladas, solvatación controlada, y la adición de moléculas transportadoras que pueden necesitar eliminarse. También se sabe que las proteínas se desnaturalizan debido a tensiones físicas o químicas tal como desecación, calor, luz y cambio de pH, lo que complica aún más la aplicación de ciertas biomoléculas.

15

Si bien la unión de poli(etilenglicol) (PEG) a las proteínas se ha utilizado ampliamente para aumentar la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de las proteínas terapéuticas al reducir el acceso de las enzimas proteolíticas y el cribado a través de los sistemas de filtración renal, la PEGilación por sí sola normalmente no aumenta significativamente la estabilidad proteica con respecto a la temperatura, la desecación y el almacenamiento.

20

En la naturaleza, muchas plantas y animales padecen estrés por deshidratación completa al acumular grandes cantidades de azúcar. Por ejemplo, se sabe que los disacáridos de glucosa alfa, de unión a alfa, imparten una estabilidad inusual a los organismos que toleran la anhidrobiosis (desecación) y la criobiosis (baja temperatura) al proteger las células y las proteínas. Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de agentes que sean más eficaces para estabilizar y proteger las biomoléculas contra la degradación tras la exposición al estrés ambiental durante periodos prolongados de tiempo.

25

30

La trehalosa se ha descrito como un excipiente en formulaciones de proteínas terapéuticas. La patente de EE.UU. (US 6.991.790) describe el uso de trehalosa y otros disacáridos junto con tensioactivos para estabilizar las formulaciones de anticuerpos durante hasta dos años. En particular, se dirigió anti-CD20 para su uso en el tratamiento del linfoma de linfocitos B. La patente de EE.UU. US 6.821.515 resume la trehalosa utilizada en una relación alta (100-600:1) para estabilizar proteínas o anticuerpos contra la liofilización. En particular, anti-HER2 puede reconstituirse con una pérdida mínima de actividad para el tratamiento del cáncer de mama. También se ha descrito que la trehalosa aumenta la solubilidad de los polipéptidos en soluciones acuosas, incluidas las soluciones acuosas que contienen disolventes orgánicos.

35

40

La trehalosa se ha empleado en aplicaciones de dosificación sólida/comprimidos. Las Patentes de EE.UU. US 6.589.554, US 7.074.428 y US 7.575.762 describen el uso de trehalosa como aglutinante para comprimidos sólidos de desintegración rápida, así como para liberación sostenida, para su uso en la cavidad bucal fabricando formulaciones sólidas de tiempos de liberación y dureza variables. Las Patentes de EE.UU. US 7.425.341, US 6.740.339, US 6.455.053 y US 5.762.961 divulgan la trehalosa utilizada como aglutinante o diluyente en la composición de un comprimido sólido de disolución rápida a veces junto con otros polioles tales como derivados de celulosa. Las Patentes de EE.UU. US 5.958.455 y US 6.194.001 resumen la formulación general de comprimidos sólidos con trehalosa y la formulación para un comprimido de amoxicilina.

45

La trehalosa se usó como excipiente en un proceso de congelación por pulverización para la producción de comprimidos sólidos (US 4.762.857) y también se usó en un polvo que se administra por inhalación (US 7.785.631). La trehalosa cambia el sabor de un principio activo de sabor amargo (US 6.998.139).

50

La trehalosa se ha utilizado para conservar células, tejidos u organismos completos en las siguientes patentes: Se describió la trehalosa para estabilizar las células eucariotas que se han inmovilizado especialmente en una matriz de soporte para la crioconservación (documento US 7.314.755). Las patentes de EE.UU. US 7.169.606 y US 6.528.309 resumen las plaquetas sanguíneas que se estabilizan para la crioconservación a través de la trehalosa que se introduce con diversos métodos, temperaturas y presiones. Las patentes de EE.UU. US 6.770.478 y US 4.806.343 resumen los glóbulos rojos y las proteínas en sangre artificial conservada mediante la adición de trehalosa con o sin iones metálicos antes de la liofilización. Las patentes de EE.UU. US 7.270.946, US 6.528.309 y US 5.827.741 divulgan métodos para estabilizar células de mamífero para la liofilización y crioconservación, respectivamente, usando trehalosa como excipiente. Las bacterias se han conservado utilizando trehalosa en el medio (US 6.610.531). Las patentes de EE.UU. US 6.475.716 y US 6.653.062 describen la conservación de órganos completos con trehalosa y una solución de conservación de trehalosa generalmente aplicable a productos biológicos, respectivamente. La trehalosa combinada con ácidos o etanol biológicamente seguros se usó para prolongar la vida útil de diversos productos, incluidos productos farmacéuticos (documento US 6.005.100).

55

60

65

La trehalosa también se ha descrito en diversas administraciones y entregas. Algunos ejemplos son para el tratamiento de la osteoporosis (documento US 6.440.446), el tratamiento de la insuficiencia articular o para mejorar la circulación sanguínea (documentos US 7.214.667 y US 5.981.498), para uso oftálmico (documento US 6.555.526), para la liberación controlada de péptidos o proteínas de trehalosa vítrea (documento US 6.187.330), y para la administración de partículas de trehalosa a las células (documento US 5.840.878).

Anteriormente, los materiales a base de trehalosa se han producido como redes de polímeros reticulados que incluyen resinas termoestables de trehalosa vinilbencil éter polisustituidas (Teramoto y Shibata, 2004). Lograr polímeros lineales de trehalosa es un reto, ya que los centros anoméricos son relativamente poco reactivos debido al enlace glucosídico 1,1 (Wolfenden y Yuan, 2008). Por lo tanto, las rutas sintéticas típicas para producir monómeros a base de trehalosa contienen varias etapas de protección y desprotección, ya sea mediante el uso de monómeros bifuncionales dirigidos a las posiciones 6,6', o mediante la producción de mezclas de regioisómeros que no están bien definidos. Por ejemplo, una estrategia sencilla para sintetizar polímeros lineales de trehalosa se informó por primera vez en 1979, pero la selectividad para formar un polímero lineal frente al ramificado no estaba clara en ese momento (Kurita, Hirakawa, et al., 1979).

La polimerización de la trehalosa de tipo diamino se exploró para superar el problema de la ramificación, pero el proceso general fue más complicado (Kurita, Masuda, et al., 1994). La acetilización (Teramoto, Arai, et al., 2004), las enzimas (Park, Kim, et al., 2000), las reacciones de Diels-Alder (Teramoto, Arai, et al., 2006), y la química de clic (Srinivaschari, Liu, et al., 2006 y 2007) se han aprovechado para sintetizar polímeros lineales a base de trehalosa, extendiéndose el estudio posterior a los sistemas biológicos. Sin embargo, investigaciones y patentes anteriores describieron reacciones de incorporación de trehalosa en el esqueleto del polímero en lugar de como una cadena lateral. Los polímeros con trehalosa en el esqueleto no pueden prepararse de tal manera que tengan grupos terminales para la unión a las biomoléculas. Además, los polímeros con trehalosa en el esqueleto no pueden prepararse con distribuciones estrechas de peso molecular. Adicionalmente, debido a que los alcoholes son importantes para las propiedades de hidratación y protectoras, pueden no proteger las biomoléculas, así como un polímero de cadena lateral lineal.

Aunque Kitagawa y sus colaboradores describieron un polímero de cadena lateral de trehalosa (Kitagawa, Chalermisrachai, et al., 1999), los polímeros se sintetizaron mediante síntesis enzimática. La síntesis enzimática es extremadamente difícil de ampliar. Los polímeros se prepararon por polimerización por radicales libres, y la reacción no permitió la síntesis de un grupo terminal reactivo para la conjugación con biomoléculas y la reacción no preparó polímeros con distribuciones estrechas de peso molecular. Además, los monómeros se sintetizaron con adipatos de divinilo en exceso y no se eliminaron las trehalosas bis-funcionalizadas formadas. Por lo tanto, es probable que los polímeros preparados sean una mezcla de productos que contengan materiales reticulados. Finalmente, los polímeros no se usaron para estabilizar las biomoléculas ni se conjugaron con proteínas u otras biomoléculas.

Se describió un monómero en la patente de EE.UU. US 5.856.416 con el objetivo de obtener redes reticuladas para su uso en lentes de contacto. Adicionalmente, en el documento N.º de serie de EE.UU. 12/134.556, se reivindicó que los polímeros de condensación de trehalosa estabilizaban principios biológicamente activos, en particular ácidos nucleicos en mezclas. Los polímeros contienen trehalosa como parte del esqueleto. Además, los polímeros de condensación descritos en la solicitud de patente no pueden prepararse con grupos terminales para conjugarse con proteínas y no pueden prepararse con distribuciones estrechas de peso molecular.

Se sabe que la PEGilación o unión de polietilenglicol (PEG) o polímeros de cadena lateral de PEG potencia las propiedades farmacológicas, por ejemplo, protegiendo las biomoléculas de la degradación enzimática (Lyczak y Morrison, 1994; Syed, Schuyler, et al., 1997; Cohen, Yoshioka, et al., 1991). La PEGilación por sí sola típicamente no aumenta significativamente la estabilidad de la proteína a la temperatura, la desecación y el almacenamiento. Recientemente se informó que la poli(carboxbetaína), un polizwitterión, se puede unir a las proteínas para mejorar la estabilidad térmica de las proteínas (Keefe y Jiang, 2012; Yang, Zhang, et al., 2009). Recientemente, Recientemente, los Solicitantes divulgaron polímeros a base de poli(sulfonato de estireno) que estabilizan las proteínas de unión a heparina con respecto a los factores estresantes ambientales (documento PCT/US 12/66905; Nguyen, Kim, et al., 2013).

Neri et al (Microbiol Immunol, 51(6), 581-592 (2007) divulgan la actividad neutralizante de los modelos polivalentes Gb<sub>3</sub>, Gb<sub>2</sub> y Galacto-trehalosa contra la toxina shiga. Específicamente incluye la divulgación de copolímeros que comprenden una cadena lateral de trehalosa o galacto-trehalosa.

Dohi et al (Organic letters, 2002, vol 4, n.º 3, págs. 355-357) divulgan el diseño molecular y el potencial biológico de la trehalosa de tipo galacto como una toxina shiga no natural. Específicamente, divulga la síntesis de un modelo de agrupación de galacto-trehalosa.

Mancini et al (J. Am. Chem. Soc, 2012,134, pág. 8474 - 8479, publicado después de las fechas de prioridad reivindicadas), divulgan glucopolímeros de trehalosa para la estabilización de conjugados de proteínas con respecto a factores estresantes ambientales.

El documento US2009/0124534 divulga polímeros de clic de trehalosa para la administración de moléculas biológicamente activas.

5 El documento WO99/55310 divulga cristales de proteínas estabilizadas, incluyendo formulaciones que pueden comprender trehalosa.

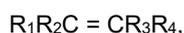
Cho et al, (International J. of Phamaceutics, 2011, vol 416, págs. 77-84) divulgan la evaluación de la estabilidad de proteínas y la permeabilidad *in vitro* de micropartículas a base de polisacáridos liofilizados para la administración intranasal de proteínas.

10 Potier et al (Tetrahedron Asymmetry 12 (2001) págs. 2409-2419) divulgan la esterificación regioselectiva catalizada por proteinasa N de sacarosa y otros mono y disacáridos. Esto incluye una transesterificación de trehalosa para producir 6-O-metacrilato de trehalosa.

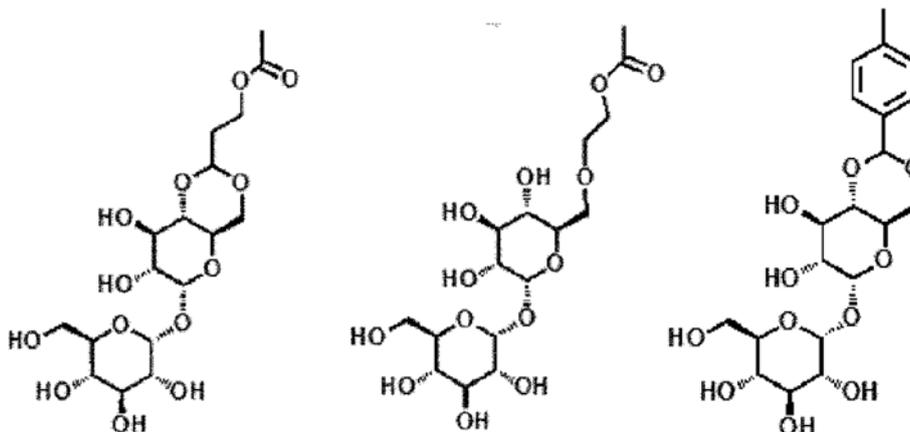
15 En la técnica se necesita un homopolímero o copolímero con trehalosa de cadena lateral que tenga capacidades de protección deseables.

### Compendio de la invención

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un monómero para su uso en la fabricación de un homopolímero o un copolímero para estabilizar una biomolécula del monómero que tiene la estructura general:



25 en la que  $R_1$  y  $R_2$  son hidrógeno,  $R_3$  es hidrógeno o metilo y  $R_4$  es una cadena lateral de la fórmula -L-trehalosa, en la que L es un enlazador que une trehalosa al monómero y L-trehalosa tiene una estructura seleccionada de:

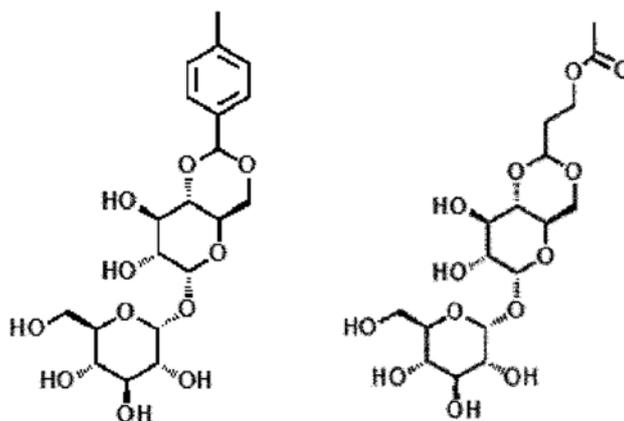


30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un homopolímero o copolímero que comprende la estructura general:



35 en la que  $R_1$  y  $R_2$  son hidrógeno,  $R_3$  es hidrógeno o metilo, y  $R_4$  es una cadena lateral de la fórmula -L-trehalosa, en la que L es un enlazador que une trehalosa al monómero a través de al menos uno de los grupos hidroxilo (-OH) de trehalosa, en la que L es  $-(COO)-(CH_2)_n-$  ( $n=0-6$ ), o en la que la -L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura seleccionada de:

40



En una realización específica, el homopolímero o copolímero comprende la estructura general de  $R_5-[R_1R_2C - CR_3R_4]_n-R_6$ , en la que  $R_5$  y  $R_6$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -Alquilo, -Alqueno, -Alquino, -arilo,  $-C(CN)(Alquilo)_2$ ,  $-S_2C-S-Alquilo$ ,  $-C(CO)(Alquil)-(OCH_2CH_2)_n-COO-CH_2CH_2-CO-Alquilo$  ( $n=1-10$ ), y biomoléculas.

En una realización específica, el componente amina se selecciona del grupo que consiste en proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN, ARN, ARNs, y composiciones farmacéuticas.

En una realización específica del monómero y el polímero, la -L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura específica como se muestra a continuación.

En otra realización específica, los polímeros tienen las estructuras específicas que se muestran a continuación.

En una realización específica del monómero y el polímero, tres de  $R_1-R_4$  son hidrógenos.

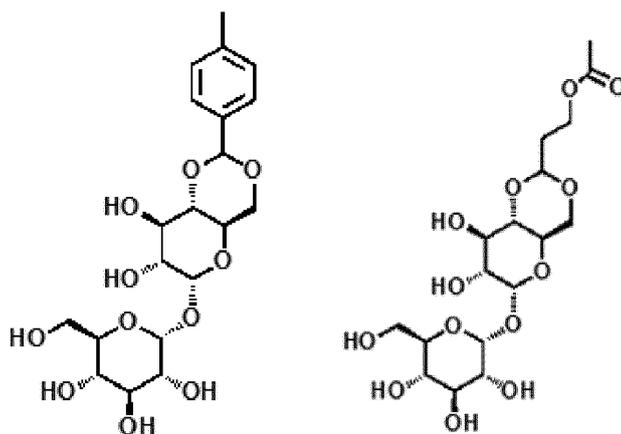
En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un homopolímero o copolímero para estabilizar una biomolécula, comprendiendo el método las etapas de (a) incorporar una cadena lateral que comprende una molécula de trehalosa en un monómero polimerizable y (b) polimerizar el monómero resultante para obtener un polímero siguiendo cualquiera de los métodos anteriores. En una realización específica, el homopolímero o copolímero se genera a través de síntesis química. En otra realización específica, el monómero polimerizable se selecciona del grupo que consiste en un monómero de estireno, un monómero de acrilato, un monómero de metacrilato, un monómero de acrilamida, un monómero de metacrilamida, un monómero de vinilo, un monómero de norborenilo, y un monómero de alqueno de ciclo tensionado.

En aún otra realización específica del método, la etapa de polimerizar el monómero resultante para obtener un homopolímero o copolímero se realiza mediante cualquiera de, pero sin limitación, las siguientes técnicas; polimerización reversible de adición-fragmentación (RAFT), polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización por radicales libres mediada por cianóxilo, polimerización radicalaria convencional, o polimerización de apertura de anillo (ROMP).

En aún otra realización específica del método, uno o más de los grupos hidroxilo de la trehalosa están protegidos por la formación de un acetal o un éter.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para estabilizar una biomolécula que comprende la etapa de conjugar la biomolécula con un homopolímero o copolímero de un monómero que tiene las estructuras anteriores o que se produce usando cualquiera de los métodos anteriores. En una realización específica, la biomolécula se conjuga covalentemente con el esqueleto del homopolímero o copolímero.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una biomolécula conjugada con un homopolímero o copolímero que comprende la estructura general de  $-[R_1R_2C - CR_3R_4]_n-$ , en la que  $R_1$  y  $R_2$  son hidrógeno,  $R_3$  es hidrógeno o metilo, y  $R_4$  es una cadena lateral de la fórmula -L-trehalosa, en la que L es un enlazador que une la trehalosa a través de al menos uno de los grupos hidroxilo (-OH) de trehalosa, en la que L se selecciona del grupo que consiste en,  $-(COO)-(CH_2)_n-$  ( $n=0-6$ ), o en la que la -L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura seleccionada de:



y en la que el homopolímero o copolímero comprende además un agente de transferencia de cadena reactivo de biomolécula unido a uno o ambos extremos del esqueleto del homopolímero o copolímero.

5

Estas y otras características de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

#### Breve descripción de los dibujos

10

La Figura 1a, b es una serie de espectros de RMN obtenidos por a)  $^{13}\text{C}$  RMN, b)  $^1\text{H}$  RMN, del glucomonómero **2** (D6-DMSO).

La Figura 2 es una espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN del polímero de trehalosa **4** (D6-DMSO).

La Figura 3 es una espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN de glucopolímero hecha en presencia de **5** (D6-DMSO).

15

La Figura 4a, b, c, d y e muestran a) la traza FPLC de la conjugación de la lisozima tiolada **LyzSH** con el glucopolímero reactivo de tiol **6** monitorizado por conductividad, y la absorbancia UV a 254 nm y 280 nm con b) la actividad correspondiente de las fracciones FPLC recogidas en la región del conjugado **Lyz-6**. SDS-PAGE de las fracciones FPLC 6-11 que contienen **Lyz-6** en condiciones no reductoras teñidas con c) yodo o d) coomassie junto con e) las mismas fracciones ejecutadas en condiciones reductoras.

20

La Figura 5 muestra la estabilidad de desecación de la lisozima de tipo silvestre con y sin trehalosa añadida y el polímero y conjugado de **Lyz-6**. Las muestras se trataron con 10 ciclos de liofilización y se compararon con una proteína no tratada. (\*,  $\psi$ ,  $\gamma$ ,  $p < 0,05$  en comparación con la lisozima de tipo silvestre, la lisozima tratada con 1 equiv. de trehalosa y la lisozima tratada con 1 equiv. de polímero respectivamente). Cabe apreciar que, en estos experimentos, la lisozima estaba considerablemente más concentrada que en la Figura 7.

25

La Figura 6 muestra la estabilidad al calor (expuesta a una carga de calor de 90 °C durante 3 h) de la lisozima de tipo silvestre, conjugado de lisozima-gluco-polímero **Lyz-6**, lisozima de tipo silvestre formulada con diversas concentraciones de glucopolímero o trehalosa. (\*,  $\psi$   $p < 0,05$  en comparación con la lisozima de tipo silvestre y la lisozima tratada con 100 equiv. de trehalosa, respectivamente). Cabe apreciar que, en estos experimentos, la lisozima estaba considerablemente más concentrada que en la Figura 8.

30

La Figura 7 es un diagrama que muestra la actividad del conjugado lisozima-gluco-polímero, lisozima de tipo silvestre con glucopolímero (1 o 100 equiv. en relación con la lisozima), o lisozima de tipo silvestre con trehalosa (1 o 100 equiv. en relación con las unidades de monómero polimérico) como excipientes expuestos a 10 ciclos de liofilización. Los datos mostrados se repiten 6 veces con  $p < 0,01$  para todas las muestras de polímeros 100x y de conjugados en relación con el tipo silvestre.

35

La Figura 8 es un diagrama que muestra la actividad del conjugado lisozima-gluco-polímero, lisozima de tipo silvestre con glucopolímero (1 o 100 equiv. en relación con la lisozima), o lisozima de tipo silvestre con trehalosa (1 o 100 equiv. en relación con las unidades de monómero polimérico) como excipientes expuestos a una carga de calor de 90 °C durante 1 hora. Los datos mostrados se repiten 6 veces con  $p < 0,001$  para todas las muestras de polímeros y conjugados en relación con el tipo silvestre.

40

La Figura 9 es un conjunto de gráficos que muestran la espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN de polímeros de trehalosa (Poli 1-4) (D6-DMSO).

La Figura 10 es un conjunto de gráficos que muestran la espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN de polímeros a base de trehalosa (Poli 5-8) (D6-DMSO).

45

La Figura 11 es un conjunto de gráficos que muestran la traza de cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) de la conjugación de lisozima tiolada con glucopolímeros reactivos de tiol (poli 5-8) monitorizados por conductividad, y absorbancia UV a 254 nm y 280 nm con trazas FPLC correspondientes de lisozimas nativas y sin polímero. Los recuadros de color verde destacan las fracciones concentradas para su uso en experimentos posteriores. Estas fracciones se escogieron específicamente para que no contuvieran polímero residual de Lyz.

50

Las Figuras 12a y b son un conjunto de gráficos que muestran la retención de actividad de la lisozima estabilizada mediante la adición de PEG (1 o 100 equiv.) o el polímero de trehalosa (1 o 100 equiv.) en relación con el grado de polimerización estresada por a) 10 ciclos de liofilización o b) una carga de calor de 90 °C durante 1 hora.

La Figura 13 es un conjunto de gráficos que muestran la retención de actividad de la lisozima estabilizada mediante la adición de PEG (1 o 100 equiv.) o el polímero de trehalosa (1 o 100 equiv.) en relación con el peso molecular (Mn) estresada por a) 10 ciclos de liofilización o b) una carga de calor de 90 °C durante 1 hora.

La Figura 14 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN de tritocarbonato de piridildisulfuro (**3**).

5 La Figura 15 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN de 2-(2-(2-(piridin-2-ildisulfanil)etoxi)etoxi)etanol (**4**).

La Figura 16 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN del agente de transferencia de cadena reactivo de tiol (**CTA 5**).

La Figura 17 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del polímero **P1** (en D<sub>6</sub>DMSO).

10 La Figura 18 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del monómero para formar el polímero **P2** (en D<sub>6</sub>DMSO).

La Figura 19 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>13</sup>C RMN del monómero para formar el polímero **P2** (en D<sub>6</sub>DMSO).

La Figura 20 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del polímero **P2** (en D<sub>6</sub>DMSO).

15 La Figura 21 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del monómero para formar el polímero **P3** (en D<sub>2</sub>O).

La Figura 22 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>13</sup>C RMN del monómero para formar el polímero **P3** (en D<sub>2</sub>O).

La Figura 23 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del polímero **P3** (en D<sub>2</sub>O).

La Figura 24 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del monómero para formar el polímero **P4'** (en CDCl<sub>3</sub>).

20 La Figura 25 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>13</sup>C RMN del monómero para formar el polímero **P4'** (en CDCl<sub>3</sub>).

La Figura 26 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del polímero **P4'** (en CDCl<sub>3</sub>).

La Figura 27 es un gráfico que muestra los espectros de <sup>1</sup>H del polímero **P4** (en D<sub>2</sub>O).

25 La Figura 28 es un gráfico que muestra la actividad de HRP (75 µg/ml) después de 30 min de calentamiento a 70 °C, sin aditivo, 100 equiv. de **P1**, **P2**, **P3**, **P4**, y 7500 equiv. de trehalosa con respecto a la peroxidasa de rábano picante (HRP).

La Figura 29 es un gráfico que muestra la actividad de glucosa oxidasa (GOX; 100 µg/ml) después de 30 min de calentamiento a 50 °C, sin aditivo, 100 equiv. de **P1**, **P2**, **P3**, **P4**, y 7500 equiv. de trehalosa con respecto a GOX.

30 La Figura 30 es un gráfico que muestra una comparación entre un gel nativo y la insulina con polímeros P1-P3 o trehalosa (T).

Las Figuras 31a y b son un conjunto de gráficos que muestran la actividad de la β-galactosidasa (β-Gal; 100 µg/ml) después del (a) 3<sup>er</sup> y (b) 4<sup>o</sup> ciclos sin aditivo, 100 equiv. de P1, P2, P3, y 7500 equiv. de trehalosa con respecto a β-Gal.

35 La Figura 32 a, b, y c son un conjunto de gráficos que muestran el ensayo de citotoxicidad de **P1-P3**, PEG 20 kDa, y trehalosa con células (a) NIH 3T3, (b) RAW 264,7, (c) HDF, y (d) HUVEC.

Las Figuras 33a y b son un conjunto de gráficos que muestran el efecto de estabilidad del polímero de trehalosa Poli 5, Poli 6, Poli 7 y Poli 8 con respecto a ARNsi. a) PAGE del efecto de RNase ONE hacia ds-ARNsi sin tratar y conjugado **A**, **B**, y **C**. Carril 1: escalera de ADN; carril 2: RNase ONE; carril 3: ds-ARNsi; carril 4: ds-ARNsi con RNase ONE; carril 5: conjugado **A (ARNsi-Poli 5)**; carril 6: conjugado **A (ARNsi-Poli 5)** con RNase ONE; carril 7: conjugado **B (ARNsi-Poli 6)**; carril 8: conjugado **B (ARNsi-Poli 6)** con RNase ONE; carril 9: conjugado **C (ARNsi-Poli 7)**; carril 10: conjugado **C (ARNsi-Poli 8)** con RNase ONE. b) Cuantificación de los conjugados de retención después del tratamiento con RNase ONE. Los datos mostrados se repiten 3 veces.

45 La Figura 34 es un conjunto de gráficos que muestran la PAGE del efecto del suero bovino de ternera (CBS) al 80 % hacia: a) ds-ARNsi desnudo. Carril 1: CBS al 80 %; carril 2: 0 h; carril 3: 1 h; carril 4: 3 h; carril 5: 6 h; carril 6: 24 h; b) ds-ARNsi con adición de 825 equiv. de trehalosa. Carril 1: 1 h; carril 2: 3 h; carril 3: 6 h; carril 4: 24 h; c) ds-ARNsi con adición de 50 equiv. de polímero de trehalosa **Poli 5**. Carril 1: CBS al 80 %; carril 2: 0 h; carril 3: 1 h; carril 4: 3 h; carril 5: 6 h; d) Conjugado A. Carril 1: 0 h; carril 2: 1 h; carril 3: 3 h; carril 4: 6 h.

## 50 Descripción detallada de la invención

### EN GENERAL

55 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 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.

60 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "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/n", "que incluye/n" y "que tiene/n" se pueden usar indistintamente.

65 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto 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.

## LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a un homopolímero o copolímero que estabiliza notablemente las biomoléculas, preferiblemente a los factores estresantes ambientales, ya sea cuando se añaden a las biomoléculas para formar una mezcla o cuando se conjugan covalentemente con biomoléculas. El término "homopolímero" se refiere a un polímero producido a partir de la polimerización de un solo monómero que contiene al menos una cadena lateral de trehalosa. El término "copolímero" se refiere a un polímero derivado de al menos dos monómeros, y al menos uno de los monómeros contiene al menos una cadena lateral de trehalosa. Aunque solo los homopolímeros se analizan en los Ejemplos, un experto con conocimientos ordinarios en la técnica entenderá que la presente invención se extiende a los copolímeros.

Para preparar un copolímero, se polimerizará una mezcla de monómeros de al menos dos monómeros diferentes, al menos uno de los monómeros incluye al menos una cadena lateral de trehalosa. Los métodos para producir homopolímeros serán adecuados para hacer copolímeros.

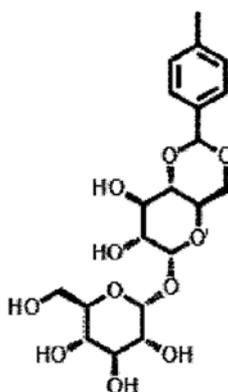
El polímero o copolímero incluye una o más cadenas laterales que comprenden un resto trehalosa. En comparación con la misma concentración de trehalosa, el homopolímero o copolímero es sustancial y sorprendentemente más eficaz que la trehalosa en solitario para estabilizar las biomoléculas. Además, la conjugación del homopolímero o copolímero con la biomolécula mejora significativamente la estabilidad de la biomolécula. En un ejemplo a continuación, se demuestra la estabilización de una proteína para la desecación y el calor.

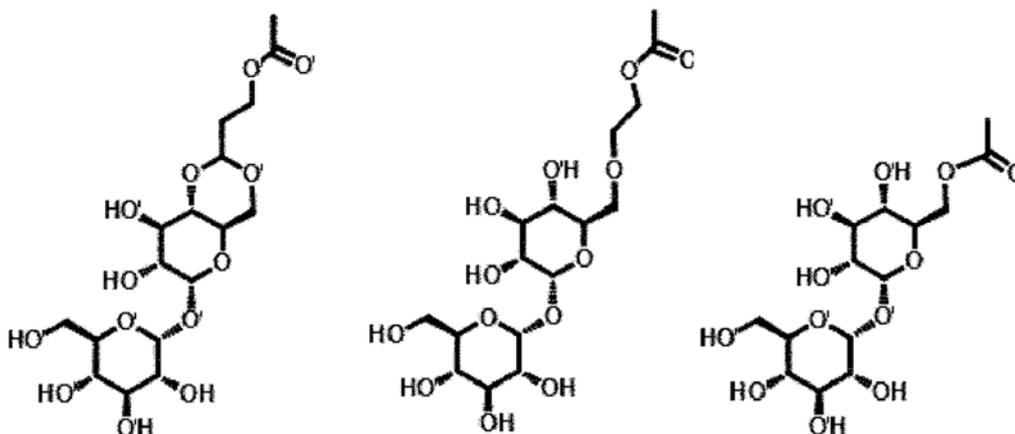
En una realización de la presente invención, el homopolímero o copolímero puede producirse a partir de uno o más de los monómeros que tienen una estructura general de (1)



en la que  $R_1$ - $R_4$  son como se han descrito anteriormente y L es un enlazador que une trehalosa al monómero a través de al menos uno de los grupos hidroxilo (-OH) de trehalosa como se ha descrito anteriormente.

En una realización específica, la -L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:





5 En una realización, el monómero que tiene una estructura general de (1) puede producirse mediante reacciones químicas entre trehalosa y otro monómero que tiene cualquier grupo funcional adecuado. En una realización específica de la presente invención, los grupos funcionales adecuados pueden incluir -OH, -COOH, -COOR, -OR, -CONH<sub>2</sub>, CONHR, y -COX, donde R es un alquilo, alqueniilo, alquinilo, o un grupo arilo, y X es un grupo halógeno.

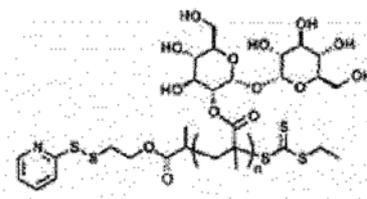
10 En una realización específica de la presente invención, el monómero que puede usarse para producir el monómero con la estructura general de (1) puede seleccionarse del grupo que consiste en un monómero de acrilato y un monómero de metacrilato.

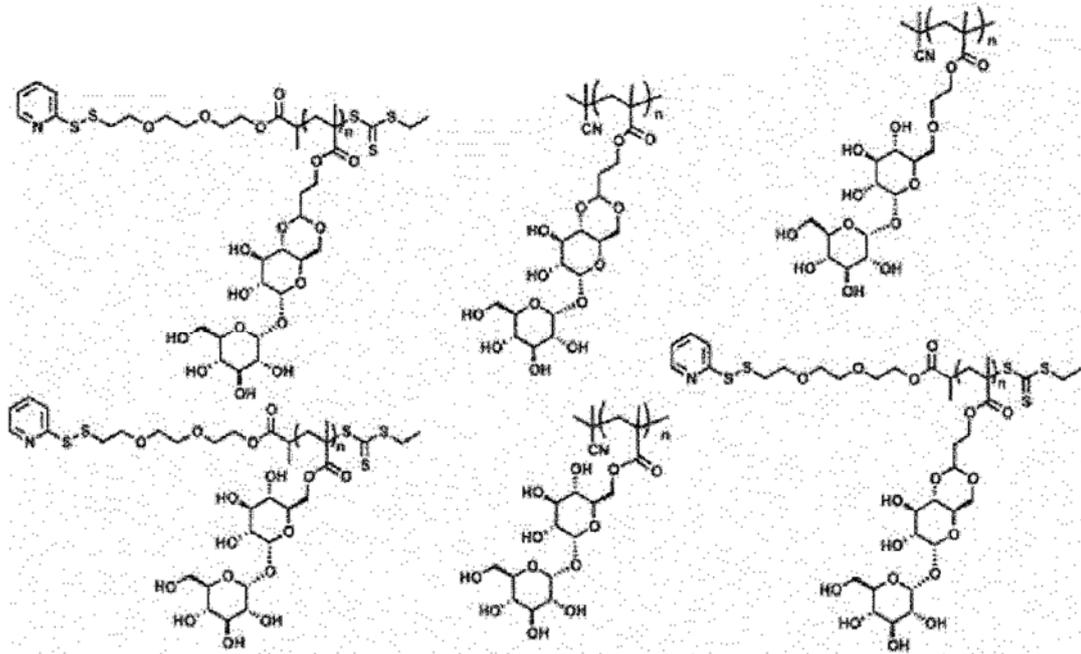
15 En una realización, la presente invención se refiere a un homopolímero o copolímero hecho de uno o más de los monómeros que tienen la estructura general de (1), el homopolímero o copolímero comprende la estructura general de (2):



20 en la que R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> son como se han descrito anteriormente y L es una molécula de enlazador que une trehalosa al monómero a través de al menos uno de los grupos -OH de trehalosa como se ha descrito anteriormente, y en la que R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, los grupos terminales, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -Alquilo, -Alqueniilo, -Alquinilo, -Arilo, -C(CN)(Alquilo)<sub>2</sub>, -S<sub>2</sub>C-S-Alquilo, -C(CO)(Alquil)-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO-Alquilo (n = 1-10), y biomoléculas.

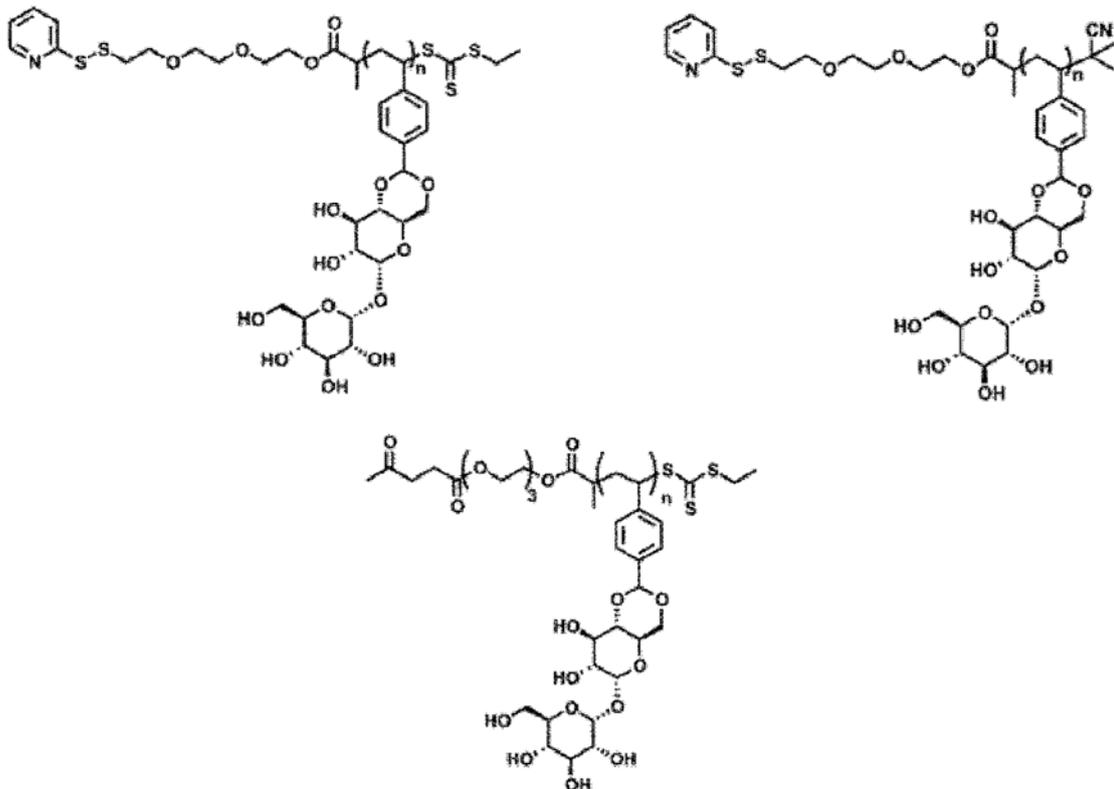
25 En una realización, uno de R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> es un grupo metilo y dos de R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> son hidrógenos, en la que, el homopolímero o copolímero tiene la estructura:

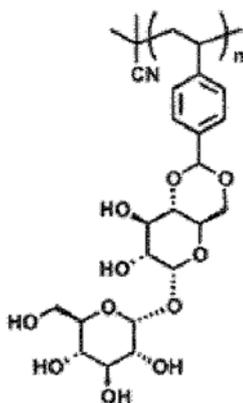




En una realización, tres de R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> son hidrógenos. En una realización específica, el homopolímero o copolímero tiene la estructura:

5





En una realización, el homopolímero o copolímero con la estructura general de (2) puede producirse a partir del monómero con la estructura general de (1) usando cualquier reacción de polimerización adecuada. En otra realización, las reacciones de polimerización pueden incluir polimerización reversible de adición-fragmentación (RAFT), polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización por radicales libres mediada por cianoxilo, polimerización radicalaria convencional, o polimerización de apertura de anillo (ROMP).

En una realización específica, el homopolímero o copolímero con la estructura general de (2) puede producirse a partir del monómero con la estructura general de (1) usando polimerización reversible de adición-fragmentación (RAFT). En otra realización específica, el homopolímero o copolímero con la estructura general de (2) puede producirse a partir del monómero con la estructura general de (1) usando la polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP). Se incluyeron descripciones detalladas de reacciones de polimerización similares en los documentos US 5.789.487 y WO98/01478.

En otra realización, se creará el polímero a través de la producción de polímeros que tienen algunos grupos de enlace, que después se usarán para unir trehalosa para hacer los polímeros deseados que contienen trehalosa.

En algunas realizaciones, los grupos terminales de  $R_5$  y  $R_6$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en disulfuros activados, disulfuro de piridilo, ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, reductores de disulfuro, aceptores de Michael, maleimidias, derivados de maleimida, dihalomaleimidias, grupos vinilo, vinil sulfonas, derivados de acrilóilo, haloacetilo, derivados de haluro de alquilo, aziridinas, agentes de arilación, isotiocianatos, isocianatos, acril azidas, ésteres activos, ésteres de N-hidroxisuccinimida, para-nitrofenil ésteres, cloruros de sulfonilo, aldehídos y glioxales (con o sin aminación reductora), epóxidos (también denominados oxiranos), carbonatos, agentes de arilación, imidoésteres, carbodiimidias, anhídridos, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, diazoacetilos, carbonildiimidazoles, carbonatos, cloroformatos, halógenos de alquilo, isocianatos, aminooxi (hidroxilaminas), hidrazinas, alquinos, derivados de los mismos, y una combinación de los mismos.

En una realización, la presente invención se refiere a un método de aplicación de un homopolímero o copolímero que tiene una estructura de (2) que estabiliza notablemente las biomoléculas a los factores estresantes ambientales cuando se añade a las biomoléculas. En una realización específica de la presente invención, el homopolímero o copolímero puede estar unido covalentemente a biomoléculas o agentes biológicos a través de reacciones químicas entre los grupos terminales y los grupos funcionales en las biomoléculas o agentes biológicos. En una realización específica, el método comprende las etapas de (a) incorporar una cadena lateral que comprende una molécula de trehalosa en un monómero polimerizable; y (b) polimerizar el monómero resultante para obtener un homopolímero o copolímero de acuerdo con una reacción de polimerización adecuada. Las reacciones de polimerización adecuadas pueden incluir polimerización reversible de adición-fragmentación (RAFT), polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización por radicales libres mediada por cianoxilo, polimerización radicalaria convencional, o polimerización de apertura de anillo (ROMP).

En algunas realizaciones, los grupos terminales pueden reaccionar con un tiol libre en el agente biológico. Los ejemplos de dichos grupos terminales pueden incluir, pero sin limitación, disulfuros activados (también llamados reactivos de intercambio de disulfuro de tiol) tales como disulfuro de piridilo, ácido 5-tio-2-nitrobenzoico y reductores de disulfuro, aceptores de Michael tales como maleimidias, derivados de maleimida que incluyen dihalomaleimidias, y grupos vinilo que incluyen vinil sulfonas y derivados de acrilóilo, haloacetilo y otros derivados de haluro de alquilo, aziridinas y agentes de arilación. En una realización preferida, el grupo terminal puede unir agentes biológicos con un enlace disulfuro (-S-S-).

En algunas realizaciones, los grupos terminales pueden reaccionar con una amina libre en el agente biológico. Los ejemplos de dichos grupos terminales pueden incluir, pero sin limitación, isotiocianatos, isocianatos, acril azidas, ésteres activados tales como N-hidroxisuccinimida y para-nitrofenilo, cloruros de sulfonilo, aldehídos y glioxales (con

o sin aminación reductora), epóxidos (también denominados oxiranos), carbonatos, agentes de arilación, imidoésteres, carbodiimidas, y anhídridos.

5 En algunas realizaciones, los aceptores de Michael también pueden reaccionar con aminas, dependiendo de las condiciones de reacción, es decir, condiciones más básicas. Los aceptores de Michael pueden incluir maleimidas, derivados de maleimida que incluyen dihalomaleimidas, y grupos vinilo que incluyen vinil sulfonas y derivados de acrilóilo, haloacetilo y otros derivados de haluro de alquilo, aziridinas y agentes de arilación.

10 En algunas realizaciones, los grupos terminales pueden reaccionar con un grupo carboxilo en los agentes biológicos. Los ejemplos de dichos grupos terminales pueden incluir, pero sin limitación, aminas a través de química de amidación, diazoalcanos y compuestos de diazoacetilo.

15 En algunas realizaciones, los grupos reactivos pueden reaccionar con grupos hidroxilo en los agentes biológicos. Los ejemplos de dichos grupos terminales pueden incluir, pero sin limitación, epóxidos (también denominados oxiranos), carbonildiimidazoles, carbonatos y cloroformiatos, halógenos de alquilo e isocianatos.

20 En algunas realizaciones, los grupos terminales pueden reaccionar con un aldehído, cetona, o cualquier otro resto oxo introducido en el agente biológico. Los ejemplos de dichos grupos terminales pueden incluir, pero sin limitación, aminooxi (hidroxilaminas), hidrazinas y aminas (con y sin aminación reductora).

En algunas realizaciones, el grupo terminal puede reaccionar con grupos azida o alquino introducidos en el agente biológico. Los ejemplos de dichos grupos terminales incluyen, pero sin limitación, alquinos y aminas.

25 En algunas realizaciones, el resto que reacciona con el grupo reactivo está presente naturalmente en el agente biológico. En algunas realizaciones, el resto que reacciona con el grupo reactivo se añade al agente biológico mediante modificación química (por ejemplo, por síntesis química), o modificación biológica (por ejemplo, inclusión de aminoácidos no naturales mediante síntesis recombinante).

30 En una realización, la presente invención se refiere a una composición y un método de aplicaciones de un homopolímero o copolímero que tiene una estructura de (2) que estabiliza notablemente las biomoléculas con respecto a los factores estresantes ambientales mezclando una cantidad adecuada de un homopolímero o copolímero que tiene una estructura de (2) con la biomolécula. En esta realización, no es necesaria la formación de enlaces químicos entre los homopolímeros o copolímeros y la biomolécula. Los homopolímeros o copolímeros no están unidos covalentemente a la biomolécula, sino que se añaden como excipiente.

35 Una concentración adecuada del homopolímero o copolímero puede ser de 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, y mucho más preferiblemente 100:1.

40 Los siguientes Ejemplos (por ejemplo, Ejemplos 1, 6 y 7) divulgan etapas típicas para mezclar el homopolímero o copolímero a base de trehalosa con biomoléculas. En una realización, se puede añadir una cantidad adecuada de la fase sólida de homopolímeros o copolímeros a base de trehalosa a la solución de biomoléculas. En otra realización, se puede preparar una solución de los homopolímeros o copolímeros a base de trehalosa, y se puede añadir una cantidad adecuada de la solución de homopolímero o copolímero a base de trehalosa a la solución de biomoléculas. En otra realización, se puede añadir una cantidad adecuada de la fase sólida de homopolímeros o copolímeros a base de trehalosa en la fase sólida de biomoléculas para formar una mezcla, y la mezcla se puede convertir en una solución. En otra realización, la trehalosa en fase de solución se puede añadir a solución o la proteína sólida y se seca para dar un sólido.

50 Se puede mezclar el polímero protector y la biomolécula diana de diversas maneras adecuadas. Se han realizado mezclas exitosas a temperaturas que varían de 4 °C a temperatura ambiente (23 °C) y se cree que existe flexibilidad con este parámetro. La temperatura no es crítica en lo que respecta al polímero, solo que la proteína o la biomolécula mantienen la actividad durante la mezcla, que puede depender de la temperatura. Se prefiere un pH neutro (7,4), pero no es necesario. Al igual que con la temperatura, la biomolécula debe permanecer activa y esta actividad puede depender del pH. El tiempo de mezcla fue típicamente breve en los ejemplos. Típicamente, se mezcla justo antes de su uso. Sin embargo, esto típicamente no es necesario. Los tampones no son críticos en lo que respecta al polímero en cuestión, pero pueden importar dependiendo de la proteína. Estos ejemplos se realizaron típicamente con solución salina tamponada con fosfato. Deben usarse cualesquiera condiciones que mantengan la actividad de la proteína o biomolécula antes de mezclarse completamente con el polímero.

60 Los Solicitantes prevén que los monómeros adecuados para producir los homopolímeros o copolímeros pueden incluir un monómero de estireno, un monómero de acrilato, un monómero de metacrilato, un monómero de acrilamida, un monómero de metacrilamida, un monómero de vinilo, un monómero de norborenilo, y un monómero de alqueno de ciclo tensionado.

La invención también puede incluir, pero sin limitación, estabilización de proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN, ARNs y composiciones farmacéuticas contra los factores estresantes ambientales que incluyen, pero sin limitación, calor, desecación, luz, almacenamiento, exposición a enzimas, endo y exo-nucleasas y variación del pH. Las aplicaciones comerciales de esta invención incluyen, pero sin limitación, estabilización de proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN, ARNs y composiciones farmacéuticas de los mismos utilizadas como agentes terapéuticos, reactivos bioquímicos y reactivos químicos.

El homopolímero o copolímero con o sin una cadena lateral de azúcar de trehalosa se puede añadir a una solución o forma de polvo de la biomolécula en solitario o como parte de una formulación. El homopolímero o copolímero en solitario con o sin una cadena lateral de azúcar de trehalosa también puede unirse covalentemente a una proteína u otra biomolécula para formar un conjugado. Se puede añadir homopolímero o copolímero no conjugado al homopolímero o conjugado de copolímero.

Esta invención se distingue del uso de una trehalosa en solitario como estabilizador porque la trehalosa está unida a un esqueleto de homopolímero o copolímero. Al unir una trehalosa a la cadena lateral de un homopolímero o copolímero, las propiedades protectoras de la trehalosa se mejoran inesperada y drásticamente. La desecación y la estabilidad al calor fueron significativamente mayores para el homopolímero o copolímero que para la propia trehalosa, a la misma concentración de trehalosa. Esta invención también se distingue del uso de trehalosa en solitario ya que, sorprendentemente, el polímero de trehalosa es un mejor estabilizador.

Los homopolímeros o copolímeros a base de trehalosa previamente informados incluyen un azúcar como parte del esqueleto del homopolímero o copolímero, en lugar de en una cadena lateral. En esta divulgación, el azúcar de trehalosa es parte de una cadena lateral. Los homopolímeros o copolímeros con, por ejemplo, trehalosa como parte del esqueleto, llamados homopolímeros o copolímeros de condensación, no pueden prepararse con un grupo terminal que pueda usarse para unirse a las biomoléculas. Esto es útil para hacer conjugados con biomoléculas.

La presente invención también demuestra que los homopolímeros o copolímeros, que se unieron covalentemente a las biomoléculas, muestran mejores propiedades de estabilización que los homopolímeros o copolímeros que se añadieron no covalentemente a las biomoléculas a la misma concentración. La conjugación de un homopolímero o copolímero a base de trehalosa directamente a la biomolécula también tiene la ventaja de emplear la cantidad mínima requerida para la estabilización. Además, para productos terapéuticos, un conjugado de biomoléculas-homopolímero o copolímero a base de trehalosa podría combinar las ventajas de la estabilización ambiental debido a la trehalosa con una farmacocinética mejorada resultante del homopolímero o el copolímero.

Además, los homopolímeros o copolímeros a base de trehalosa descritos previamente no se pudieron preparar con distribuciones de peso molecular estrechas, lo que se logra fácilmente mediante los métodos descritos en el presente documento. Finalmente, las propiedades protectoras de la trehalosa se basan en la funcionalidad hidroxilo, así como en la forma de concha de la molécula. Cuando el azúcar, por ejemplo, trehalosa, se incorpora a un esqueleto, en lugar de liberarse como una cadena lateral, las propiedades protectoras probablemente se vean comprometidas.

Los homopolímeros o copolímeros divulgados en el presente documento pueden prepararse con un grupo reactivo en un extremo para la conjugación con biomoléculas, y los homopolímeros o copolímeros tienen distribuciones de peso molecular estrechas. Esto no es posible utilizando los procedimientos previamente informados. Los diferentes pesos moleculares tienen diferentes toxicidades, solubilidades y propiedades farmacocinéticas, por lo que las distribuciones estrechas de peso molecular son importantes. De hecho, se ha informado que pocos homopolímeros o copolímeros estabilizan las proteínas con respecto a los factores estresantes ambientales, y estos no contienen azúcares (por ejemplo, trehalosa) como una cadena lateral.

En determinadas realizaciones preferidas, los homopolímeros o copolímeros divulgados están unidos a biomoléculas utilizadas como fármacos. La adición del homopolímero o copolímeros no conjugados con biomoléculas en solitario o en combinación con otros agentes de formulación es otro ejemplo de uso para los homopolímeros o copolímeros divulgados. Los homopolímeros o copolímeros también pueden emplearse para estabilizar proteínas y otros productos biológicos utilizados únicamente con fines de investigación. Los Solicitantes prevén que los homopolímeros o copolímeros divulgados también pueden ser útiles en otras aplicaciones diversas, tales como atención médica (productos farmacéuticos), biología molecular, biocombustibles, papel, detergente, cuidado personal (pañales donde los polímeros son muy hidrosféricos), fotografía, caucho, elaboración de cerveza, industrias de procesamiento de lácteos y alimentos (aditivos).

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines meramente ilustrativos y no se pretende limitar con ellos el alcance de la invención de modo alguno. De hecho, diversas modificaciones del método divulgado, además de las mostradas y descritas en el presente documento, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y los siguientes ejemplos y están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## 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 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.

5 La invención descrita en el presente documento proporciona un medio para estabilizar biomoléculas protegiendo o manteniendo la estructura usando cantidades eficaces de trehalosa unida covalentemente a homopolímeros o copolímeros conjugados con biomoléculas.

10 De acuerdo con una realización de la invención, se usa un homopolímero o copolímero 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 homopolímero o copolímero a base de trehalosa actuará para  
15 estabilizar las proteínas contra la degradación, por ejemplo, por calor, radiación electromagnética, esfuerzo cortante, proteólisis, o por modificación química tal como reducción, oxidación o carbamitación. En los métodos de la invención, se puede usar un homopolímero o copolímero a base de trehalosa para estabilizar una proteína en solución acuosa, o en forma seca, por ejemplo, producida por desecación, deshidratación, evaporación o liofilización (secado por  
20 congelación) de una solución acuosa.

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 C<sub>1-4</sub>" y "alquilo C<sub>1-3</sub>" incluyendo metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y *terc*-butilo, siendo metilo particularmente preferido.

"Entorno estresante" 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.

40 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.

45 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  $\alpha$  de un aminoácido (o residuo de aminoácido) se une covalentemente al átomo de nitrógeno amino del grupo amino unido al carbono  $\alpha$  de un aminoácido adyacente. Estas uniones de enlaces peptídicos, y los átomos que los comprenden (es decir, átomos de carbono  $\alpha$ , 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 forma similar, 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 procarionta; como alternativa, la proteína puede generarse usando un método *in vitro* tal como traducción *in vitro* acelular, por ejemplo, usando lisado de *E. coli*, extracto de germen de trigo o reticulocito de  
65

conejo. Se pueden emplear métodos de traducción *in vitro* acelar 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, Fab anti-TNF  $\alpha$ , factor estimulador de 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,  $\beta$ -Glucocerebrosidasa, alglucosidasa- $\alpha$ , laronidasa (a-L-iduronidasa), idursulfasa (iduronato-2-sulfatasa), galsulfasa, agalsidasa- $\beta$  ( $\alpha$ -galactosidasa humana A), inhibidor de  $\alpha$ -1-proteinasa, lactasa, enzimas pancreáticas, lipasa, amilasa, proteasa, adenosina desaminasa, inmunoglobulinas agrupadas, albúmina humana, eritropoyetina, epoetina-a, darbepoetina- $\alpha$ , 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), Lutropin- $\alpha$ , alfa-interferón 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, urocina, Factor VIIa, drotrecogina- $\alpha$  (proteína C activada), calcitonina de salmón, teriparatida (residuos de la hormona paratiroidea humana 1-34), exenatida, Octreotida, dibotermína- $\alpha$  (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- $\alpha$ , 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, abciximab, crotalida Fab inmune polivalente (ovina), digoxina Fab en suero inmune (ovina), ranibizumab, denileukin 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 transgén 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 IgG 1 humana.

El término "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos que están preparados, expresados, creados o aislados 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 transfectedo 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')<sub>2</sub>, 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')<sub>2</sub> tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub>, 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<sub>L</sub>) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) 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<sub>H</sub>) y/o una región variable de cadena ligera (dominio V<sub>L</sub>) 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<sub>H</sub>, o una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena ligera de los anticuerpos, o de los dominios V<sub>L</sub>.

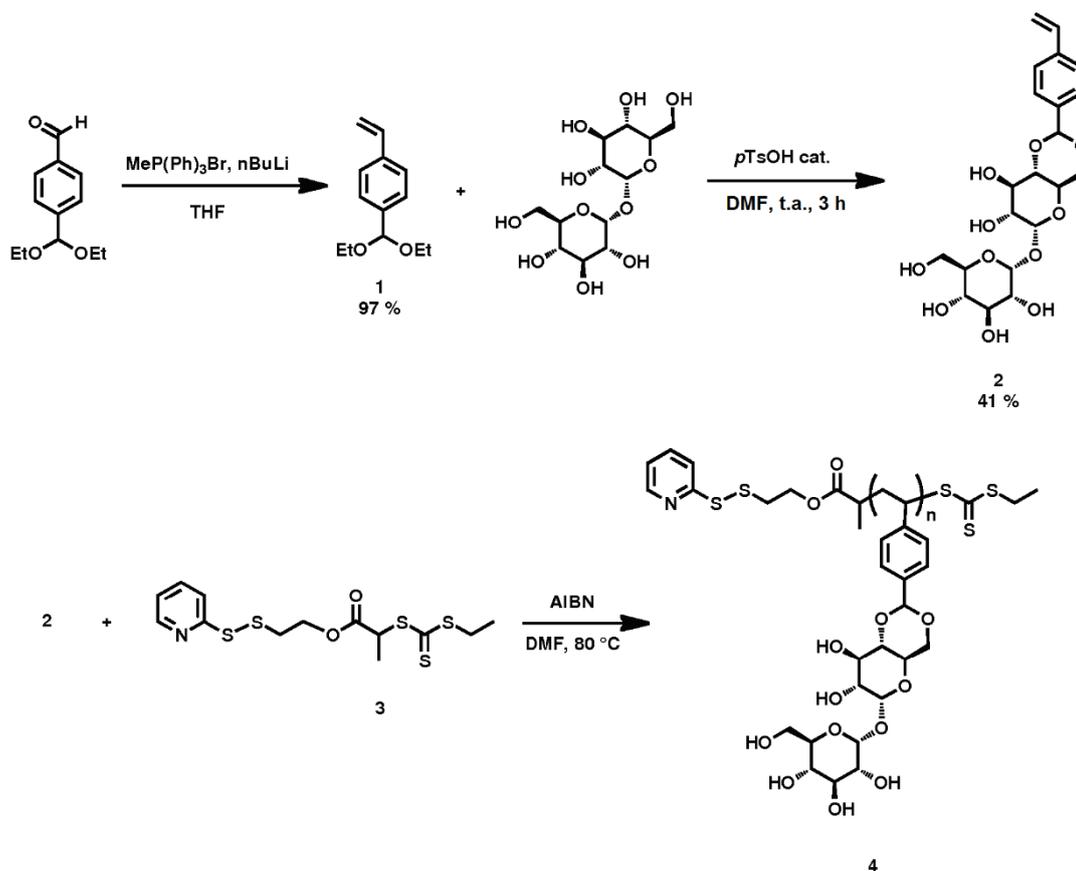
- El término "polímero de azúcar" como se usa en el presente documento, abarca moléculas de sacárido polimérico y oligomérico que comprenden tres o más unidades de mono, di o tri-sacárido. El polímero de azúcar puede ser un derivado de polímero de azúcar anfipático lineal o no lineal. Específicamente, 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.
- 10 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 hidrófobas 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.

### 20 Ejemplos

#### 25 **Ejemplo 1: Glucopolímeros de trehalosa para la estabilización de conjugados de proteínas con respecto a factores estresantes ambientales**

#### 30 **Procedimientos, resultados y análisis.**

- 25 Como un ejemplo ilustrativo del homopolímero o copolímero divulgado, el monómero de trehalosa polimerizable se preparó primero en dos etapas (Esquema 1). Se empleó tereftaldehído monodietilacetil para formar 1 mediante una reacción de Wittig con un rendimiento del 97 %. Esto a su vez se usó para realizar una reacción transacetal con trehalosa exclusivamente en la posición 4,6 en condiciones ligeramente ácidas, proporcionando 4,6-O-(4-vinilbencil)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido (2) con un rendimiento del 41 %. No se observaron otros isómeros que indicasen que se mantuvo la preferencia por la posición 4,6 para el benzaldehído dietilacetil sustituido. La  $^1\text{H}$  RMN y la  $^{13}\text{C}$  RMN, se proporcionan en la Figura 1. Se realizaron experimentos de espectroscopía de correlación total de coherencia cuántica heteronuclear única (HSQC-TOCSY) para verificar tanto la selectividad de la reacción, así como la integridad de los sistemas anulares del producto. Además, la NOESY RMN se realizó para demostrar la retención de la confirmación única del disacárido nativo mediante el cual las dos subunidades de glucosa se mantienen en una forma rígida de concha alrededor del enlace  $\alpha,\alpha$ -1,1-glucosídico. Este resultado es importante ya que ha demostrado ser un componente crítico en la generación de las propiedades fisicoquímicas y protectoras únicas de los carbohidratos (Sakurai, Murata, et al., 1997).



**Esquema 1.** Síntesis de monómero de trehalosa ilustrativo y posterior polimerización del monómero por RAFT para formar el polímero.

5 El monómero de estireno se muestra en este ejemplo, sin embargo, se puede emplear cualquier otro monómero polimerizable incluyendo, pero sin limitación, acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, vinilo, norborenilo y cicloalqueno tensionado. Además, el monómero puede estar unido a la trehalosa a través de grupos -OH en cualquier posición.

10 Se usó la polimerización reversible de adición-fragmentación (RAFT) para preparar el polímero en este ejemplo ilustrativo, aunque podrían emplearse varias técnicas diferentes, incluyendo, pero sin limitación, polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), polimerización mediada por nitroxido (NMP), polimerización por radicales libres mediada por cianoxilo, polimerización radicalaria convencional, y polimerización por metátesis de apertura de anillo (ROMP). El CTA 3 se preparó con un grupo disulfuro de piridilo. Sin embargo, se puede utilizar cualquier CTA, así como los iniciadores funcionalizados correspondientes para ATRP, NMP, polimerización radicalaria convencional mediada por cianoxilo, y catalizadores y alquenos funcionalizados para ROMP.

20 La polimerización RAFT de 2 con 3 se realizó a 80 °C (Esquema 1). La relación utilizada para la polimerización fue [CTA]:[monómero]:[AIBN] = 1:29:0,2, con una concentración de monómero 0,8 M. Después de 6 h, la polimerización se detuvo para obtener una conversión del 77 %. El homopolímero 4 se dializó contra bicarbonato de sodio acuoso con un MWCO de 2.000 g/mol. El peso molecular de 4 se analizó mediante espectroscopía de <sup>1</sup>H RMN (Figura 2) y fue de 9.600 g/mol en comparación con la integración de los picos de piridina del grupo terminal (a, b, c, d) con el anillo aromático de estireno (e, F). El PDI por GPC fue de 1,07, lo que demuestra que se formó un polímero bien definido.

25 Se obtienen fácilmente otros pesos moleculares. Para demostrar esto, las relaciones [CTA]: [monómero]: [AIBN] se modificaron entonces para obtener otros pesos moleculares que variaban de 4.200 g/mol a 19.000 g/mol (Tabla 1) con PDI estrechos obtenidos en todos los casos; aunque no se requiera un PDI estrecho.

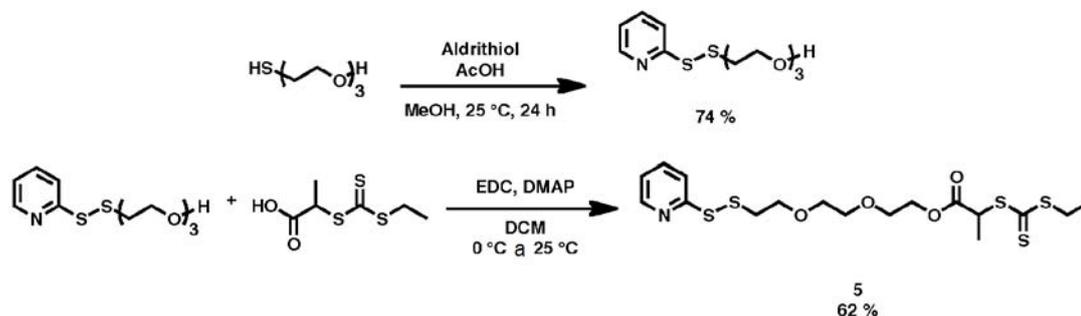
30 **Tabla 1.** Resultados de la polimerización de 2 por polimerización RAFT con 3. Las polimerizaciones se realizaron en DMF a 80 °C con una concentración de monómero 0,08 M para todos los ensayos.

CTA:M: AIBN	M <sub>n</sub> diana	Conv. (%)	M <sub>n</sub> (H RMN)	PDI
1:21:0,2	7.000	72	4.200	1,05
1:29:0,2	9.600	77	9.400	1,07
1:35:0,2	13.800	84	14.700	1,11

(continuación)

CTA:M: AIBN	M <sub>n</sub> diana	Conv. (%)	M <sub>n</sub> (H RMN)	PDI
1:50:0,2	20.000	85	19.000	1,14

También pueden utilizarse CTA con disulfuros de piridilo y diferentes estructuras y/o con diferentes grupos reactivos incluyendo, pero sin limitación, ésteres activados, maleimidias (también pueden estar protegidas o sustituidas), vinilsulfonas (también pueden estar protegidas o sustituidas), cetonas, aldehídos o cualquier otro grupo oxo, aminas, hidroxil aminas, hidrazinas, azidas, alquinos. Como ejemplo ilustrativo, se preparó CTA 5 con un espaciador hidrófilo de trietilenglicol entre el tritiocarbonato y el grupo terminal de disulfuro de piridilo (Esquema 2). El tri(etilenglicol) (TEG) se modificó por tosilación seguido de reflujo con tiourea (Steinem, C. et al. Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45, 17-26 (1998)). El 1-mercapto trietilenglicol resultante se trató con Aldrithiol® para obtener el disulfuro activado con el posterior acoplamiento mediado por carbodiimida al resto ácido en ácido 2-(etil sulfaniltiocarbonilsulfanil)-propiónico proporcionando el agente de transferencia de cadena reactivo de tiol 5 con un rendimiento del 9 % sobre cinco etapas lineales.

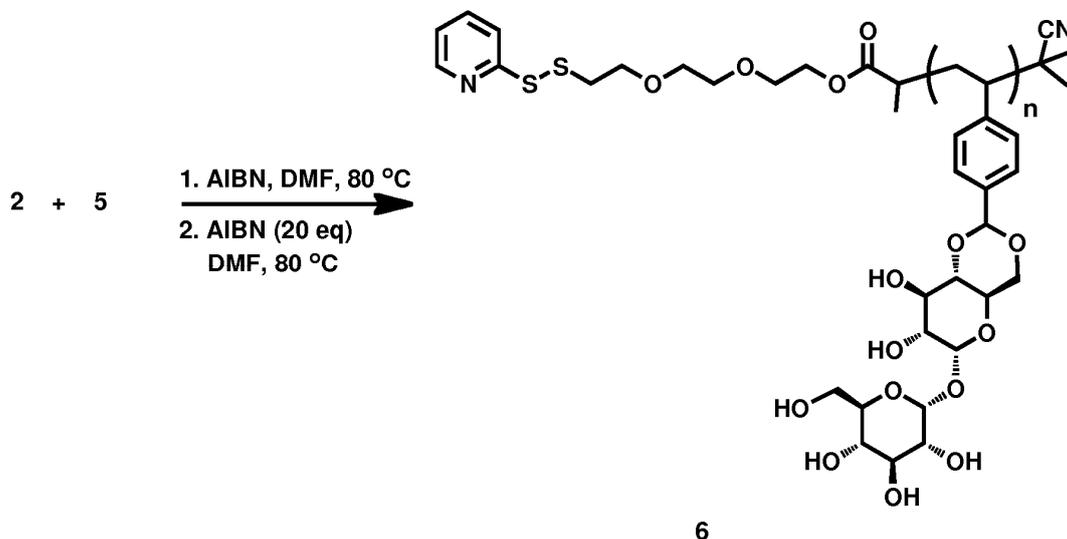


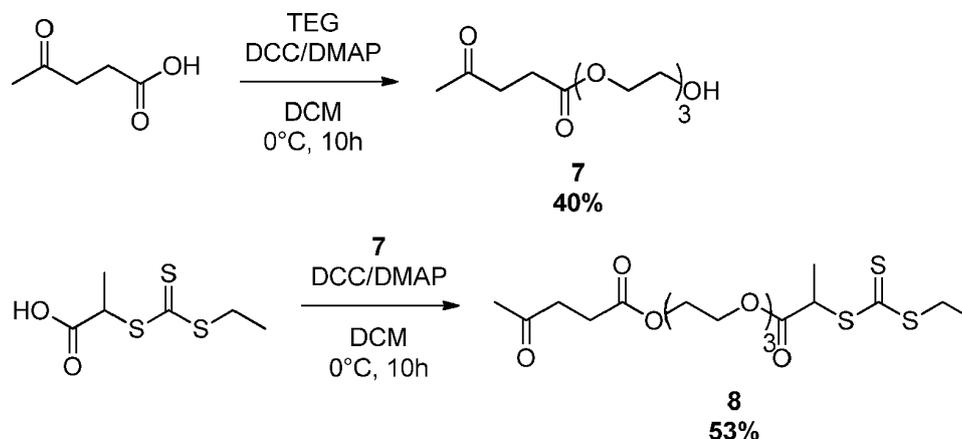
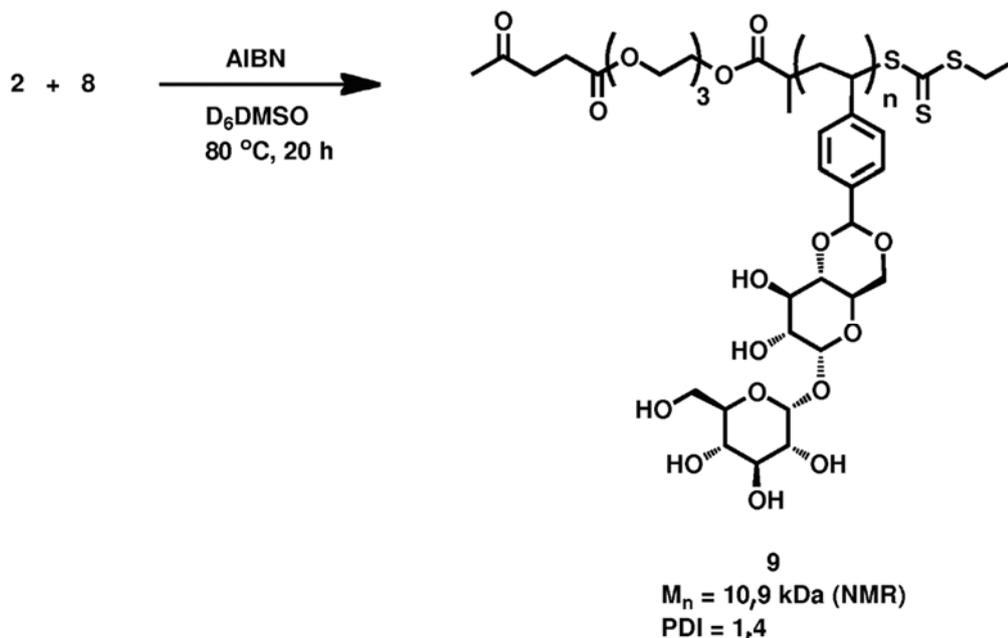
15

**Esquema 2.** Síntesis del agente de transferencia de cadena reactivo de tiol 5.

Se demostró que la polimerización RAFT de 2 en presencia de 5 (Esquema 3) avanzó a una conversión del 92 % durante seis horas para dar como resultado un polímero con un peso molecular bien definido Mn = 22,4 kDa (RMN) y PDI = 1,10 (GPC) (<sup>1</sup>H RMN proporcionada como la Figura 3). Si se desea la eliminación del grupo terminal de tritiocarbonato, esto puede lograrse mediante intercambio de radicales con exceso de AIBN (Perrier, S., Takolpuckdee, P. & Mars, C.A. Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization: End group modification for functionalized polymers and chain transfer agent recovery. *Macromolecules* 38, 2033-2036 (2005)) para producir el homopolímero 6 (Esquema 3), o el polímero puede reducirse en el tiol y reaccionar con cualquier cantidad de reactivos. Además, la invención reivindica polímeros con cualquier grupo terminal, incluidos los que reaccionan con otras áreas de proteínas. Esto incluye, pero sin limitación, grupos terminales que reaccionan con aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, funcionalidad de aminoácidos no naturales tales como compañeros químicos de clic (azidas, alquinos, hidroxil aminas, grupos oxo, hidrazinas, etc.), sitios de unión a ligando. Como ejemplo ilustrativo, se sintetizó un CTA con una cetona (Esquema 4) en dos etapas. Este CTA se utilizó para preparar un polímero reactivo de amina (Esquema 5). El polímero resultante tenía un Mn de 10,9 kDa (RMN) y un PDI de 1,42 por GPC.

30

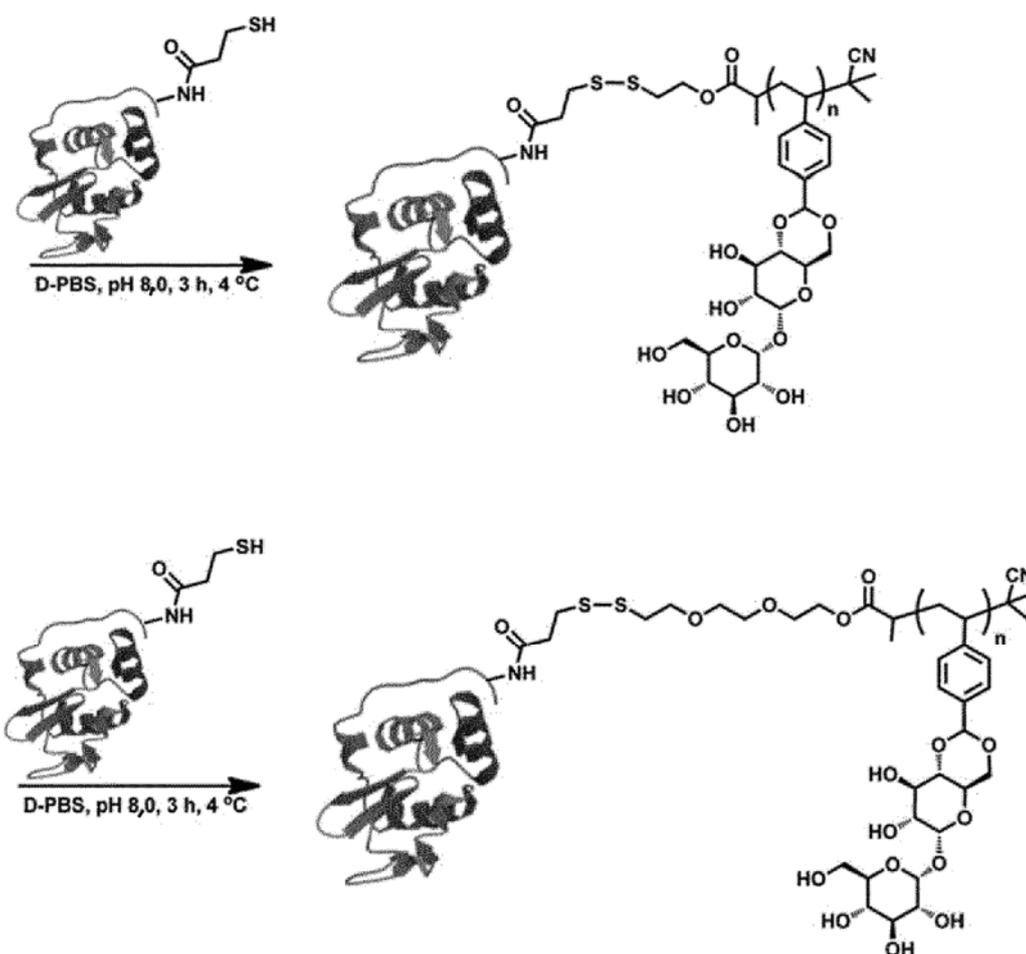


**Esquema 3.** Polimerización RAFT y eliminación del grupo terminal de tritiocarbonato para formar el homopolímero 6.5 **Esquema 4.** Síntesis de CTA reactivo de amina.**Esquema 5.** Polimerización RAFT con CTA 8 para formar el polímero reactivo de amina 9.

10

Conjugación de un polímero con proteínas. Los homopolímeros a base de trehalosa 4 ( $M_n = 9.400 \text{ g/mol}$ ) y 6 se conjugaron con lisozima tiolada (**LyZSH**, Esquema 4) como una proteína modelo y un ejemplo ilustrativo para esta invención (Esquema 6). Se puede utilizar cualquier cantidad de proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN, ARNs, otras biomoléculas y fármacos como compañeros de conjugación. La lisozima de clara de huevo de gallina se trató con succinimidil acetil-tiopropionato (SATP) en un procedimiento que se sabe que une covalentemente la funcionalidad de tioacetato a proteínas a través de enlaces amida (Hermanson, 1996). Después de la desprotección con hidroxilamina y la eliminación del exceso de SATP, los tioles libres se cuantificaron en la lisozima tiolada (**LyZSH**) mediante el ensayo de Ellman, dando como resultado una relación tiol: proteína de 1:1.4 (71 % de tiol). Después de la incubación con el polímero de trehalosa, se observó el conjugado por SDS-PAGE (no mostrado) en condiciones no reductoras como una mancha centrada a ~25 kDa correspondiente al peso molecular teórico del conjugado. El polímero 6 también se conjugó con la misma proteína (**LyZSH**). El conjugado resultante de lisozima-glucopolímero (**LyZ-6**) se purificó por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (Figura 4a). La actividad del conjugado **LyZ-6** purificado se confirmó observando la lisis activa de la bacteria grampositiva marcada con FITC *Micrococcus luteus* (Figura 4b). La conjugación se verificó por SDS-PAGE (Figura 4c-e).

25



**Esquema 6** Reacciones de conjugación ilustrativas de lisozima tiolada con el polímero 4 y el polímero 6 para formar los respectivos conjugados.

5

Las muestras de Lyz-6 y la lisozima de tipo silvestre en solitario o con trehalosa añadida o el polímero 6 no conjugado se expusieron entonces a factores estresantes ambientales de manera idéntica y se ensayaron para determinar su actividad (Figura 5). Las muestras de conjugado Lyz-6 expuesto a 10 ciclos de liofilización (es decir, desecación) tenían el 80 % de la actividad de Lyz-6 no expuesta que se había almacenado a 4 °C, mientras que la lisozima de tipo silvestre retuvo solo el ~20 % de la actividad original en condiciones idénticas. Por lo tanto, la conjugación del polímero covalentemente con la proteína mejora significativamente la estabilidad de la proteína. Las muestras que contenían 1 equivalente de polímero no conjugado con respecto a proteína estabilizaron la proteína a ~60 % de actividad y 100 equivalentes de polímero no conjugado con respecto a proteína estabilizaron completamente la biomolécula (100 % de actividad). Se añadió trehalosa a la lisozima de tipo silvestre a 48 equivalentes de proteína, que es equivalente a la cantidad de trehalosa en 1 equivalente de polímero. La trehalosa con 4800 equivalentes es la misma cantidad de trehalosa que en 100 equivalentes de polímero, y esto se añadió a la proteína en una muestra separada. En ambos casos, se encontró que el glucopolímero no conjugado añadido estabiliza la proteína significativamente mejor que cantidades equivalentes de trehalosa añadida, lo que demuestra que el polímero libre es un crioprotector más eficaz que la trehalosa.

20

Para investigar la estabilidad térmica, las muestras se expusieron a una carga de calor de 90 °C durante 3 horas y se ensayaron para determinar la actividad restante (Figura 6). Aunque no permaneció actividad en la lisozima de tipo silvestre, se retuvo >20 % de la actividad al conjugar el polímero con la proteína (Lyz-6). El polímero libre añadido a la lisozima de tipo silvestre también estabilizó significativamente la proteína y se estabilizó mejor (es decir, la actividad de la proteína fue mayor) que las cantidades equivalentes de trehalosa añadida. Este resultado muestra que el glucopolímero estabiliza las biomoléculas a altas temperaturas, tanto añadidas en solución como unidas de forma covalente como un conjugado.

25

#### Detalles experimentales.

30

**Materiales.** Todos los disolventes se adquirieron en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. La trehalosa se adquirió en The Endowment for Medical Research, (Houston, TX) y se volvió anhidra antes de su uso a través de procedimientos conocidos (Reisener, H.J., Perlin, A.S.,

Ledingham, G.A. y Goldschmid, H.R. FORMATION OF TREHALOSE AND POLYOLS BY WHEAT STEM RUST (PUCCINIA GRAMINIS TRITICI) UREDOSPORES. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 40, 1248-& (1962)). El compuesto de partida 1-mercaptotrietilenglicol se preparó de acuerdo con procedimientos de la bibliografía (Steinem, C. et al. Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 45, 17-26 (1998)). El kit de ensayo de lisozimas EnzChek® se adquirió en Invitrogen y se usó según las instrucciones del fabricante. La lisozima de clara de huevo de gallina y todos los demás reactivos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich.

*Técnicas analíticas.* Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Advance 500 o 600 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. La espectroscopía UV-visible se realizó con un espectrofotómetro BioMate 5 (Thermo Spectronic Instruments). Los espectros de masas de ESI se adquirieron usando un Thermo Finnigan LCQ Deca MS con fuente de ionización por electronebulización. 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 (2) 100A (preparativa: 5 µm, 250 x 21,2 mm) con monitorización a  $\lambda = 254$  y 220 nm. Se usó un sistema de disolventes de gradiente lineal de agua:metanol (40:60 a 10:90) como la fase móvil a un caudal de 10 ml/min.

#### Síntesis de monómeros, CTA, y polímeros

*Síntesis de 4-vinilbencilacetato (1).* 1 se sintetizó siguiendo un procedimiento bibliográfico (Sun, G.R., Cheng, C. y Wooley, K.L. Reversible addition fragmentation chain transfer polymerization of 4-vinylbenzaldehyde. Macromolecules 40, 793-795 (2007)). Se añadieron bromuro de metiltrifenilfosfonio (5,4 g, 14,5 mmol) y 45 ml de THF en un matraz de fondo redondo de 250 ml secado a la llama. La mezcla de reacción se enfrió a -78 °C y se agitó durante 20 min. Se añadió gota a gota *n*-BuLi durante el transcurso de 20 min. La reacción se agitó durante 30 min a -78 °C, se calentó a 25 °C y se agitó durante 10 min. La solución de reacción de color naranja-rojo se enfrió entonces a -78 °C. Se añadió gota a gota tereftaldehído monodietilacetato (2,5 g, 12,0 mmol) disuelto en 7,5 ml de THF durante el transcurso de 1 h. Después de agitar a -78 °C durante 30 min, el matraz de reacción se calentó a 0 °C y se agitó durante 3 h. Después, la reacción se calentó a 25 °C y se agitó durante 1 h. La reacción se interrumpió añadiendo 10 ml de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La capa orgánica se recogió después de añadir 50 ml de H<sub>2</sub>O, y la capa acuosa se extrajo con 20 ml de éter tres veces. Las capas orgánicas combinadas se secaron con MgSO<sub>4</sub>. Después de la purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice con Hex : EtOAc = 20 : 1, se obtuvieron 2,40 g de producto en forma líquida (97 % de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, en CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7,55-7,45 (d, J = 7 Hz, 2H), 7,45-7,36 (d, J = 7 Hz, 2H) 6,78-6,68 (dd, 1H), 5,81-5,74 (d, J = 17 Hz, 1H), 5,57-5,51 (s, 1H), 5,29-5,22 (d, J = 11 Hz, 1H), 3,70-3,50 (m, 4H), 1,40-1,10 (t, J = 7 Hz, 6H). <sup>13</sup>C RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 138,80, 137,43, 136,59, 126,84, 125,93, 113,77, 101,00, 60,65, 15,10.

*Síntesis de 4,6-O-(4-vinilbencil)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido (2).* En un matraz de fondo redondo secado a la llama se disolvió 1 (0,500 g, 2,42 mmol, 1,00 equiv.) y trehalosa (4,15 g, 12,1 mmol, 5,00 equiv.) en 150 ml de DMF, y la mezcla resultante se enfrió a 0 °C. Después, se añadió ácido *p*-tolueno sulfónico (92 mg, 0,20 mmol, 0,12 equiv.) y la solución se calentó a 25 °C y se agitó durante 3 h. El disolvente se eliminó del producto de reacción en bruto resultante al vacío para dar un sólido de color blanco que se purificó adicionalmente por HPLC (40:60 a 10:90 de gradiente lineal de agua:metanol durante 30 minutos a 10 ml/min). Después de la eliminación de disolventes, el producto resultante 2 (456 mg, 0,99 mmol, 41 % de rendimiento) se obtuvo en forma de un sólido de color blanco. <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, D<sub>6</sub>DMSO)  $\delta$  : 7,51 (d, 2H, 8,4 Hz), 7,46 (d, 2H, 8,4 Hz), 6,78 (dd, 1H, 10,8, 17,4 Hz), 5,89 (d, 1H, 17,4 Hz), 5,59 (s, 1H), 5,32 (d, 1H, 11,4 Hz), 5,26 (d, 1H, 4,8 Hz), 5,03-5,02 (m, 2H), 4,99 (d, 1H, 3,6 Hz), 4,92 (d, 1H, 3,6 Hz), 4,87-4,85 (m, 2H), 4,45 (dd, 1H, 6, 6 Hz), 4,14 (dd, 1H, 4,8, 9,6 Hz), 4,04 (ddd, 1H, 4,8, 9,6, 10,2 Hz), 3,80 (ddd, 1H, 4,8, 5,4, 9,3 Hz), 3,77 (ddd, 1H, 2,1, 4,5, 9,9 Hz), 3,69 (dd, 1H, 10,2, 10,2 Hz), 3,64-3,60 (m, 2H), 3,53 (ddd, 1H, 5,4, 5,7, 11,7 Hz), 3,45-3,40 (m, 2H), 3,32 (ddd, 1H, 3,8, 5,6, 9,4 Hz), 3,20 (ddd, 1H, 4,8, 5,4, 9,3 Hz). <sup>13</sup>C RMN (500 MHz D<sub>6</sub>DMSO)  $\delta$  : 138,4, 138,3, 137,2, 127,6, 126,7, 115,8, 101,6, 101,5, 95,3, 94,8, 82,4, 73,6, 73,1, 72,4, 70,9, 70,5, 69,2, 63,3, 61,6. MS (ESI-MS) calc. para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>11</sub>Na<sup>+</sup>: 479,15 observada: 479,15, IR:  $\nu = 3356, 2921, 1629, 1455, 1376, 1148, 1073, 976, 833, 800$  cm<sup>-1</sup>, UV/Vis (H<sub>2</sub>O)  $\lambda = 225, 259$  nm. Los espectros de RMN se muestran como la Figura 1.

*Síntesis de tritocarbonato de piridildisulfuro (3).* La síntesis fue de acuerdo con un procedimiento bibliográfico. Se disolvieron piridil disulfuro alcohol (97,94 mg, 0,52 mmol) y ácido tritocarbonato (100 mg, 0,48 mmol) en 9,60 ml de DCM seco. Después de agitar la reacción a 0 °C durante 20 min, se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 273,41 mg, 1,56 mmol) y dimetilamino piridina (DMAP, 11,62 mg, 0,10 mmol). La reacción cambió de color de amarillo a naranja. El baño de hielo se retiró después de 5 h, y la reacción se detuvo después de 24 h. La solución se lavó tres veces con 30 ml de H<sub>2</sub>O y la capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de la cromatografía en columna sobre gel de sílice con Hex : EtOAc = 1:1, se recogieron 117 mg de producto (70 % de rendimiento) en forma de un aceite de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, en CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 8,48-8,47 (m, 1H), 7,70-7,63 (m, 2H), 7,11-7,09 (m, 1H), 4,81 (c, J = 7 Hz, 1H), 4,43-4,35 (m, 2H), 3,39-3,34 (c, J = 7 Hz, 2H), 3,09-3,03 (m, 2H),

1,61-1,59 (d, J = 7 Hz, 3H), 1,37-1,34 (t, J = 7 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (500 MHz en  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 221,8, 170,9, 159,7, 149,8, 137,2, 121,0, 120,0, 63,5, 47,9, 37,3, 31,5, 16,7, 12,8. Los espectros de RMN se muestran como la Figura 14.

5 *Polimerización RAFT de monómero de trehalosa (Poli 1-4)*. En una polimerización típica, se disolvieron 3 (18,34 mg,  $5,22 \times 10^{-2}$  mmol), 2 (500 mg, 1,09 mmol) y AIBN (1,71 mg,  $1,04 \times 10^{-2}$  mmol) en 1,37 ml de DMF seca. Se repitieron cinco ciclos de congelación-bombeo-descongelación para eliminar el oxígeno, y la reacción se sumergió en un baño de aceite a 80 °C. Después de 6 h, la reacción se detuvo sumergiendo el matraz de reacción en nitrógeno líquido. El polímero 4 se purificó por diálisis contra  $\text{H}_2\text{O}$  basificado débilmente con bicarbonato sódico (MWCO 2.000 g/mol) seguido de MeOH. UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{máx}}$  = 213 nm, IR:  $\nu$  = 3298, 2914, 1653, 1375, 1148, 1112, 1072, 1020, 976, 824  $\text{cm}^{-1}$ . **Poli 1:**  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 8,47(1H), 7,91-7,62 (m, 2H), 7,61-6,25 (m, 34H), 5,51, 5,22, 4,95, 4,90, 4,81, 4,37, 4,12, 3,98, 3,60, 3,78, 3,71, 3,57, 3,49, 3,42, 3,17, 1,71, 1,23, 0,85 ppm. Mn (RMN) 4,2 kDa. Mn (GPC) 8,5 kDa. PDI (GPC) 1,05. **Poli 2:**  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 8,43(1H), 7,93-6,03 (m, 83H), 5,47, 5,23, 4,95, 4,39, 4,10, 3,96, 3,70, 3,59, 3,49, 3,42, 3,16, 1,50, 1,25, 0,85 ppm. Mn(RMN) 9,4 kDa. Mn (GPC) 15,6 kDa. PDI (GPC) 1,07. **Poli 3:**  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 8,40(1H), 7,97-6,11 (m, 129H), 5,44, 5,19, 4,93, 4,36, 4,07, 3,94, 3,75, 3,67, 3,55, 3,47, 3,39, 3,13, 1,54, 1,19, 1,04, 0,83 ppm. Mn (RMN) 14,7 kDa. Mn (GPC) 17,3 kDa. PDI (GPC) 1,11. **Poli 4:**  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 8,42(1H), 7,71-6,16 (m, 158H), 5,45, 5,23, 4,96, 4,91,4,44, 4,10, 3,97, 3,70, 3,59, 3,17, 1,40, 1,19, 1,04, 0,83 ppm. Mn(RMN) 19,0 kDa. Mn (GPC) 28,9 kDa. PDI (GPC) 1,14. Los espectros de RMN se muestran como la Figura 9.

20 *Síntesis de 2-(2-(2-(piridin-2-ildisulfanil)etoxi)etoxi)etanol (4)*. En un matraz de fondo redondo secado a la llama se disolvió Aldritol® (1,99 g, 9,03 mmol, 3 equiv.) en metanol (24 ml) y ácido acético (1 ml). A continuación, se añadió gota a gota 1-mercapto trietilenglicol (500 mg, 3,01 mmol, 1 equiv.) durante 10 min. La mezcla de reacción de color amarillo resultante se agitó durante 140 min a 25 °C antes de la eliminación del disolvente al vacío. El producto reacción en bruto se disolvió en DCM, se lavó con agua, se secó con sulfato de magnesio, y se concentró por evaporación rotatoria. El producto se purificó por cromatografía en columna (100 % de EtOAc) para producir un aceite de color amarillo (613 mg, 2,22 mmol, 74 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,46-8,45 (m, 1H), 7,77-7,64 (m, 2H), 7,10-7,08 (m, 1H), 3,75-3,58 (m, 10H), 3,01-2,98 (m, 2H), 2,14 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149,4, 137,0, 120,6, 119,6, 72,4, 70,3, 70,3, 68,9, 61,7, 38,2. UV/Vis (MeOH)  $\lambda$  = 256, IR:  $\nu$  = 3666, 2973, 2927, 2875, 1735, 1703, 1606, 1575, 1509, 1444, 1419, 1389, 1370, 1334, 1299, 1211, 1176, 1092, 1033, 1019, 1000, 918, 869, 846, 809, 720, 695  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de RMN se muestran como la Figura 15.

35 *Síntesis del agente de transferencia de cadena reactivo de tior 5*. En un matraz de fondo redondo secado a la llama se disolvieron 2-(2-(2-(piridin-2-ildisulfanil)etoxi)etoxi)etanol (500 mg, 1,82 mmol, 1,1 equiv.) y ácido 2-(etil sulfanililcarbonil sulfanil)-propiónico (347 mg, 1,65 mmol, 1 equiv.) en 16,5 ml de DCM hecho anhidro por destilación. La reacción se agitó durante 20 min a 0 °C antes de la adición de EDC (759 mg, 3,96 mmol, 2,4 equiv.) y DMAP (40 mg, 0,33 mmol, 0,2 equiv.). Después de la agitación adicional a 0 °C durante 5 horas, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 24 h más. El producto de reacción en bruto se lavó 3 veces con agua y la capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . La solución se concentró antes de la purificación por cromatografía en columna (100 % de EtOAc) para aislar el producto 5 en forma de un aceite de color amarillo (478 mg, 1,02 mmol, 62 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,46-8,45 (m, 1H), 7,78-7,64 (m, 2H), 7,10-7,07 (m, 1H), 4,83 (c, J = 7 Hz, 1H), 4,32-4,29 (m, 2H), 3,74-3,57 (m, 8H), 3,35 (c, J = 8 Hz, 2H), 3,00 (t, J = 6 Hz, 2H), 1,60 (d, J = 7 Hz, 3H), 1,34 (t, J = 7 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 221,8, 171,1, 160,4, 149,6, 137,1, 120,6, 119,6, 77,3, 77,0, 76,8, 70,6, 70,4, 69,5, 69,0, 69,0, 68,9, 65,0, 64,9, 64,4, 47,9, 39,9, 38,5, 31,5, 21,6, 16,9, 16,8, 13,0. UV/Vis (50 % de  $\text{DMF}_{(\text{ac.})}$ )  $\lambda$  252 ( $\epsilon$  = 2,36), 297 ( $\epsilon$  = 12,76), IR:  $\nu$  = 3043, 2866, 1732, 1573, 1445, 1417, 1374, 1352, 1298, 1250, 1163, 1138, 1112, 1080, 1026, 1042, 985, 875, 812, 760, 717, 616  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI) calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}_5\text{H}$ : 468,0465, Observado: 468,0466. Los espectros de RMN se muestran como la Figura 16.

50 *Síntesis de  $\omega$ -(etil sulfanililcarbonil sulfanil)-poli-4,6-O-(4-vinilbencilideno) trehalosa*. La síntesis es muy similar a la de Poli 5-8 con grupos terminales no eliminados. Se utilizaron diferentes relaciones de monómero con respecto a CTA para lograr diferentes pesos moleculares. En un tubo schlenk secado a la llama se añadieron 2 (300 mg, 0,66 mmol, 300 equiv.), 5 (5,12 mg, 0,109 mmol, 5 equiv.) y AIBN (0,36 mg, 0,22  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) y DMF anhidra (0,82 ml) antes de poner la mezcla en protección con atmósfera de argón. El oxígeno se eliminó de la solución resultante por cinco ciclos de congelación-bombeo-descongelación y la solución se calentó a 80 °C durante 6 horas. La polimerización se detuvo sumergiendo el recipiente de reacción en nitrógeno líquido y el polímero se purificó por diálisis (MWCO 1 kDa,  $\text{NaHCO}_3(\text{ac.})$  1 mM seguido de MeOH, 3 días). El disolvente se eliminó del polímero antes de la caracterización estándar.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 8,42 (m, 1H), 7,10-6,39 (m, 192H), 5,42, 5,21, 4,95, 4,86, 4,40, 4,10, 3,96, 3,70, 3,60, 3,34, 3,17, 3,16, 1,50 ppm. UV/Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  261 nm ( $\epsilon$  = 21,26), 311 nm ( $\epsilon$  = 9,25). IR:  $\nu$  = 3341, 2085, 1658, 1647, 1417, 1385, 1147, 1098, 1073, 1045, 977, 930, 826, 801,722, 662  $\text{cm}^{-1}$ . Mn (RMN) 22,4 kDa. PDI (GPC) 1,10.

60 *Síntesis de  $\omega$ -isobutironitrilo-poli-4,6-O-(4-vinilbencilideno) trehalosa (6)*. La funcionalidad  $\omega$ -tritiocarbonato se eliminó (Perrier, S., Takolpuckdee, P. & Mars, C.A. Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization: End group modification for functionalized polymers and chain transfer agent recovery. *Macromolecules* 38, 2033-2036 (2005)). En un procedimiento típico, a co-(etil sulfanililcarbonil sulfanil)-poli-4,6-O-(4-vinilbencilideno) trehalosa (50 mg, 2,23  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) en un tubo schlenk secado a la llama se añadieron AIBN (7,33 mg, 44,6  $\mu\text{mol}$ , 20 equiv.) y 0,5 ml de DMF, y la mezcla de reacción se puso en protección con una atmósfera de argón. El oxígeno se eliminó del recipiente de reacción mediante cinco ciclos de congelación-bombeo-descongelación antes del calentamiento

posterior a 80 °C durante 20 h. El polímero resultante 6 se purificó por diálisis (MWCO 1 kDa, 50 % de MeOH<sub>(ac.)</sub>, 3 días) antes de la liofilización para dar un sólido de color blanco. UV/Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  261 nm ( $\epsilon = 25,22$ ). IR:  $\nu = 3330, 2923, 2112, 1652, 1376, 1149, 1101, 1072, 1047, 980, 928, 828, 801, 726 \text{ cm}^{-1}$ .

- 5 **Síntesis de poli-4,6-O-(4-vinilbencilideno) trehalosa (Poli 5-8).** En una síntesis típica: En un tubo Schlenk secado a la llama se añadieron **2** (218,1 mg, 0,48 mmol), **5** (11 mg,  $2,4 \times 10^{-2}$  mmol) y AIBN (1,58 mg, 9,60  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) y DMF anhídrico (0,60 ml) antes de poner la mezcla en protección con una atmósfera de argón. El oxígeno se eliminó de la solución resultante mediante cinco ciclos de congelación-bombeo-descongelación y la solución se calentó a 80 °C para una conversión monomérica del 94 %. La polimerización se detuvo sumergiendo el recipiente de reacción en nitrógeno líquido y el polímero se purificó por diálisis (MWCO 1 kDa, NaHCO<sub>3</sub>(ac.) 1 mM seguido de MeOH, 3 días). El disolvente se eliminó del polímero antes de la caracterización estándar. **Poli 5:** <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>6</sub>DMSO)  $\delta$  :8,42(1H), 7,80(2H), 7,56-6,25 (m, 66H), 5,49, 5,20, 4,95, 4,79, 4,38, 4,11, 3,99, 3,78, 3,70, 3,58, 3,48, 3,43, 3,18, 2,99, 1,66, 1,25, 0,83 ppm. UV/Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  310 nm ( $\epsilon = 18939 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). IR:  $\nu = 3354, 2929, 1638, 1419, 1375, 1211, 1147, 1098, 1072, 1046, 977, 929, 826, 800, 722, 662 \text{ cm}^{-1}$ . Mn (RMN) 8,0 kDa. Mn(GPC) 9,6 kDa. PDI (GPC) 1,10.
- 10 **Poli 6:** <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>6</sub>DMSO)  $\delta$  :8,47(1H), 7,79(2H), 7,40-6,16 (m, 87H), 5,46, 5,20, 4,95, 4,88, 4,38, 4,08, 3,96, 3,76, 3,69, 3,57, 3,47, 3,40, 3,15, 2,95, 1,48, 1,21, 1,08, 0,85 ppm. UV/Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  261 nm ( $\epsilon = 68804 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). IR:  $\nu = 3371, 2930, 1655, 1376, 1212, 1385, 1148, 1098, 1073, 1046, 977, 930, 826, 800, 722, 662 \text{ cm}^{-1}$ . Mn (RMN) 15,4 kDa. Mn (GPC) 12,1 kDa. PDI (GPC) 1,13. **Poli 7:** <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>6</sub>DMSO)  $\delta$  : 8,25(1H), 7,82(2H), 7,41-6,11 (m, 210H), 5,45, 5,22, 4,97, 4,87, 4,42, 4,13, 3,98, 3,80, 3,72, 3,60, 3,49, 3,43, 3,18, 1,65, 1,25, 0,87 ppm. UV/Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  261 nm ( $\epsilon = 38421 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). IR:  $\nu = 3353, 2919, 1618, 1376, 1212, 1148, 1098, 1073, 1046, 977, 929, 826, 800, 722, 662 \text{ cm}^{-1}$ . Mn (RMN) 24,5 kDa. Mn (GPC) 18,8 kDa. PDI (GPC) 1,20. **Poli 8:** <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>6</sub>DMSO)  $\delta$  : 8,42(1H), 7,80(2H), 7,47-6,02 (m, 429H), 5,45, 5,22, 4,97, 4,85, 4,39, 4,10, 3,98, 3,78, 3,71, 3,60, 3,48, 3,43, 3,17, 1,49, 1,39, 0,85, 1,27 ppm. UV/Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  261 nm ( $\epsilon = 59405 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). IR:  $\nu = 3368, 2928, 1615, 1373, 1212, 1385, 1147, 1098, 1073, 1046, 977, 930, 825, 800, 722, 662 \text{ cm}^{-1}$ . Mn (RMN) 49,5 kDa. Mn (GPC) 33,6 kDa. PDI (GPC) 1,47. Los espectros de RMN se muestran como la Figura 10.

- Síntesis del agente de transferencia de cadena reactivo de amina (8).** Como se muestra en el Esquema 4, en un matraz de fondo redondo secado a la llama se le añadieron levulinato de tri(etilenglicol) (1,07 g, 4,3 mmol, 1 equiv.), ácido 2-(etil sulfaniltiocarbonil sulfanil)-propiónico (1 g, 4,8 mmol, 1,1 equiv.), y DCM (35 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C antes de la adición de DCC (1,38 g, 6,7 mmol, 1,55 equiv.) y DMAP (0,068 g, 0,6 mmol, 0,13 equiv.). La solución se agitó durante 10 horas y se dejó calentar a temperatura ambiente antes de la eliminación del disolvente al vacío. El producto de reacción en bruto se purificó por cromatografía en columna (1:1 de DCM:EtOAc) para obtener CTA 8 (1,00 g, 2,28 mmol, 53 % de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 4,85 (c, 1H, J = 7,4, 14,7 Hz), 4,31 (c, 2H, J = 3,6, 6,1 Hz), 4,26-4,23 (m, 2H), 3,73-3,69 (m, 4H), 3,66-3,62 (m, 4H), 3,37 (c, 2H, J = 7,5, 14,8 Hz), 2,76 (t, 2H, J = 6,5 Hz), 2,62 (t, 2H, J = 6,5 Hz), 2,20 (s, 3H), 1,62 (d, 3H, J = 7,4 Hz), 1,36 (t, 3H, J = 7,4 Hz) ppm.

- Síntesis de  $\omega$ -(etil sulfaniltiocarbonil sulfanil)-poli-4,6-O-(4-vinilbencilideno) trehalosa (9).** Como se muestra en el Esquema 5, en un tubo schlenk secado a la llama se añadieron **2** (180 mg, 0,39 mmol, 100 equiv.), **8** (8,69 mg, 0,02 mmol, 5 equiv.) y AIBN (0,65 mg, 4  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) y D<sub>6</sub>DMSO anhídrico (1 ml) antes de poner la mezcla en protección con una atmósfera de argón. El oxígeno se eliminó de la solución resultante por cinco ciclos de congelación-bombeo-descongelación y la solución se calentó a 80 °C durante 10 horas. La polimerización se detuvo sumergiendo el recipiente de reacción en nitrógeno líquido y el polímero se purificó por diálisis (MWCO 1 kDa, NaHCO<sub>3</sub>(ac.) 1 mM seguido de MeOH, 3 días). El disolvente se eliminó del polímero antes de la caracterización estándar. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>6</sub>DMSO)  $\delta$  : 7,16-6,46 (92H), 5,50, 5,24, 4,99, 4,88, 4,60 (1H), 4,43, 4,14, 4,00, 3,74, 3,63, 3,53, 3,45, 3,32, 3,21, 2,77, 2,74, 2,71, 2,16, 1,58, 1,28 ppm. Mn (RMN) 10,9 kDa. PDI (GPC) 1,42.

#### Conjugación de lisozima

- Lisozima de clara de huevo de gallina de tiopropionilo (LyzSH).** La lisozima de clara de huevo de gallina se reconstituyó según se recibió a una concentración de 10 mg/ml (PB 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). A continuación, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de succinimidil acetil-tiopropionato (16 mg/ml, 65 mM en DMF) y la solución se enfrió a 4 °C durante 4 horas. La proteína modificada resultante se purificó por ultrafiltración centriprep. (MWCO 3 kDa, PB 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) a un volumen final de 1 ml. Después, la proteína se desprotegió por tratamiento con 100  $\mu\text{l}$  de una solución de hidroxilamina 0,5 M (PB 50 mM, EDTA 25 mM, pH 7,5). La purificación de la proteína final se realizó mediante ultrafiltración centriprep. (MWCO 3 kDa, PB 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) antes de la cuantificación de los tioles por el ensayo de Ellman (1:1,4 de tiol:lisozima).

- Conjugado lisozima-gluco-polímero (Lyz-6).** En un tubo de centrifuga Lo-Bind® de 1,5 ml se añadió lisozima de clara de huevo de gallina de tiopropionilo (LyzSH) (70  $\mu\text{l}$ , 10 mg/ml, DPBS, pH 8,0) y **6** (16 mg, 0,71  $\mu\text{mol}$ , 15 equiv.) y toda la reacción se diluyó a un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  (DPBS, pH 8,0) antes del almacenamiento a 4 °C durante 3 horas. La mezcla resultante se purificó por FPLC (PB 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), las fracciones se concentraron por ultrafiltración centriprep. (MWCO 3 kDa, DPBS, pH 7,4) y se almacenaron a 4 °C. Las muestras se diluyeron 5 veces antes de emplear el ensayo de actividad de lisozima EnzChek® para medir la actividad de las fracciones. En un ensayo típico se incubaron 50  $\mu\text{l}$  de muestra diluida con 50  $\mu\text{l}$  de *Micrococcus luteus* marcado con FITC (1 mg/ml) a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, la fluorescencia de la membrana celular lisada y, por lo tanto, la actividad de la lisozima se midió como fluorescencia FITC (abs 480 nm/em 530 nm) y se cuantificó en relación con los estándares conocidos.

5 *Conjugado lisozima-glucopolímero (Lyz-Poli 5-8).* En un tubo de centrifuga Lo-Bind® de 1,5 ml se añadió lisozima de clara de huevo de gallina de tiopropionilo (**LyzSH**) (70 µl, 10 mg/ml, DPBS, pH 8,0) y **Poli 5-8** (0,71 µmol, 15 equiv.) y toda la reacción se diluyó hasta un volumen final de 500 µl (DPBS, pH 8,0) antes del almacenamiento a 4 °C durante 3 horas. La mezcla resultante se purificó por FPLC (PB 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), las fracciones se concentraron por ultrafiltración centriprep. (MWCO 3 kDa, DPBS, pH 7,4) y se almacenaron a 4 °C antes de la caracterización adicional por SDS-PAGE.

10 *Lisozima de tipo silvestre.* La lisozima de tipo silvestre se preparó reconstituyendo la lisozima de clara de huevo de gallina (0,1 mg/ml, 1 equiv., DPBS, pH 7,4) según se recibió sin purificación adicional. Las muestras se diluyeron adicionalmente hasta 0,021 mg/ml (1 kU/ml) en 20 µl de alícuotas antes de la aplicación de liofilización o insultos térmicos.

15 *Lisozima de tipo silvestre estabilizada por glucopolímero.* Las muestras de lisozima de tipo silvestre mezcladas con glucopolímero se prepararon añadiendo polímero de trehalosa (**Poli 5-8**, 1 o 100 equiv. en relación con la lisozima) a una solución de lisozima (0,1 mg/ml, DPBS, pH 7,4) antes del almacenamiento a 4 °C. Las muestras se diluyeron adicionalmente a una concentración de lisozima de 0,021 mg/ml (1 kU/ml) en 20 µl de alícuotas antes de la aplicación de liofilización o insulto térmico.

20 *Lisozima de tipo silvestre estabilizada por trehalosa.* Las muestras de lisozima de tipo silvestre mezcladas con trehalosa se prepararon añadiendo trehalosa (1 o 100 equiv. en relación con el número de unidades de monómero de trehalosa en **Poli 5-8**) a una solución de lisozima (0,1 mg/ml, DPBS, pH 7,4) antes del almacenamiento a 4 °C. Las muestras se diluyeron adicionalmente a una concentración de lisozima de 0,021 mg/ml (1 kU/ml) en 20 µl de alícuotas antes de la aplicación de liofilización o insultos térmicos.

25 *Lisozima de tipo silvestre estabilizada por poli(etilenglicol) (PEG).* Las muestras de lisozima de tipo silvestre mezcladas con PEG se prepararon añadiendo PEG (2 kDa, 8,5 kDa, o 20 kDa; 1 o 100 equiv. en relación con la lisozima) a una solución de lisozima (0,1 mg/ml, DPBS, pH 7,4) antes del almacenamiento a 4 °C. Las muestras se diluyeron adicionalmente a una concentración de lisozima de 0,021 mg/ml (1 kU/ml) en 20 µl de alícuotas antes de la aplicación de liofilización o insultos térmicos.

30 *Ensayo de actividad de estabilidad de liofilización.* La lisozima de tipo silvestre se preparó reconstituyendo la lisozima de clara de huevo de gallina (0,1 mg/ml, DPBS, pH 7,4) según se recibió sin purificación adicional. Los controles de polímero se prepararon añadiendo polímero de trehalosa (Mn (RMN) 18 kDa, 0,14 mg/ml o 14 mg/ml, 1 equiv. o 100 equiv. respectivamente) a una solución de lisozima (0,1 mg/ml, DPBS, pH 7,4) antes del almacenamiento a 4 °C en 20 µl de alícuotas. Los controles de trehalosa se prepararon añadiendo trehalosa (0,12 mg/ml o 12 mg/ml, 0,37 µmol o 0,37 mmol, 48 equiv. o 4800 equiv. respectivamente) a una solución de lisozima (0,1 mg/ml, DPBS, pH 7,4, 1 equiv.) antes del almacenamiento a 4 °C en 20 µl de alícuotas. Se usó el conjugado Lyz-6 (0,1 mg/ml, DPBS a pH 7,4) después de la purificación por FPLC y el almacenamiento a 4 °C en 20 µl de alícuotas. Alícuotas de cada tipo se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido antes de la eliminación del disolvente por liofilización. Los sólidos blancos resultantes se reconstituyeron en 20 µl de agua Milli-Q, y este procedimiento se repitió durante un total de 10 ciclos de liofilización. A continuación, se usó el ensayo de actividad de lisozima EnzChek® como se ha descrito previamente para medir la actividad de lisozima de las muestras estresadas en relación con alícuotas idénticas que no se liofilizaron. Los resultados se proporcionan para 6 repeticiones. Las estadísticas se calcularon utilizando la prueba t de Student; % de confianza como  $\pm t^*(\text{desviación estándar})/(\text{número de ensayos})^{(1/2)}$  con  $p < 1\%$  de confianza/100.

35 *Ensayo de termoestabilidad (carga de calor).* La lisozima de tipo silvestre se preparó reconstituyendo la lisozima de clara de huevo de gallina (0,1 mg/ml, DPBS, pH 7,4) según se recibió y se almacenó sin purificación adicional a 4 °C en 20 µl de alícuotas. El conjugado Lyz-6 (0,1 mg/ml, DPBS pH 7,4) se usó después de la purificación por FPLC y se almacenó a 4 °C en 20 µl de alícuotas. Se estresaron alícuotas de cada tipo por calentamiento a 90 °C durante 3 horas antes del enfriamiento a 4 °C. A continuación, todas las muestras se diluyeron 1:40 antes del uso del ensayo de actividad de lisozima EnzChek® como se ha descrito anteriormente. Las actividades de las muestras estresadas se midieron en relación con alícuotas idénticas que no estuvieron expuestas al calor. Los resultados se proporcionan para 6 repeticiones. Las estadísticas se calcularon utilizando la prueba t de Student; % de confianza como  $\pm t^*(\text{desviación estándar})/(\text{número de ensayos})^{(1/2)}$  con  $p < 1\%$  de confianza/100.

## Ejemplo 2: Síntesis de un monómero/polímero ejemplar adicional [Ejemplo de referencia]

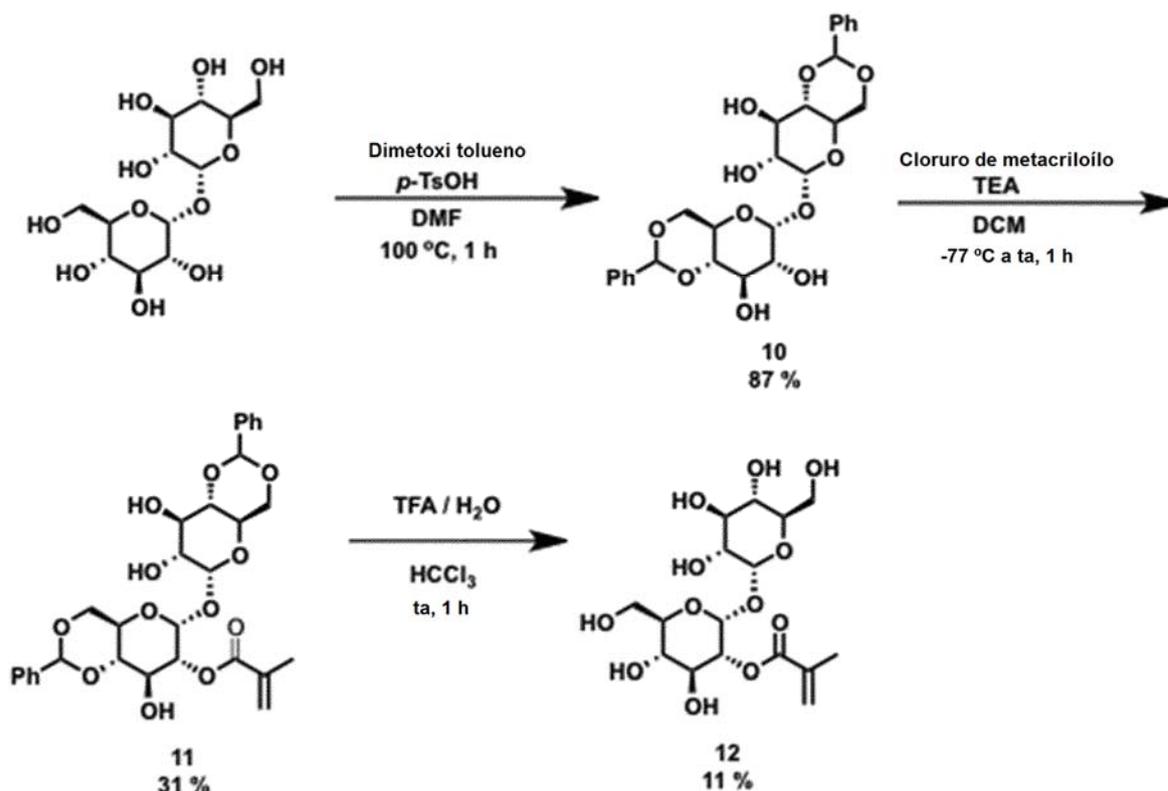
60 Como ejemplo ilustrativo de otro monómero que se puede polimerizar, se preparó el monómero de metacrililo **12** (Esquema 7), y se demostró su uso para la síntesis de polímeros. (Esquema 8).

## Materiales y métodos.

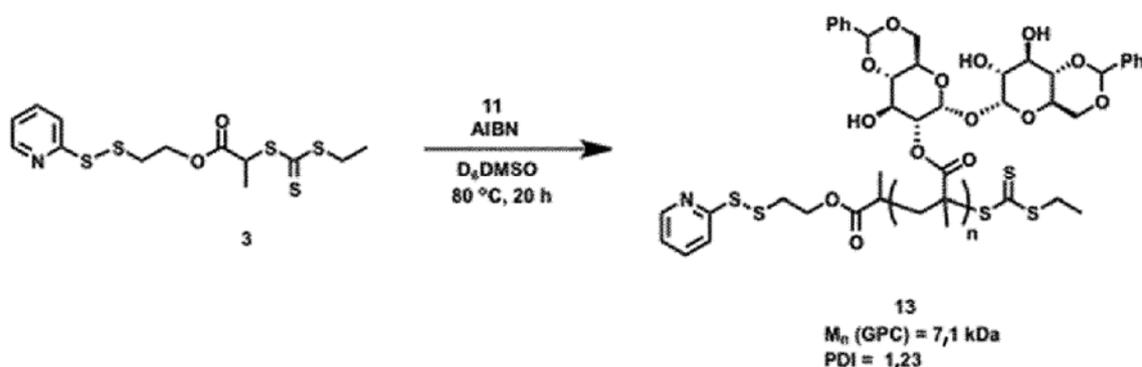
65 Todos los disolventes se adquirieron en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) y la trehalosa se adquirió en The Endowment for Medical Research, (Houston, TX). Todos los demás reactivos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich. La

dimetilformamida (DMF), el cloruro de metileno (DCM), la trietilamina (TEA) y el cloruro de metacrililo se destilaron antes de su uso. Se eliminó el agua de la trehalosa dihidrato mediante destilación azeotrópica repetida con etanol. El azobisisobutirilnitrilo (AIBN) se recristalizó 3 veces en etanol.

- 5 4,6-O-bencilideno- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)-4',6'-O-bencilideno- $\alpha$ -D-glucopiranosido (10). En un matraz de fondo redondo secado a la llama se añadieron trehalosa anhidra (5 g, 14,6 mmol, 1 equiv.), ácido p-tolueno sulfónico monohidrato (0,11 g, 0,6 mmol, 0,04 equiv.), y DMF (75 ml). Se añadió en dos porciones iguales dimetoxi tolueno (4,7 ml, 32,1 mmol, 2,2 equiv.) con 20 minutos de diferencia mientras se mantuvo la temperatura de reacción a 100 °C. La mezcla se agitó a 100 °C durante 40 minutos más antes de la eliminación del exceso de DMF al vacío para producir un líquido viscoso. El líquido se purificó adicionalmente en primer lugar por recristalización de xilenos seguida de recristalización de una mezcla de etanol:agua (1:3) para producir agujas largas de color blanco como el producto final (6,6 g, 13 mmol, 87 % de rendimiento).



- 15 **Esquema 7.** Síntesis de dibencilideno trehalosa (10) seguido de la esterificación posterior con cloruro de metacrililo para producir el monómero de trehalosa protegido (11) y eliminación de grupos protectores de bencilideno para obtener 2-metacrililo trehalosa (12).



- 20 **Esquema 8.** Polímero del monómero protegido (11) con CTA reactivo a tiol 3 para producir el glucopolímero (13) con un grupo terminal disulfuro activado.

- 25 2-metacril-4,6-O-bencilideno- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)-4',6'-O-bencilideno- $\alpha$ -D-glucopiranosido (11). En un matraz de

fondo redondo secado a la llama se disolvió dibencilideno trehalosa (1 g, 1,93 mmol, 1 equiv.) en DCM (20 ml), y se añadió TEA (0,59 g, 5,79 mmol, 3,0 equiv.). La mezcla de reacción se puso en protección con una atmósfera de argón y se enfrió a -77 °C. Se añadió gota a gota cloruro de metacrililo (0,30 g, 2,9 mmol, 1,5 equiv.) durante 30 minutos y la reacción se agitó posteriormente durante 6 horas a -77 °C y durante 48 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción en bruto se purificó directamente por cromatografía en columna (50 % de acetato de etilo en hexanos) para obtener el compuesto del título que se liofilizó en benceno para producir un sólido de color blanco (0,34 g, 0,59 mmol, 31 % de rendimiento).

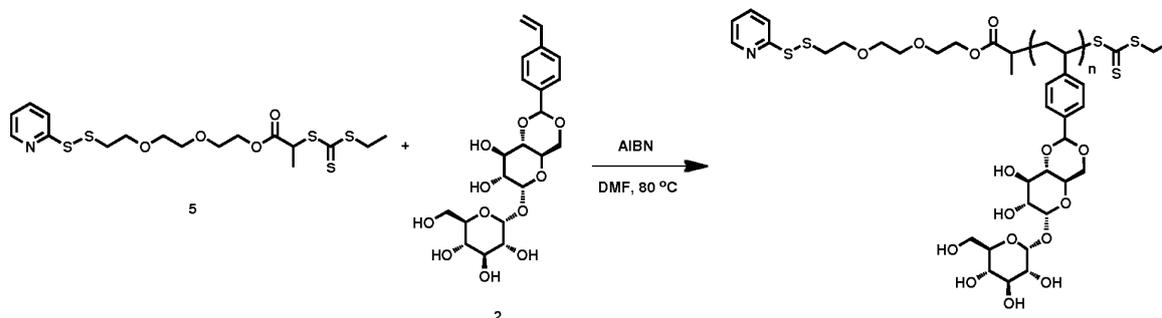
*2-metacril- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido (12).* En un matraz de fondo redondo secado a la llama **11** (250 mg, 0,43 mmol) se disolvió en cloroformo (10 ml) y la mezcla se puso en protección con una atmósfera de argón. Se añadieron simultáneamente ácido trifluoroacético (1 ml) y agua (1 ml) durante 5 min y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente antes de la eliminación de disolventes al vacío. El producto de reacción en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (80 % de acetato de etilo, 10 % de butanol, 5 % de ácido acético, 5 % de agua). Se eliminó el ácido acético del producto final por destilación azeotrópica con tolueno para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (19 mg, 0,046 mmol, 11 % de rendimiento).

*Poli(2-metacril-4,6-O-bencilideno- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  1)-4',6'-O-bencilideno- $\alpha$ -D-glucopiranosido) (13).* En un tubo schlenk secado a la llama se añadieron **2** (59 mg, 0,10 mmol, 100 equiv.), **CTA 3** (1,91 mg, 0,01 mmol, 5 equiv.), y AIBN (0,17 mg, 0,001 mmol, 1 equiv.). La mezcla se disolvió en d6-Dimetil sulfóxido, se puso en una atmósfera de argón y se sometió a 6 ciclos de congelación-bombeo-descongelación para la eliminación de oxígeno. La solución desgasificada se calentó a 80 °C durante 20 horas y la polimerización se detuvo por inmersión en nitrógeno líquido. La mezcla de polimerización en bruto resultante se purificó por diálisis contra agua seguido de metanol (MWCO 3.000 Da) y liofilización para obtener un polvo de color amarillo claro. Mn (GPC) 7,1 kDa, PDI (GPC) 1,23.

### Ejemplo 3: Síntesis de polímeros de masa molecular variable

Todos los polímeros de trehalosa pueden prepararse con diferentes pesos moleculares. Como se muestra en el Esquema 1, la polimerización RAFT de **2** con **3** se realizó a 80 °C. La relación utilizada para la polimerización fue [CTA]:[monómero]:[AIBN] = 1:29:0,2, con una concentración de monómero 0,8 M. Después de 6 h, la polimerización se detuvo para obtener una conversión del 77 %. El polímero se dializó contra bicarbonato de sodio acuoso con un MWCO de 2.000 g/mol. El peso molecular del polímero se analizó mediante espectroscopía de <sup>1</sup>H RMN y fue de 9.600 Da al comparar la integración de los picos de piridina del grupo terminal con el anillo aromático de estireno (véase la Figura 12). Los índices de polidispersidad (PDI) por GPC fueron 1,07, lo que demuestra que se formó un polímero bien definido. El estudio cinético del polímero de trehalosa demostró que los PDI estaban muy por debajo de 1,1 durante toda la polimerización. Las relaciones [CTA]: [monómero]: [AIBN] se alteraron después para obtener otros pesos moleculares que variaban de 4.200 g/mol a 19.000 g/mol (Tabla 2, **Poli 1-4**) con PDI estrechos obtenidos en todos los casos.

Como se muestra en el Esquema 9, se demostró que la polimerización RAFT de **2** en presencia de **5** avanza para un intervalo de pesos moleculares (Tabla 2, **Poli 5-8**) con una ligera desviación de las polidispersidades estrechas obtenidas para el intento de mayor peso molecular (Poli 8). Después de la purificación por diálisis (1 kDa de MWCO, H<sub>2</sub>O, 3 días), estos glucopolímeros reactivos de tiol se caracterizaron por espectroscopía de RMN para confirmar la retención del grupo terminal y la eliminación completa del monómero (véase la Figura 10).



**Esquema 9.** Polimerización del monómero **2** con CTA reactivo de tiol **5** para producir polímeros de Poli 5-8 con un grupo terminal disulfuro activado.

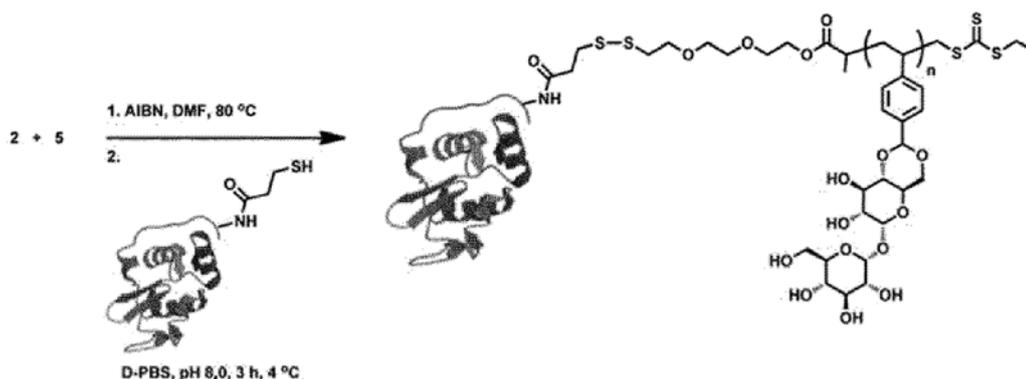
Como se muestra a continuación en la Tabla 2, la masa molecular del polímero resultante, según se mide por <sup>1</sup>H RMN, varía de acuerdo con la relación de concentración de los tres reactivos. Por lo tanto, la reacción se puede "ajustar" para obtener un polímero que tenga una masa molecular deseada.

**Tabla 2.** Relaciones de masa molecular de polímero y concentración de reactivo

Entrada	CTA	CTA:M: AIBN	Mn diana	Conv. (%)	Mn RMN	PDI
Poli 1	3	1:21:0,2	7.000	72	4.200	1,05
Poli 2	3	1:29:0,2	9.600	77	9.400	1,07
Poli 3	3	1:35:0,2	13.800	84	14.700	1,11
Poli 4	3	1:50:0,2	20.000	85	19.000	1,14
Poli 5	5	1:20:0,4	9.000	94	8.000	1,10
Poli 6	5	1:60:0,2	11.400	40	15.400	1,13
Poli 7	5	1:76:0,2	25.800	73	24.500	1,20
Poli 8	5	1:120:0,4	44.800	81	49.500	1,47

#### Ejemplo 4: Resistencia del conjugado lisozima-glucopolímero al estrés ambiental

Como se muestra en el Esquema 10, los polímeros de trehalosa se conjugaron entonces con lisozima tiolada. Se añadieron tioles a la lisozima de clara de huevo de gallina por tratamiento con succinimidil acetil-tiopropionato (SATP) en un procedimiento que se sabe que une covalentemente la funcionalidad de tioacetato a proteínas a través de enlaces amida (Hernanson, 1996). Después de la desprotección con hidroxilamina y la eliminación del exceso de SATP, los tioles libres se cuantificaron en la lisozima tiolada (**LyzSH**) mediante el ensayo de Ellman, dando como resultado una relación tiol: proteína de 1:1.4 (71 % de tiol). Después, la LyzSH se conjugó con diversos homopolímeros a base de trehalosa (**Poli 2, 5-8**). Después de la incubación con polímeros de trehalosa, se vieron conjugados por SDS-PAGE. El rendimiento de conjugación fue menor para **Poli 2** en comparación con **Poli 5-8**. Una posible explicación fue que el enlazador TEG aleja el grupo terminal reactivo de tiol de la cadena lateral de trehalosa voluminosa e hidratada del polímero mejorando el acceso a la superficie de la proteína.



**Esquema 10.** Polimerización RAFT de **2** con CTA **5** para producir los glucopolímeros reactivos de tiol **Poli 5** a **Poli 8**. Después, los glucopolímeros se conjugaron con lisozima tiolada.

Los conjugados de lisozima-glucopolímero (Lyz-Poli 5-8) se purificaron mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con ejecuciones posteriores de **LyzSH** y se usó **glucopolímero** en solitario para determinar qué fracciones serán puras de materiales de partida (véase la Figura 11). Estas fracciones se recogieron y se utilizaron en estudios posteriores. Adicionalmente, se usó SDS-PAGE para confirmar el aislamiento del conjugado como se demuestra por la ausencia de una banda de lisozima en condiciones no reductoras. La reaparición de la banda en condiciones reductoras indicó que el polímero se conjugó con la lisozima a través de un enlace disulfuro reducible. Las actividades de las fracciones de conjugado **Lyz-Poli** purificadas se confirmaron observando la lisis activa de las bacterias grampositivas marcadas con FITC *Micrococcus luteus* en el ensayo de actividad de lisozima EnzChek®.

La capacidad de los polímeros para estabilizar la lisozima con respecto a la liofilización se verificó primero, y los resultados se compararon con la trehalosa a las mismas concentraciones. Se añadieron Poli 5-8 a 100 equivalentes con respecto a la proteína (sin conjugar) a Lyz de tipo silvestre que no contenía tioles libres. También se analizaron muestras con trehalosa añadida a concentraciones equivalentes con respecto a la trehalosa en los diversos polímeros. Las muestras se expusieron a 10 ciclos de liofilización, y se determinó la actividad proteica. La proteína de tipo silvestre retuvo el 16 % de actividad después de este tratamiento, mientras que con un exceso de polímero de 100 veces, se observó una retención total (100 %) de actividad (Figura 10). Se observó el mismo efecto independientemente del peso molecular probado (8.000 a 49.500 Da). La trehalosa en concentraciones equivalentes a la de los polímeros de 100 veces solo estabilizó la lisozima entre el 18-31 %. Los resultados confirman que los polímeros pueden proteger la proteína durante la liofilización. Además, los datos muestran que el polímero es significativamente más eficaz que la trehalosa en solitario a la misma concentración en relación con las unidades de monómero presentes en el polímero. Esta observación indica que los efectos de estabilización de la trehalosa se potencian mediante el uso de un polímero donde la barrera entrópica para tener varios restos de carbohidratos organizados alrededor de la proteína ya se ha incluido en el excipiente. La propia trehalosa se ha propuesto para estabilizar las proteínas a la desecación mediante reemplazo de agua, atrapamiento de agua y vitrificación. Los mecanismos por los cuales los homopolímeros a base

de trehalosa estabilizan la proteína aún no se comprenden, y se están realizando estudios de investigación. Independientemente del mecanismo, los resultados sugieren que los polímeros de trehalosa pueden ser útiles como un reemplazo para el disacárido en formulaciones de biomoléculas no modificadas, particularmente en los casos en que las propiedades adicionales de los materiales impartidas por el polímero serían ventajosas.

5 Para investigar la capacidad del polímero para estabilizarse cuando se conjuga con la proteína, Lyz-Poli 5-8 se expusieron a los mismos 10 ciclos de liofilización. En este caso, los conjugados exhibieron entre el 59 y el 100 % de retención de actividad original en comparación con el 16 % de retención por lisozima de tipo silvestre (Figura 7). La Lyz-Poli 5 de menor peso molecular tuvo la actividad más baja, mientras que el polímero conjugado más grande Lyz-Poli 8 tuvo una retención total de actividad. Sin embargo, las actividades de los polímeros de tamaño medio no se correlacionaron directamente con el peso molecular. Es posible que esto se deba a diferentes números de polímeros unidos a la proteína en las fracciones analizadas; SDS PAGE no pudo calcular con precisión la cantidad de polímeros unidos en las fracciones recogidas debido a las bajas concentraciones involucradas. Más importante aún, los conjugados fueron todos significativamente más estables en comparación con las muestras que contenían una concentración similar de polímero añadido no unido (1 equiv. con respecto a la proteína); la adición de polímero dio como resultado solamente el 18-47 % de retención de la actividad de lisozima. Estos resultados muestran que conjugar el polímero con la proteína es ventajoso con respecto a la estabilidad ambiental. Se están realizando estudios para determinar la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de los conjugados de proteínas preparados a partir de estos polímeros para evaluar las propiedades farmacocinéticas y el uso potencial del polímero en conjugados terapéuticos.

20 También se sabe que la trehalosa estabiliza las biomoléculas con respecto a aumentos del calor (Kaushik y Bhat, 2003; Singer y Lindquist, 1998; Xie y Timasheff, 1997). Por lo tanto, un conjunto idéntico de muestras de lisozima también se estresó por la exposición a una carga de calor de 90 °C durante 1 hora (Figura 8). Aunque se encontró que la trehalosa confiere estabilización marginal a la concentración más alta probada aquí (retención de actividad del 31 % para 100 equiv. de Poli 8), el polímero de trehalosa realiza una protección superior al calor, tanto añadido como en forma de un conjugado. Se observó hasta un 81 % de retención de actividad en estas condiciones rigurosas. En este estudio en particular, el efecto protector no dependía de la concentración, ya que la adición de 1 equiv. y 100 equiv. o la conjugación del polímero dieron una retención de actividad similar para todos los pesos moleculares probados. Sin embargo, en otros estudios, que fueron de mayor duración y con una concentración diferente de proteína, se observó dependencia de la concentración (datos no mostrados). En general, los resultados demuestran que los glucopolímeros estabilizan la lisozima a altas temperaturas. Además, los datos sugieren que los polímeros deben investigarse adicionalmente como un excipiente y conjugarse para aplacar los requisitos de almacenamiento rigurosos que son típicos para las proteínas, particularmente durante el transporte en el que se pueden observar grandes fluctuaciones de temperatura.

### 35 **Ejemplo 5: Comparación entre los glucopolímeros de trehalosa y el excipiente de uso común poli(etilenglicol) (PEG)**

40 También se realizaron estudios iniciales adicionales para comparar los glucopolímeros de trehalosa con el excipiente de uso común poli(etilenglicol) (PEG). Como tal, PEG (Mn = 2-20 kDa) se combinó con lisozima de tipo silvestre a 1 o 100 equiv. y se estresó por liofilización o calor de la misma manera que antes. Se encontró que el efecto lioprotector del PEG (véanse las Figuras 12 y 13) depende del grado de polimerización (DP) con el glucopolímero de trehalosa que supera al PEG tanto para 1 como para 100 equiv. en relación con la proteína. Aunque basado en el peso molecular, 1 equiv. de glucopolímero realizado de manera similar a 1 equiv. de PEG y 100 equiv. de glucopolímero fue un lioprotector más eficaz que el PEG. La estabilidad térmica del PEG en relación con los glucopolímeros también se investigó exponiendo las muestras relevantes a una carga de calor de 90 °C durante 1 h como antes. Aunque el PEG media el estrés térmico en un grado mínimo, el glucopolímero de trehalosa supera al PEG basado en DP o Mn para todas las muestras probadas (véanse las Figuras 12 y 13). Los datos colectivamente indican que los polímeros de cadena lateral de trehalosa son altamente eficaces y superiores al PEG en solitario como estabilizadores de una proteína representativa, la lisozima, para la liofilización y el estrés por calor.

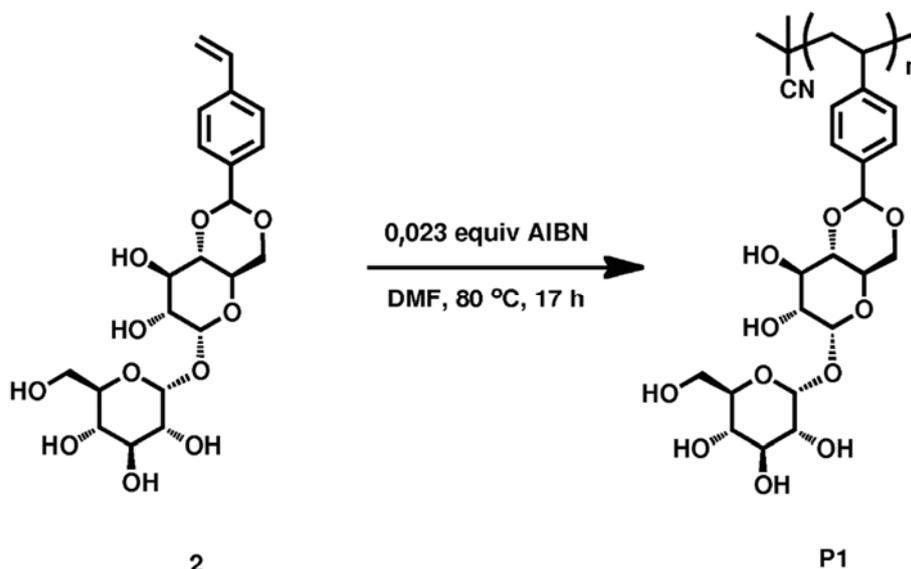
### 50 **Ejemplo 6: Polímeros a base de trehalosa por polimerización por radicales libres para su uso como excipientes**

55 Además del monómero con estirenil acetal como el gestor de polimerización, la trehalosa se modificó con restos de metacrilato acetal, metacrilato y éter de estirenilo para dar como resultado tres monómeros diferentes como ejemplos. Estos monómeros y el monómero de estirenil acetal se polimerizaron después por separado usando polimerización por radicales libres con azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador para sintetizar cada polímero de trehalosa. Los homopolímeros se ensayaron y mostraron una estabilización significativa de la actividad en la peroxidasa de rábano picante a 70 °C durante 30 min, glucosa oxidasa a 50 °C durante 30 min, insulina durante 1 h a 90 °C, y  $\beta$ -galactosidasa después de 4 ciclos de liofilización. Además, los estudios de citotoxicidad con NIH 3T3, macrófagos murinos RAW 264.7, fibroblastos dérmicos humanos, y células endoteliales de la vena umbilical humana, mostraron que no todos los polímeros eran citotóxicos a concentraciones de hasta 1 mg/ml según lo probado.

#### 60 Producción de glucopolímeros P1

65 El glucopolímero **P1** se preparó con el monómero **2** (Esquema 11). Se usó azobisisobutironitrilo (AIBN) como un

iniciador a 80 °C. Después de 17 h, la conversión monomérica fue del 100 %, y el polímero se purificó por diálisis contra H<sub>2</sub>O. El polímero resultante, **P1**, tenía un peso molecular promedio en número (M<sub>n</sub>) de 34,3 kDa y un PDI de 1,96 (Figura 17).



5

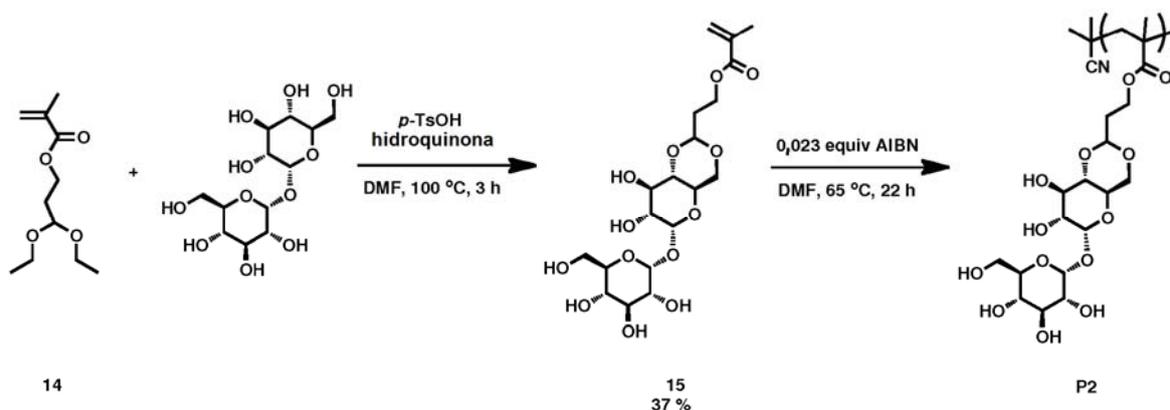
**Esquema 11.** Polimerización por radicales libres de **2** mediada por AIBN.

#### Producción de glucopolímeros P2

10

El monómero de metacrilato acetal trehalosa **15** se sintetizó usando metacrilato de 3,3'-dietoxipropilo (DEP-MA, **14**) como material de partida como se muestra en el Esquema 12. En condiciones ligeramente ácidas con *p*-TsOH e hidroquinona para inhibir la autopolimerización del DEPMA, el monómero **15** se sintetizó con un 37 % de rendimiento. Las Figuras 18 y 19 son los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN, respectivamente. Después, el monómero **15** se polimerizó con AIBN a 65 °C con una relación de AIBN con respecto al monómero de 1:43. Después de 22 h, los picos de vinilo de **15** desaparecieron en el espectro de RMN, lo que sugiere una conversión monomérica del 100 %. La diálisis contra H<sub>2</sub>O y la liofilización dieron como resultado **P2** con un M<sub>n</sub> de 30.100 g/mol y un PDI de 2,03 (Figura 20).

15



20

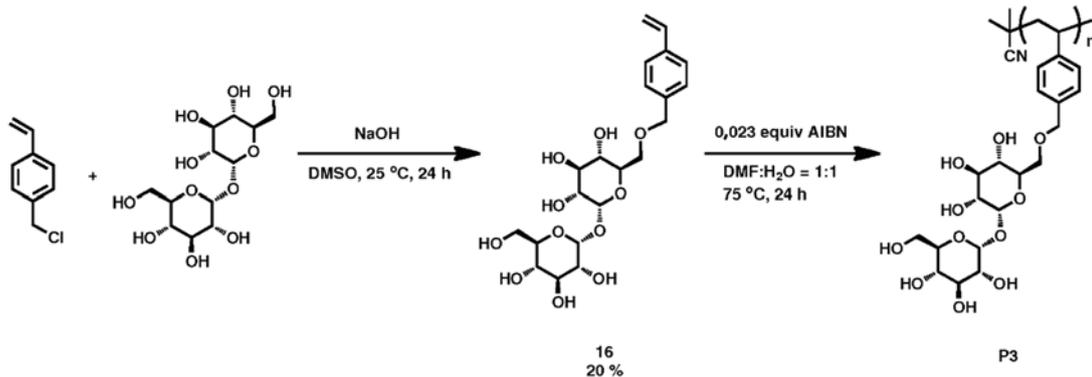
**Esquema 12.** Síntesis del glucomonómero **15** y polimerización por radicales libres de **15** mediada por AIBN.

#### Producción de glucopolímeros P3 (Referencia)

25

Se sintetizó otro monómero **16** en una etapa a partir del material de partida, cloruro de 4-vinil bencilo, mediante una ligera modificación de un procedimiento bibliográfico (Teramoto y Shibata, 2004). La trehalosa se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) con NaOH y se añadió lentamente cloruro de 4-vinil bencilo a la solución. Después de 24 h a 25 °C, la solución de DMSO se añadió gota a gota a diclorometano (DCM) para dar un precipitado de color blanco. El precipitado se secó y el monómero purificado por HPLC **16** se recogió en forma de un polvo de color blanco con un 20 % de rendimiento (La Figura 21 y la Figura 22 son los espectros de RMN). La polimerización de **16** se realizó en 1 : 1 = DMF : H<sub>2</sub>O. A 75 °C durante 24 h, la polimerización se detuvo y se purificó por diálisis contra H<sub>2</sub>O (espectro de RMN, Figura 23).

30



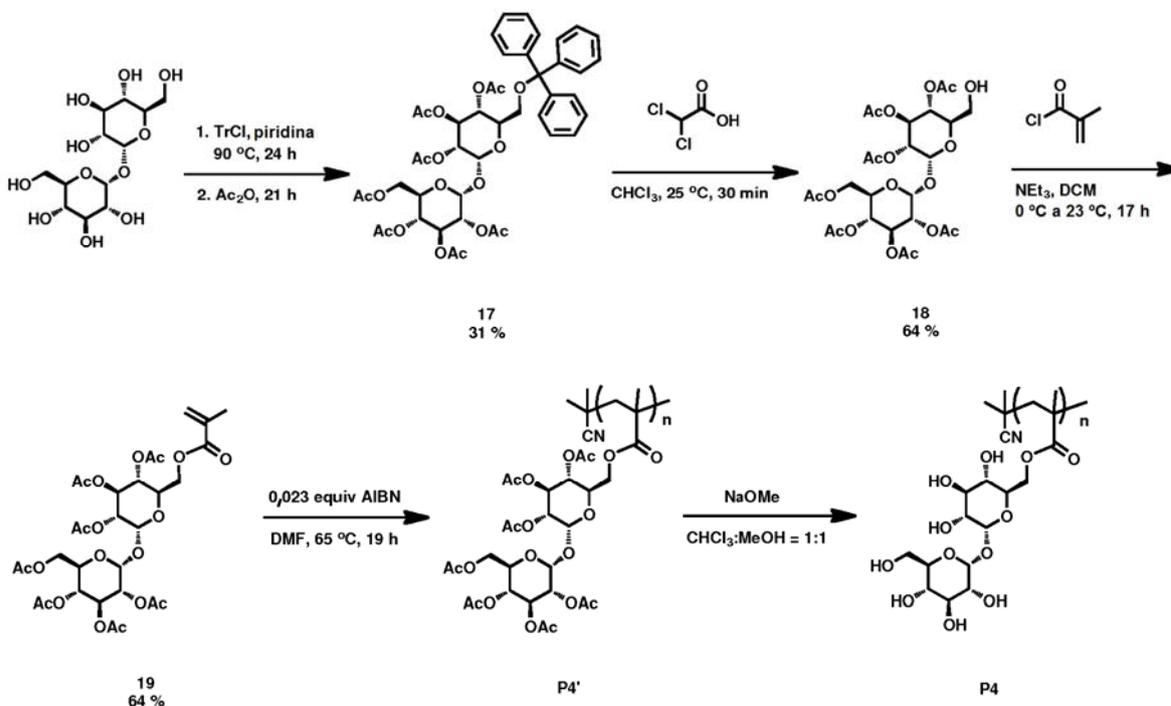
**Esquema 13.** Síntesis del glucomonómero **16** y polimerización por radicales libres de **16** mediada por AIBN.

5

#### Producción de glucopolímeros P4

Se sintetizó otro monómero protegiendo específicamente uno de los alcoholes primarios y añadiendo un resto de metacrilato a esa posición (Esquema 14). **17** y **18** se sintetizaron modificando un procedimiento bibliográfico anterior (Kurita, Masuda, et al., 1994). El grupo tritilo se usó para discriminar los grupos hidroxilo primarios y secundarios. Primero se tritiló la trehalosa, después se acetiló, y después se eliminó el grupo tritilo para dar **18** con solo un grupo hidroxilo libre en la 6<sup>a</sup> posición. El compuesto **18** se hizo reaccionar entonces con cloruro de metacrililo para dar el glucomonómero de metacrilato protegido con acetilo **19** con un rendimiento del 63,9 % (Figura 24 y Figura 25). Después, el monómero **19** se polimerizó con AIBN a 65 °C durante 19 h. Sin embargo, después de la purificación por precipitación en éter dietílico (RMN proporcionado como la Figura 26), **P4'** tenía un  $M_n$  de 18.292 g/mol y un PDI = 2,40. Después, **P4'** se desprotegió mediante una cantidad catalítica de NaOMe modificando el informe anterior, y el producto se eliminó por precipitación a medida que tuvo lugar la desprotección (Vazquez-Dorbatt y Maynard, 2006; Ambrosi, Batsanov, et al., 2002). **P4** se neutralizó con HCl y se dializó contra H<sub>2</sub>O. A partir de la espectroscopía <sup>1</sup>H RMN, el pico de protones de OAc metilo alrededor de 2 ppm desapareció (Figura 27). A partir de la IR, se observaron la desaparición de los tramos de acetilo C=O y C-O, y la aparición de la absorción de O-H.

20



**Esquema 14.** Síntesis del glucomonómero **19** y polimerización por radicales libres de **19** mediada por AIBN.

25

#### Estudios de estabilidad

Peroxidasa de rábano picante (HRP)

Se probó la actividad de la peroxidasa de rábano picante (HRP) después de la exposición a una temperatura de 70 °C durante 30 minutos, y los resultados se proporcionan en la Figura 28. La actividad de HRP se probó mediante reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que produce un subproducto azul. Las muestras de HRP se prepararon sin ningún aditivo, con 100 equivalentes de **P1-P4**, o 7500 equivalentes de trehalosa, que es igual a la trehalosa en la muestra **P1**. Después, se ensayaron las muestras calentadas para determinar la reactividad de HRP y se calculó el porcentaje de actividades originales usando la misma concentración de HRP sin calentamiento ni aditivo (Figura 28). Tras el calentamiento, HRP en solución sin ningún aditivo, solo se observó el 46 % de la actividad original. No obstante, todos los glucopolímeros (**P1-P4**) estabilizaron significativamente la proteína, y quedó el 100 % de la actividad enzimática original. La misma concentración de trehalosa mantuvo solo el 80 % de la actividad de la HRP. Todas las muestras se repitieron seis veces y su valor de *p* en comparación con ningún aditivo fue <0,001.

#### Glucosa oxidasa (GOX)

Los glucopolímeros de trehalosa **P1** a **P4** también se ensayaron para determinar la estabilización de glucosa oxidasa (GOX) contra 50 °C de calor durante 30 minutos. La actividad de GOX se evaluó usando el kit de ensayo de glucosa roja/glucosa oxidada Amplex® (Invitrogen). GOX reacciona con D-glucosa para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que después puede reaccionar con Amplex® en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP) para generar resorufina y puede detectarse por fluorescencia. Las muestras de GOX se prepararon sin ningún aditivo, con 100 equivalentes de **P1-P4**, y 7500 equivalentes de trehalosa, lo que es igual al número de unidades repetidas en el **P1**. Todas las muestras se calentaron a 50 °C durante 30 min y se repitieron seis veces. Después, se ensayaron las muestras calentadas para determinar la reactividad de GOX y se calculó el porcentaje de actividades originales usando la misma concentración de GOX sin calentamiento ni aditivo (Figura 29). El resultado muestra que los glucopolímeros de trehalosa, **P1**, **P2**, **P3**, y **P4** mantuvieron la actividad de GOX por encima del 85 %, mientras que GOX sin aditivo tenía el 68 % de su actividad con *p* <0,01, *p* <0,001, y *p* <0,001, respectivamente, lo que muestra significancia estadística. Además, todos los polímeros mostraron una estabilización exitosa en comparación con solo trehalosa, que mantuvo el 72 % de la actividad original *p* <0,05.

#### Insulina

**P1**, **P2**, **P3** preparados, y la misma concentración de trehalosa que un aditivo, se ensayaron para determinar la estabilización de la insulina contra el calentamiento a 90 °C durante 1 h. Después del calentamiento, todas las muestras se cargaron en el gel nativo (Figura 30). La insulina sin ningún aditivo se desnaturalizó y la banda casi desapareció en gel nativo. La banda de la insulina con trehalosa añadida se redujo considerablemente. Sin embargo, la insulina con **P1** y **P3** mostró claramente que quedaba la mayor parte de la banda de insulina, lo que indicaba que la estructura de la proteína prácticamente no había cambiado. La banda de insulina con **P2** fue más débil en comparación con **P1** y **P3**, pero fue más fuerte que sin ningún aditivo o con trehalosa. Los datos de MALDI-TOF determinan que la insulina, originalmente de 5,8 kDa, se desnaturaliza principalmente en dos fragmentos después del calentamiento (datos no mostrados). Esto se debe a la ruptura de dos puentes disulfuro que unen a la cadena de insulina  $\alpha$  y  $\beta$ .

#### $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -Gal)

La estabilización de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) también se ensayó después de múltiples ciclos de liofilización. Se sabe que  $\beta$ -Gal se desnaturaliza fácilmente mediante ciclos de liofilización o de congelación-descongelación (Pikal-Cleland y Carpenter, 2001). La actividad de  $\beta$ -Gal se midió al reaccionar con *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG), que libera *o*-nitrofenol, un producto de color amarillo que absorbe la luz a 420 nm. Los experimentos se repitieron seis veces y los resultados mostraron que los glucopolímeros de trehalosa son excipientes eficientes que pueden proteger la actividad de  $\beta$ -Gal contra los ciclos de liofilización. Después de 3 ciclos de liofilización,  $\beta$ -Gal tenía un 40 % de su actividad original y solo un 30 % más de actividad después del 4º ciclo, mientras que **P1** a **P3** mantuvieron una actividad del 83 al 98 %, dependiendo del polímero incluso después de 4 ciclos. Los polímeros superaron a la trehalosa, ya que la trehalosa mantuvo solo el 45 % de la actividad original (Figura 31).

Los experimentos de calentamiento para HRP, GOX, y el experimento de insulina y liofilización para  $\beta$ -Gal sugieren que los glucopolímeros de trehalosa pueden usarse como aditivos para estabilizar diversas proteínas contra el estrés por calor y liofilización. Cada vez, los polímeros superaron a la propia trehalosa.

#### Examen de citotoxicidad

Para examinar la posibilidad de estos glucopolímeros de trehalosa *in vivo*, se ensayaron las citotoxicidades de **P1**, **P2** y **P3** junto con PEG de 20 kDa y trehalosa como comparaciones. NIH 3T3 (fibroblastos de ratón), RAW 264.7 (macrófagos de monocitos leucémicos de ratón), HDF (fibroblastos dérmicos humanos) y HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) se cultivaron por separado y se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de 5 x 10<sup>3</sup> células por pocillo. Después de 24 horas, los medios de cultivo se reemplazaron con el medio de trabajo que contenía cada polímero o trehalosa con concentraciones de 0,1, 0,5 y 1 mg/ml. Después de 48 h de incubación, las células se tiñeron con el reactivo LIVE/DEAD y se capturaron imágenes fluorescentes para cada pocillo. Se contaron las células vivas y muertas, y se calculó el porcentaje de viabilidad celular dividiendo el número de células vivas por

el número total de células. Todos los experimentos se realizaron con cuatro repeticiones y se promediaron, y los resultados se muestran en la Figura 32. Los datos confirman que los glucopolímeros de trehalosa **P1-P3** no son citotóxicos para las cuatro líneas celulares analizadas. Además, en comparación con el PEG de 20 kDa y la trehalosa, **P1, P2, P3** no exhibieron ninguna citotoxicidad, lo cual es importante para su aplicabilidad para su uso *in vivo*.

5

#### Método y síntesis

**Polimerización por radicales libres de 1.** Se disolvió el glucomonomero **14** (391,8 mg,  $8,58 \times 10^{-1}$  mmol) en DMF (1,07 ml). Se añadió AIBN (3,28 mg,  $2,00 \times 10^{-2}$  mmol) a la solución. Se repitieron cinco ciclos de congelación-bombeo-descongelación, y la reacción se inició por inmersión en un baño de aceite a 80 °C. La polimerización se detuvo enfriando con nitrógeno líquido después de 17 h con conversión monomérica al 100 % por espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN. El producto se purificó por diálisis contra  $\text{H}_2\text{O}$  durante 3 días (MWCO 3.500 g/mol) y se secó usando un liofilizador, dando como resultado **P1**. El  $M_n$  del polímero fue 34.300 g/mol y el PDI fue de 1,96 por GPC.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz en  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 7,11, 6,39, 5,45, 5,23, 4,96, 4,86, 4,41, 4,12, 3,97, 3,78, 3,70, 3,62, 3,48, 3,17, 1,60, 1,24, 0,86. IR:  $\nu$  = 3384, 2916, 1635, 1380, 1150, 1074, 983  $\text{cm}^{-1}$ .

10

15

**Síntesis de 15.** Se disolvió trehalosa (3,96 g,  $1,16 \times 10^{-2}$  mol) en 100 °C DMF (72 ml). Se añadieron p-TsOH (44 mg,  $2,31 \times 10^{-1}$  mmol) e hidroquinona (12,73 mg,  $1,16 \times 10^{-1}$  mmol) a la solución. Después de la agitación durante 5 min, se añadió lentamente **14** (500 mg, 2,31 mmol) a la reacción. Después de 3 h, la reacción se detuvo y el disolvente se eliminó al vacío. El producto en bruto se purificó por HPLC (50 % de MeOH en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y se liofilizó dando como resultado polvo de color blanco (403,6 mg) con un 37 % de rendimiento.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz en  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 6,04 (s, 1H), 5,68-5,67 (t,  $J$  = 1,59 Hz, 1H), 5,10-5,09 (d,  $J$  = 5,31 Hz, 1H), 4,93-4,89 (m, 3H), 4,83-4,82 (d,  $J$  = 3,50 Hz, 1H), 4,78-4,76 (m, 2H), 4,70-4,68 (t,  $J$  = 5,00 Hz, 1H), 4,36-4,33 (t,  $J$  = 5,95 Hz, 1H), 4,16-4,13 (m, 2H), 3,97-3,94 (m, 1H), 3,89-3,84 (m, 1H), 3,69-3,64 (m, 2H), 3,57-3,53 (m, 2H), 3,49-3,41 (m, 2H), 3,35 (1H), 3,26-3,22 (m, 1H), 3,17-3,12 (m, 2H), 2,01-1,88 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$  RMN (500 MHz en  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 166,9, 136,1, 126,2, 99,2, 94,5, 94,1, 81,4, 73,0, 72,4, 71,8, 70,3, 69,8, 68,1, 62,7, 61,0, 60,6, 33,5, 18,3. IR:  $\nu$  = 3365, 2934, 1713, 1636, 1305, 1148, 979  $\text{cm}^{-1}$ . ESI-MS ( $\pm$  1,0) observado (predicho):  $\text{Na}^+$  489,1577 (489,1584).

20

25

**Polimerización por radicales libres de 15.** Se disolvió **15** (153 mg,  $3,28 \times 10^{-1}$  mmol) en DMF (1,64 ml) y se añadió AIBN (1,25 mg,  $7,61 \times 10^{-3}$  mmol) al matraz de reacción. Los ciclos de congelación-bombeo-descongelación se repitieron cinco veces, y la reacción se inició por inmersión en un baño de aceite a 65 °C. Después de 22 h, la conversión monomérica fue del 100 % por  $^1\text{H}$  RMN, y la polimerización se detuvo por enfriamiento en nitrógeno líquido. El polímero se dializó contra  $\text{H}_2\text{O}$  (MWCO 3.500 g/mol) y se liofilizó para dar como resultado **P2** con  $M_n$  = 30.100 g/mol y PDI = 2,03.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz en  $\text{D}_6\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 5,15, 4,94, 4,85, 4,67, 4,38, 3,98, 3,88, 3,69, 3,57, 3,48, 3,17, 1,90, 1,23, 0,83. IR:  $\nu$  = 3374, 2932, 1716, 1638, 1384, 1273, 1146, 1047, 984  $\text{cm}^{-1}$ .

30

35

**Síntesis de 16.** **16** se sintetizó modificando un procedimiento bibliográfico donde la trehalosa se sustituyó en múltiples grupos hidroxilo (Teramoto y Shibata, 2004). Se añadió NaOH (4,44 g,  $1,14 \times 10^{-1}$  mol) a  $\text{DMSO}$  (96 ml) y se agitó durante 5 min. Después, se añadió trehalosa (4,86 g,  $1,42 \times 10^{-2}$  mol) en el matraz de reacción. Después de toda la disolución de trehalosa, se añadió lentamente cloruro de 4-vinil bencilo (0,4 ml,  $2,84 \times 10^{-3}$ ) y la solución de reacción cambió a amarillo brillante. La reacción se agitó durante 24 h a 25 °C y precipitó en 4 l de DCM en un baño de hielo. Los precipitados se secaron al vacío y se purificaron por HPLC (50 % de MeOH en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Después de la liofilización, el producto monosustituido deseado (261,1 mg) se obtuvo en forma de polvo de color blanco con un 20 % de rendimiento.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 7,47-7,45 (m, 2H), 7,35-7,33 (m, 2H), 6,77-6,71 (m, 1H), 5,84-5,80 (d,  $J$  = 17,69 Hz, 1H), 5,30-5,28 (d,  $J$  = 11,42 Hz, 1H), 5,23-5,22 (d,  $J$  = 3,68 Hz, 1H), 5,14-5,13 (d,  $J$  = 4,05 Hz, 1H), 4,69-4,61 (m, 2H), 3,91-3,51 (m, 10H), 3,45-3,39 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  RMN (500 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 137,5, 136,6, 136,2, 128,9, 126,4, 114,7, 93,5, 91,4, 78,7, 73,2, 72,4, 72,2, 72,0, 72,0, 71,0, 69,8, 69,2, 60,6, 60,1. IR:  $\nu$  = 3369, 2931, 1642, 1408, 1368, 1147, 1083, 1044, 989  $\text{cm}^{-1}$ . ESI-MS ( $\pm$  1,0) observado (predicho):  $\text{Na}^+$  481,1692 (481,1686).

40

45

**Polimerización por radicales libres de 16.** Se disolvieron **16** (146,4 mg) y AIBN (1,22 mg) en  $\text{H}_2\text{O}$  (0,6 ml) y DMF (0,6 ml), respectivamente. Ambas soluciones se añadieron a un matraz de reacción y después de cinco ciclos de congelación-bombeo-descongelación, la polimerización se inició colocando el recipiente de reacción en un baño de aceite a 75 °C. Después de 24 h, la polimerización se detuvo por enfriamiento con nitrógeno líquido. El polímero resultante se dializó contra  $\text{H}_2\text{O}$  (MWCO 3.500 g/mol) durante 3 días para la purificación y se liofilizó para obtener un polvo de color blanco. El polímero resultante no se disolvió en DMF, sin embargo, la traza GPC acuosa mostró un peso molecular similar en comparación con **P1** y **P2**.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 7,04, 6,48, 5,04, 4,55, 3,82, 3,70, 3,60, 3,50, 3,35, 1,48, 1,14. IR:  $\nu$  = 3341, 2932, 1654, 1510, 1424, 1367, 1147, 1080, 1046, 987  $\text{cm}^{-1}$ .

50

55

**Síntesis de 17.** **17** se sintetizó modificando una bibliografía anterior donde la trehalosa se sustituyó con un grupo tritilo en múltiples grupos hidroxilo (Kurita, Masuda, et al., 1994). Se agitó trehalosa (4,91 g, 14,35 mmol, 1,5 equiv.) en 20 ml de piridina durante 30 min. Después, se añadió cloruro de tritilo ( $\text{TrCl}$ , 2,67 g, 9,57 mmol, 1,0 equiv.), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de Ar a 90 °C durante 24 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió anhídrido acético (12 ml, 127,2 mmol, 13,3 equiv.), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de Ar a 23 °C durante 21 h. La piridina se eliminó a alto vacío. Al sólido en bruto, se le añadió  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ , después la capa orgánica se lavó secuencialmente con HCl 0,1 N,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  sat. y salmuera. Después, la capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó a través de gel de

60

65

silíce cromatografía ultrarrápida con EtOAc/Hexano = 3/4 + 1 % de NEt<sub>3</sub> (Fr ~0,3) para obtener 2,62 g de un sólido de color blanco con un 31 % de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,38-7,21 (m, 15H), 5,50-5,45 (m, 2H), 5,40-5,37 (dd, J = 3,85, 7,85 Hz, 2H), 5,18-5,15 (dd, J = 3,85, 10,2 Hz, 2H), 5,13-5,06 (m, 2H), 4,27-4,23 (m, 1H), 4,14-4,04 (m, 3H), 3,10-3,03 (m, 2H), 2,11-1,74 (s, 21H). <sup>13</sup>C RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>) δ: 170,81, 170,25, 170,12, 169,91, 169,72, 169,69, 169,30, 143,47, 128,71, 128,01, 127,24, 92,51, 92,48, 86,71, 70,43, 70,38, 70,27, 69,85, 69,61, 68,99, 68,67, 68,35, 61,94, 61,81, 20,88, 20,81, 20,79, 20,77, 20,67, 20,54. IR: ν = 2956, 2941, 1746, 1449, 1367, 1239, 1213, 1072, 1030, 985, 962, 902, 805, 766, 749. ESI-MS (± 1,0) observado (predicho): Na<sup>+</sup> 901,2892 (901,2895).

**Síntesis de 18.** **18** se sintetizó modificando una bibliografía anterior donde la trehalosa se desprotegió para revelar múltiples grupos hidroxilo (Kurita, Masuda, et al., 1994). **17** (1,69 g, 1,928 mmol) se disolvió en 8 ml de CHCl<sub>3</sub>, después se añadieron 8 ml de ácido dicloroacético y se agitó a 23 °C durante 30 min. La mezcla en bruto se lavó una vez con H<sub>2</sub>O, y después tres veces con NaHCO<sub>3</sub> sat. Después, la capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó a través de gel de sílice cromatografía ultrarrápida con DCM+3 % de MeOH (Fr ~0,25) para obtener 780 mg de un sólido de color amarillo con un 64 % de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,45-5,23 (m, 2H), 5,29-5,27 (t, J = 3,85 Hz, 2H), 5,06-4,98 (m, 4H), 4,26-4,22 (dd, J = 5,5, 12,2 Hz, 1H), 4,09-3,86 (m, 2H), 3,99-3,96 (dd, J = 2,05, 12,2 Hz, 1H), 3,64-3,52 (m, 2H), 2,06-2,01 (s, 21H). <sup>13</sup>C RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>) δ: 170,61, 170,33, 169,97, 169,93, 169,88, 169,70, 169,60, 169,57, 92,97, 92,86, 70,83, 70,48, 70,06, 69,95, 69,93, 69,86, 69,75, 69,59, 68,79, 68,52, 68,46, 68,14, 61,77, 61,71, 60,95, 20,90, 20,71, 20,68, 20,67, 20,61, 20,58. IR: ν = 3523, 2962, 2106, 1742, 1435, 1367, 1208, 1163, 1137, 1032, 986, 899, 802, 736 cm<sup>-1</sup>. ESI-MS (± 1,0) observado (predicho): Na<sup>+</sup> 659,1762 (659,1799).

**Síntesis de 19.** Se disolvió **18** (360 mg, 0,566 mmol, 1 equiv.) en 1,9 ml de DCM seco en un baño de hielo, después se añadió NEt<sub>3</sub> (1,18 ml, 8,48 mmol, 15 equiv.). Se disolvió cloruro de metacrilóilo (0,55 ml, 5,66 mmol, 10 equiv.) en 2 ml de DCM seco, y la solución se añadió gota a gota a la mezcla de reacción. Después, la mezcla se agitó en una atmósfera de Ar de 0 °C a 23 °C durante 17 h. La sal NEt<sub>3</sub>+Cl<sup>-</sup> se eliminó por filtración, y la solución se lavó con HCl al 10 %, H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> sat. y después salmuera. Después, la capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó a través de gel de sílice cromatografía ultrarrápida con EtOAc:Hexano = 1:1 (Fr ~0,4) para obtener 254,5 mg de aceite de color amarillo con un 64 % de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,10 (s, 1H), 5,61 (s, 1H), 5,51-5,45 (m, 2H), 5,28-5,24 (dd, J = 3,85, 17,75 Hz, 2H), 5,08-5,00 (m, 4H), 4,23-3,98 (m, 6H), 2,07-2,01 (s, 21H), 1,92 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>) δ: 170,60, 169,96, 169,95, 169,64, 169,55, 169,53, 169,50, 166,82, 135,52, 126,60, 92,28, 92,17, 70,08, 69,95, 69,87, 69,67, 68,69, 68,47, 68,19, 68,13, 62,09, 61,74, 20,68, 20,67, 20,62, 20,60, 20,58, 20,52, 18,21. IR: ν = 2930, 1746, 1368, 1213, 1033, 897, 804 cm<sup>-1</sup>. ESI-MS (± 1,0) observado (predicho): Na<sup>+</sup> 727,2078 (727,2062).

**Polimerización por radicales libres de 19.** **19** (221,9 mg, 0,315 mmol, 43 equiv.) y AIBN (1,2 mg, 0,0073 mmol, 1 equiv.) se pesaron en un tubo Schlenk y se disolvieron en 0,5 ml de DMF. Los ciclos de congelación-bombeo-descongelación se repitieron cinco veces, y la reacción se inició por inmersión en un baño de aceite a 65 °C. Después de 19 h, la conversión monomérica alcanzó el 83 % por <sup>1</sup>H RMN, y la polimerización se detuvo por enfriamiento en nitrógeno líquido. La DMF se eliminó a alto vacío. El producto en bruto se disolvió de nuevo en DCM y precipitó en éter dietílico frío tres veces. Se recogieron 160 mg de sólido de color blanco **P4'** con M<sub>n</sub> = 18.300 g/mol y PDI = 2,40. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz en CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,46, 5,30, 5,28, 5,07, 4,20, 4,06, 2,07, 2,03, 1,68, 1,25, 0,85. IR: 2957, 1742, 1432, 1367, 1212, 1159, 1034, 896, 802, 746 cm<sup>-1</sup>.

**Desprotección de P4'.** **P4'** (100 mg, 0,142 mmol de monómero, 1 equiv.) se disolvió en 1 ml de CHCl<sub>3</sub> y 1 ml de MeOH, y se agitó durante 15 min para su disolución. Se añadió NaOMe al 30 % en MeOH (5,26 ul, 0,0284 mmol, 0,2 equiv.) y se agitó en una atmósfera de Ar durante 2 h. Se formó un precipitado de color blanco en 20 min. El precipitado se recogió por centrifugación, y después se disolvió de nuevo en H<sub>2</sub>O. El pH se neutralizó con HCl 0,1 N, y la solución se dializó (MWCO 3.500 g/mol) contra H<sub>2</sub>O (1 l x 2). Después, la solución se filtró con una filtro de jeringa 0,2 μm para eliminar cualquier sólido insoluble. La solución acuosa se liofilizó para obtener 44 mg de **P4**. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz en D<sub>2</sub>O) δ: 5,16, 5,07, 4,26, 4,02, 3,95, 3,76, 3,67, 3,53, 3,36, 2,03, 1,86, 0,98, 0,81. IR: 3342, 2934, 1722, 1367, 1232, 1147, 1102, 1019, 802 cm<sup>-1</sup>.

**Peroxidasa de rábano picante estabilizada por P1-P4 a 70 °C.** Se prepararon 0,15 mg/ml de solución de HRP en tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 7,0. Las soluciones madre de 100 equiv. de **P1**, **P2**, **P3** y **P4** y 7500 equiv. de también se prepararon en el mismo tampón. Se mezclaron 2 μl de alícuotas de solución de HRP con 2 μl de alícuotas de cada solución de polímero y trehalosa para dar una concentración final de 75 μg/ml de HRP o con solamente tampón. Las muestras se calentaron a 70 °C durante 30 min y el control se almacenó a 4 °C hasta que se realizó el ensayo de actividad. El ensayo se repitió 6 veces después del procedimiento conocido con tetrametilbencemidina (TMB).

**Glucosa oxidasa estabilizada por P1-P4 a 50 °C.** Se prepararon 0,2 mg/ml de solución de GOX en tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 7,0. La solución madre de 100 equiv. de **P1**, **P2**, **P3** y **P4** y 7500 equiv. de trehalosa también se preparó en tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 7,0. Se mezclaron 2 μl de alícuotas de una solución de GOX con 2 μl alícuotas de cada solución de polímero y trehalosa, o tampón solamente, para dar la concentración final de 0,1 mg/ml de GOX. Las muestras se calentaron a 50 °C durante 30 min y el control se almacenó a 4 °C hasta que se realizó el ensayo de actividad. La actividad se midió usando un kit de ensayo de glucosa roja/glucosa oxidasa Amplex®

siguiendo procedimientos manuales del producto.

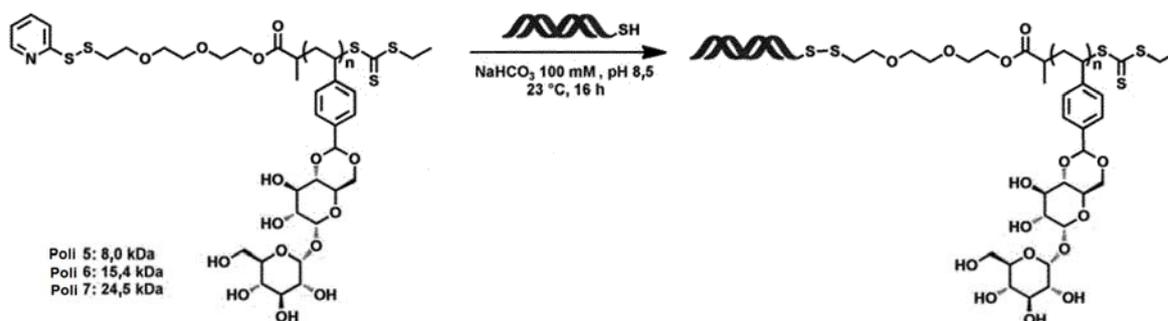
**Insulina humana recombinante estabilizada por P1-P3 a 90 °C.** La insulina se disolvió en tampón D-PBS a pH 7,4 (1 mg/ml). Las muestras se prepararon añadiendo 10 equiv. de **P1**, **P2**, y **P3** o 750 equiv. de trehalosa en la solución de insulina. El control se almacenó a 4 °C hasta la caracterización con gel nativo. Otras muestras con polímeros o trehalosa se calentaron a 90 °C durante 1 hora y se pasaron por el gel nativo.

**$\beta$ -Galactosidasa estabilizada por P1-P3 para la liofilización.** Se preparó 0,4 mg/ml de una solución de  $\beta$ -Gal en tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 7,0. Se mezclaron 50  $\mu$ l de alícuotas de una solución de  $\beta$ -Gal con 150  $\mu$ l de tampón o 150  $\mu$ l de polímero (100 equiv.) o trehalosa (7500 equiv.) en H<sub>2</sub>O para dar como resultado 0,1 mg/ml de solución de proteína. Las alícuotas de cada muestra se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido antes de la liofilización. Las muestras se liofilizaron durante 12 h durante un ciclo por debajo de 1 mbar. Después de cada ciclo, se añadieron 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y la liofilización se repitió durante 3 ciclos y 4 ciclos. El control se almacenó a 4 °C hasta que se realizó el ensayo de actividad. El ensayo incluye 6 repeticiones al reaccionar con o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG).

**Ensayo de citotoxicidad de P1-P3.** La citotoxicidad de los glucopolímeros de trehalosa se evaluó mediante el ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® (Invitrogen) con células NIH 3T3, RAW 264.7, HDF y HUVEC. Se cultivaron células NIH 3T3 y RAW 264.7 en DMEM (Gibco) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) y penicilina al 1 %-estreptomycin. Las células HDF se cultivaron en medio de crecimiento de fibroblastos (Promocell) que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 2 %, 1 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), 5  $\mu$ g/ml de insulina, y penicilina al 1 %-estreptomycin. Las HUVEC se cultivaron en medio de crecimiento de células endoteliales (Promocell) que contenía FCS al 2 % con complementos recomendados por el proveedor. Las células se sembraron en placas de 48 pocillos (BD Falcon) a una densidad de 5 x 10<sup>3</sup> células por pocillo. Después de 24 h, los medios de cultivo se reemplazaron con 200  $\mu$ l del medio de trabajo que contenía concentraciones conocidas de polímeros de 0,1, 0,5 y 1 mg/ml. Después de la incubación durante 48 horas, las células se lavaron suavemente dos veces con D-PBS precalentado y se tiñeron con el reactivo LIVE/DEAD (calceína AM 2  $\mu$ M y homodímero de etidio-1 4  $\mu$ M). Las imágenes fluorescentes de cada pocillo se capturaron en un microscopio Axiovert 200 con una cámara AxioCam MRm y una lámpara de mercurio FluoArc. Se contó el número de células vivas y muertas, y se calculó el porcentaje de viabilidad celular dividiendo el número de células vivas por el número total de células. Todos los experimentos se realizaron con cuatro repeticiones y se promediaron. Para todos los ensayos en el informe, las estadísticas para determinar la significancia se calcularon en base a una prueba t de Student independiente de dos muestras con varianza desigual.

### Ejemplo 7: Glucopolímeros de trehalosa para la estabilización de ARNs

El ds-ARNsi modificado con tiol se desprotegió con DTT para proporcionar un tiol libre en el extremo 5' de la hebra sentido. Después, tres tamaños diferentes de polímero de trehalosa funcionalizado en extremo con disulfuro de piridilo se conjugaron con ARNs a través de intercambio de disulfuro (Esquema 15). Los tres polímeros son Poli 5, Poli 6 y Poli 7. En un gel TBE PAGE, ARNs y los conjugados se analizaron en condiciones tanto reductoras como no reductoras (datos no mostrados). En condiciones reductoras, los enlaces disulfuro de los polímeros se escindieron, por lo que solo se vieron las bandas que representan ARNs libre. Sin embargo, en condiciones no reductoras, se observó el frotis de mayor peso molecular de los conjugados. Las eficiencias de conjugación de la reacción de los polímeros con ARNs para formar los conjugados A, B y C se calcularon como del 85 %, 76 % y el 73 %, respectivamente.



**Esquema 15.** Conjugación de ARNs con Poli 5, Poli 6, y Poli 7.

La ribonucleasa RNase ONE™ degrada el ARN fácilmente y se ensayó la estabilidad del ARNs con el polímero de trehalosa para determinar la protección contra la degradación de la nucleasa. Después de una hora de incubación con RNase ONE a 37 °C, el ARNs desnudo se degradó casi por completo por gel (Figura 33). Sin embargo, todos los conjugados A-C mostraron una alta estabilidad hacia la degradación de RNase ONE. Para confirmar si la conjugación es esencial para el efecto de estabilización, también se comparó el efecto de añadir el polímero de trehalosa Poli 5 o

añadir trehalosa al ARNsi desnudo (datos no mostrados). A partir del carril 8 y 10 del gel, se observa que el polímero Poli 5 y la trehalosa protegen mejor el ARNsi que no tener aditivos (carril 4). Sin embargo, todavía se observó degradación/escisión. La conjugación del polímero es superior a solo añadirlo al ARNsi.

- 5 La estabilidad del ARNsi sin aditivo, trehalosa como aditivo, polímero de trehalosa Poli 5 como aditivo y el conjugado A en suero bovino (CBS) al 80 % se ensayó. La degradación se observó tomando puntos de tiempo a las 0, 1, 3 y 6 (y 24) horas (Figura 34). A partir de la Figura 34 a)-c), se observó que la adición de trehalosa o polímero de trehalosa Poli 5 no mostró una diferencia significativa en la degradación de ARNsi durante 6 horas. Por otro lado, después de 6 horas de incubación en 80 % de CBS a 37 °C, el conjugado A todavía era claramente observable con ~63 % de retención. En conclusión, la conjugación de polímeros de trehalosa con ARNsi aumenta eficazmente su estabilidad hacia las nucleasas y las condiciones séricas.

#### Material y síntesis

- 15 **Conjugación de ARNsi con polímero de trehalosa funcionalizado en el extremo de disulfuro de piridilo Poli 5-7.** Se mezclaron 30 µl de una solución 0,0383 mM de (ds)-ARNsi bicatenario con 5 µl de una solución 200 mM de ditiotreitól (DTT) y se mantuvo durante 3 h a 24 °C. Para eliminar el DTT sin reaccionar, el ds-ARNsi se precipitó usando etanol. El sedimento de ARNsi se resuspendió completamente en 30 µl de una solución de Poli 5, 6, 7 (50 equiv. en tampón de bicarbonato sódico 100 mM a pH 8,5). La mezcla de reacción se dejó a 23 °C durante 20 h. Los conjugados también se trataron con DTT para confirmar que la conjugación covalente de ARNsi con polímeros podría revertirse en condiciones fisiológicamente relevantes. Las mezclas de reacción de conjugado (ARNsi 0,03 nmol, 5 µl) en agua se incubaron con DTT (10 nmol, 1 µl en agua) durante 1 h a 23 °C. Los conjugados reducidos y no reducidos se analizaron entonces mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida Tris Borato EDTA (TBE) al 15 % a un voltaje constante de 200 V durante 40 minutos usando tampón IX TBE (pH 8,0). El ds-ARNsi se tiñó incubando el gel en tinte de ácido nucleico IX SYBR-Safe/tampón TBE. La eficacia de la conjugación se cuantificó utilizando el programa Quanti-One (BioRad).

- 30 **Prueba de estabilidad de RNasa.** Las muestras (ARNsi 0,07 nmol, µl se mezclaron con agua libre de nucleasas (o 50 equiv. de Poli 5/825 equiv. de trehalosa en agua, datos no mostrados) hasta un volumen final de 8 µl. Se añadió RNase ONE ribonucleasa (1 µl, 1 unidad, en tampón de reacción: Tris HCl 100 mM, pH 7,5, EDTA 50 nM, acetato sódico 2 M) a cada muestra y las muestras se incubaron a 37 °C durante hasta 60 minutos. Las reacciones de nucleasa se terminaron mediante la adición de solución de SDS (1 µl de solución al 1 % en agua). Las muestras se analizaron por PAGE usando gel al 15 % de TBE-Urea a un voltaje constante de 200 V durante 40 min usando tampón IX TBE (pH 8,0). El gel se tiñó incubando en tinte de ácido nucleico IX SYBR-Safe/tampón TBE durante 30 min. El porcentaje de retención de ARNsi o los conjugados se determinaron tomando la proporción de la intensidad de la banda y se normalizaron a la intensidad de la banda de ARNsi o conjugado antes del tratamiento con RNase ONE.

- 40 **Prueba de estabilidad en suero.** Las estabilidades del ARNsi sin aditivo, trehalosa como aditivo, polímero de trehalosa Poli 5 como aditivo, y el conjugado A se ensayaron individualmente en suero bovino de ternera al 80 % (CBS). En un experimento típico, las muestras (ARNsi 0,1 nmol, 5 µl) se incubaron en FBS al 80 % v/v con un volumen total de 50 µl a 37 °C durante hasta 24 horas. Durante el periodo de incubación, se tomaron alícuotas (10 µl) en puntos de tiempo predeterminados e inmediatamente se congelaron a -80 °C hasta su uso posterior. Después, todas las muestras se analizaron juntas usando electroforesis en gel con gel preparado con de TBE al 15 %-urea, a un voltaje constante de 200 V durante 45 minutos usando tampón de ejecución IX TBE (pH 8,0). El porcentaje de degradación en cada punto de tiempo se determinó tomando la proporción de la intensidad de la banda de ARNsi en cada punto de tiempo con respecto a la intensidad de la banda de ARNsi a las 0 horas.

- 50 Se prevé que el método divulgado para estabilizar biomoléculas se pueda combinar con otros enfoques actuales utilizados para estabilizar biomoléculas, tales como, por ejemplo, modificación química, ingeniería de proteínas (por ejemplo, PEGilación, adición de sacarosa polimérica y/o dextrano, metoxipolietilenglicol, poli-carboxibetaína, y/o sulfonato de poli-estireno, etc.), reticulación de proteínas (por ejemplo, producción de cristales de enzimas reticuladas o CLEC, etc.), inmovilización del catalizador, proteínas de fusión modificadas y otras metodologías químicas o biológicas. La combinación de técnicas de estabilización puede mejorar las propiedades farmacológicas y aumentar significativamente la estabilidad de la biomolécula a la temperatura, desecación, luz, almacenamiento, exposición a enzimas, endo y exo-nucleasas y variación del pH.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 60 1. Abuchowski, A., Mccoy, J.R., Palczuk, N.C., Vanes, T. & Davis, F.F. Effect of Covalent Attachment of PolyethyleneGlycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase. *Journal of Biological Chemistry* 252, 3582-3586 (1977).
- 65 2. Aga, H.; Shibuya, T.; Fukuda, S.; Miyake, T. Reduction inhibitory agent for active-oxygen eliminating activity. US 07186824, Mar 6 2007.
3. Alconcel, S.N.S., Baas, A.S. & Maynard, H.D. FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs.

Polymer Chemistry 2, 1442-1448 (2011).

4. Andya, J.; Cleland, J. L.; Hsu, C. C.; Lam, X. M.; Overcashier, D. E.; Shire, S. J.; Yang, J. Y.-F.; Wu, S. S.-Y. Protein formulation. US 07682609, Mar 23 2010.

5. Bachmann, F.; Lohmann, D.; Chabreck, P. Unsaturated carbohydrate derivatives polymers thereof and their use. US 5693768, Dec. 2, 1997.

6. Bays, E., Tao, L., Chang, C.W. & Maynard, H.D. Synthesis of Semitelechelic Maleimide Poly(PEGA) for Protein Conjugation by RAFT Polymerization. Biomacromolecules 10, 1777-1781 (2009).

7. Beattie, G. M.; Crowe, J. H.; Tablin, F.; Hayek, A. Cryopreservation of human adult and fetal pancreatic cells and human platelets. US 5827741, Oct. 27, 1998.

8. Bollin, E. J.; Fletcher, M. G. TREHALOSE AS STABILIZER AND TABLETING EXCIPIENT US PATENT-4762857. AUGUST 9 1988. US 4762857, 1988.

9. Brockbank, K. G. M.; Campbell, L. H.; Ratcliff, K. M.; Sarver, K. A. Method for treatment of cellular materials with sugars prior to preservation. US 08017311, Sep 13 2011.

10. Carpenter, J. F.; Hand, S. C.; Crowe, J. H.; Crowe, L. M. CRYOGENIC PROTECTANT FOR PROTEINS US PATENT-4806343. FEBRUARY 21 1989. US 4806343, 1989.

11. Chaen, H.; Mitsuhashi, M.; Miyake, T. Method and composition for improving the aftertaste of sucrose. US 6432470, Aug. 13, 2002.

12. Chaen, H.; Oku, K.; Miyake, T. Method for inhibiting trimethylamine formation. US 6576281, June 10, 2003.

13. Chaen, H.; Oku, K.; Uchida, Y.; Miyake, T. Method for inhibiting the formation of volatile aldehydes including their related compounds and/or the decomposition of fatty acids including their related compounds, and uses thereof. US 6268353, July 31, 2001.

14. Chi, E.Y., Krishnan, S., Randolph, T.W. & Carpenter, J.F. Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. Pharmaceutical Research 20, 1325-1336 (2003).

15. Chiefari, J.; Cong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; J., J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H., Macromolecules 1998, 31, 5559-5562.

16. Cleland, J. L.; Jones, A. J. S. Excipient stabilization of polypeptides treated with organic solvents. US 5804557, Sept. 8, 1998.

17. Cohen, S.; Yoshioka, T.; Lucarelli, M.; Hwang, L. H.; Langer, R., Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic Glycolic Acid) Microspheres. Pharmaceutical Research 1991, 8, (6), 713-720.

18. Collis, M. P.; Szczepanik, S. H. Vehicle for delivery of particles to a sample. US 5840878, Nov. 24, 1998.

19. Collis, Matthew P., Szczepanik, Stephen H., Vehicle for delivery of particles to a sample U.S. Patent No. 5,962,310, October 5, 1999.

20. Cooper, J. M.; Tian, W. Edible compositions containing trehalose. US 6620791, Sep. 16, 2003.

21. Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Tablin, F.; Wolkers, W. F.; Tsvetkova, N. M.; Oliver, A. F. Erythrocytic cells and method for preserving cells. US 6770478, Aug. 3, 2004.

22. Crowe, L.M., Reid, D.S. & Crowe, J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? Biophys. J. 71, 2087-2093 (1996).

23. DePablo, J.; Miller, D.; Conrad, P.; Corti, H. Preservation and storage medium for biological materials. US 06919172, Jul 19 2005.

24. DePablo, J.; Nie, Y.; Palecek, S. P. Lyophilization of human platelets. US 07169606, Jan 30 2007.

25. Fukuda, S.; Ario, T.; Miyake, T. Drugs against articular failure. US 07214667, May 8 2007.

26. Fukuda, S.; Miyake, T. Agent for improving the blood circulation. US 5981498, Nov. 9, 1999.

27. Gribbon, E. M.; Martyn, G. P.; Colaco, C. A. L. S. Tablet dosage form of clavulanic acid and amoxicillin comprising a trehalose excipient. US 6194001, Feb. 27, 2001.
- 5 28. Grimshaw, M. N.; Barbieri, D. J.; Vizzini, L. M.; Marsh, S. F. Rapidly disintegrable tablets. US 07425341, Sep 16, 2008.
29. Hand, S. C.; Menze, M. A. Preservation of eukaryotic cells using reversible pore formation. US 07314755, Jan 1, 2008.
- 10 30. Harris, J.M. & Chess, R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2, 214-221 (2003).
31. Hengherr, S., Heyer, A.G., Kohler, H.R. & Schill, R.O. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades - evidence for divergence in responses to dehydration. *Febs Journal* 275, 281-288 (2008).
- 15 32. Jain, N.K. & Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science* 18, 24-36 (2009).
33. Kajiyama, A.; Tamura, T.; Mizumoto, T.; Kawai, H.; Takahashi, T. Quick disintegrating tablet in buccal cavity and manufacturing method thereof. US 07074428, Jul 11 2006.
- 20 34. Kampinga, J.; Colaco, C. A. L. S. Compositions for use in rehydration and nutrition during athletic exercise and methods of making same. US 6455511, Sep. 24, 2002.
- 35 35. Kampinga, J.; Colaco, C., Compositions for use in rehydration and nutrition during athletic exercise and methods of making same, US 6596702, July 22, 2003.
- 25 36. Katagiri, N.; Iritani, S.; Miyake, T. Hard candy with a relatively-high moisture and hardness, and process of the same. US 6455096, Sep. 24, 2002.
- 30 37. Kaushik, J.K. & Bhat, R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry* 278, 26458-26465 (2003).
- 35 38. Keefe, A. J.; Jiang, S., Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity. *Nature Chemistry* 2012, 4, 59-63.
39. Kitagawa, M.; Chalermisrachai, P.; Fan, H.; Tokiwa, Y., Chemoenzymatic Synthesis of Biodegradable Polymers Containing Glucobiose Branches. *Macromolecular Symposium* 1999, 144, 247-256.
- 40 40. Kowata, T.; Sato, M.; Shimomura, T.; Yamashita, M. Inhibitory agent for protein denaturation, kneaded meat with suppressed freezing-denaturation, process thereof, and process of fish and meat paste products. US 6641853, Nov. 4, 2003.
- 45 41. Kurita, K.; Hirakawa, N.; Morinaga, H.; Iwakura, Y., Synthetic-Polymers Containing Sugar Residues .6. Novel Polyurethanes by Direct Addition Polymerization of Alpha,Alpha-Trehalose with Diisocyanates. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* 1979, 180, (11), 2769-2773.
- 50 42. Kurita, K.; Masuda, N.; Aibe, S.; Murakami, K.; Ishii, S.; Nishimura, S. I., SYNTHETIC CARBOHYDRATE POLYMERS CONTAINING TREHALOSE RESIDUES IN THE MAIN-CHAIN - PREPARATION AND CHARACTERISTIC PROPERTIES. *Macromolecules* 1994, 27, (26), 7544-7549.
43. Lam, X. M.; Oeswein, J. Q.; Ongpipattanakul, B.; Shahrokh, Z.; Wang, S. X.; Weissburg, R. P.; Wong, R. L. Antibody formulation. US 06991790, Jan 31 2006.
- 55 44. Le, T.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. 1998.
45. Levine, F. Vacuum-mediated desiccation protection of cells. US 6528309, Mar. 4, 2003, 2003.
- 60 46. Lyczak, J. B.; Morrison, S. L., Biological and Pharmacokinetic Properties of a Novel Immunoglobulin-Cd4 Fusion Protein. *Archives of Virology* 1994, 139, (1-2), 189-196.
47. Maity, H., O'Dell, C., Srivastava, A. & Goldstein, J. Effects of Arginine on Photostability and Thermal Stability of IgG1 Monoclonal Antibodies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 761-766 (2009).
- 65 48. Mandai, T.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Miyake, T. Trehalose composition for prolonging product shelf life. US 6005100, Dec. 21, 1999.

49. Mateczun, A. J.; Peruski, L. F., Jr. Viable dried bacteria produced by drying in the presence of trehalose and divalent cation. US 6610531, Aug. 26, 2003.
50. Mateo, C. et al. Removal of amphipathic epitopes from genetically engineered antibodies: Production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma* 19, 463-471 (2000).
51. Matsuo, T.; Kurimoto, M.; Yamauchi, H. Pharmaceutical composition for ophthalmic use. US 6555526, Apr. 29, 2003.
52. Mizumoto, T.; Masuda, Y.; Kajiyama, A.; Yanagisawa, M.; Nyshadham, J. R. Tablets quickly disintegrating in the oral cavity and process for producing the same. US 6589554, July 8, 2003.
53. Ohkouchi, K.; Koyama, H. Quickly disintegrating solid preparations. US 6740339, May 25, 2004.
54. Ohtake, S. & Wang, Y.J. Trehalose: Current Use and Future Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100, 2020-2053 (2011).
55. Okada, M.; Ikeda, Y.; Ono, K.; Kurazumi, T.; Kasai, S.; Imamori, K. Quickly soluble solid preparations. US 6455053, Sep. 24, 2002.
56. Oku, K.; Kubota, M.; Fukuda, S.; Miyake, T. Composition for inhibiting body odor and uses thereof. US 6497862, Dec. 24, 2002.
57. Oobatake, M. & Ooi, T. HYDRATION AND HEAT-STABILITY EFFECTS ON PROTEIN UNFOLDING. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 237-284 (1993).
58. Park, O. J.; Kim, D. Y.; Dordick, J. S., Enzyme-catalyzed synthesis of sugar-containing monomers and linear polymers. *Biotechnology and Bioengineering* 2000, 70, (2), 208-216.
59. Roberts, M.J., Bentley, M.D. & Harris, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliver Rev* 54, 459-476 (2002).
60. Roser, B. J.; Blair, J. Rapidly soluble oral solid dosage forms, methods of making same, and compositions thereof. US 5762961, June 9, 1998.
61. Roser, B. J.; Blair, J.; Colaco, C.; Hatley, R. H. M. Oral solid dosage forms, methods of making same and compositions thereof. US 5958455, Sep. 28, 1999.
62. Roser, B. J.; Kampinga, J.; Colaco, C.; Blair, J. Solid dose delivery vehicle and methods of making same. US 07785631, Aug 31, 2010.
63. Sakurai, M. Biological Functions of Trehalose as a Substitute for Water. *Water and Biomolecules: PHYSICAL CHEMISTRY OF LIFE PHENOMENA*, 219-240 (2009).
64. Seki, K. Method for preserving mammalian organs. US 6475716, Nov. 5, 2002.
65. Shinoda, T.; Maeda, A.; Itou, N.; Mizumoto, T.; Yamazaki, S.; Takaishi, Y. Composition comprises sustained-release fine particles and manufacturing method thereof. US 07575762, Aug 18 2009.
66. Srinivasachari, S.; Liu, Y. M.; Prevet, L. E.; Reineke, T. M., Effects of trehalose click polymer length on pDNA complex stability and delivery efficacy. *Biomaterials* 2007, 28, (18), 2885-2898.
67. Srinivasachari, S.; Liu, Y. M.; Zhang, G. D.; Prevet, L.; Reineke, T. M., Trehalose click polymers inhibit nanoparticle aggregation and promote pDNA delivery in serum. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, (25), 8176-8184.
68. Sundaramurthi, P., Shalaev, E. & Suryanarayanan, R. "pH Swing" in Frozen Solutions-Consequence of Sequential Crystallization of Buffer Components. *Journal of Physical Chemistry Letters* 1, 265-268 (2010).
69. Syed, S., Schuyler, P.D., Kulczycky, M. & Sheffield, W.P. Potent antithrombin activity and delayed clearance from the circulation characterize recombinant hirudin genetically fused to albumin. *Blood* 89, 3243-3252 (1997).
70. Syed, S.; Schuyler, P. D.; Kulczycky, M.; Sheffield, W. P., Potent antithrombin activity and delayed clearance from the circulation characterize recombinant hirudin genetically fused to albumin. *Blood* 1997, 89, (9), 3243-3252.
71. Takeuchi, Yasuo; Shibuya, Takashi, Miyake, Toshio, U.S. Patent No. 6,254,912, July 3, 2001.

72. Teramoto, N.; Arai, Y.; Shibasaki, Y.; Shibata, M., A facile synthesis of a novel polyacetal containing trehalose residue in the main chain. *Carbohydrate Polymers* 2004, 56, (1), 1-6.
- 5 73. Teramoto, N.; Arai, Y.; Shibata, M., Thermo-reversible Diels-Alder polymerization of difurfurylidene trehalose and bismaleimides. *Carbohydrate Polymers* 2006, 64, (1), 78-84.
74. Teramoto, N.; Shibata, M., Trehalose-based thermosetting resins. I. Synthesis and thermal properties of trehalose vinylbenzyl ether. *Journal of Applied Polymer Science* 2004, 91, (1), 46-51.
- 10 75. Oku, Kazuyuki; Kubota, Michio; Fukuda, Shigeharu; Miyake, Toshio; Radical reaction inhibitors, method for inhibition of radical reactions, and use thereof, U.S. 2005-0267067, December 1, 2005.
76. Uchida, Y.; Iritani, S.; Miyake, T. Method for enhancing the salty-taste and/or delicious-taste of food products. US 6159529, Dec. 12, 2000.
- 15 77. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 203, 1-60 (2000).
- 20 78. Wang, Y.-C. J.; Yang, B.; Jennings, R. N.; Protter, A. A. Controlled release delivery of peptide or protein. US 6187330, Feb. 13, 2001.
79. Wang, Y.-C. J.; Yang, B.; Jennings, R. N.; Protter, A. A. Controlled release delivery of peptide or protein. US 6187330, Feb. 13, 2001.
- 25 80. Westh, P. & Ramlov, H. Trehalose Accumulation in the Tardigrade *Adorybiotus-Coronifer* during Anhydrobiosis. *Journal of Experimental Zoology* 258, 303-311 (1991).
81. Wolfenden, R.; Yuan, Y., Rates of spontaneous cleavage of glucose, fructose, sucrose, and trehalose in water, and the catalytic proficiencies of invertase and trehalase. *Journal of the American Chemical Society* 2008, 130, (24), 7548-7549
- 30 82. Yanagisawa, M.; Mizumoto, T. Bitterness-reduced intrabuccally quick disintegrating tablets and method for reducing bitterness. US 06998139, Feb 14, 2006.
- 35 83. Yang, W.; Zhang, L.; Wang, S. L.; White, A. D.; Jiang, S. Y., Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly(carboxybetaine) in undiluted blood serum. *Biomaterials* 2009, 30, (29), 5617-5621.
- 40 84. Yoshizane, C.; Nishizaki, Y.; Arai, S.; Kurimoto, M. Agent for anti-osteoporosis. US 6440446, Aug. 27, 2002.
85. Sakurai, M., Murata, M., Inoue, Y., Hino, A. & Kobayashi, S. Molecular-dynamics study of aqueous solution of trehalose and maltose: Implication for the biological function of trehalose. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 70, 847-858 (1997)
- 45 86. Ambrosi, M.; Batsanowv, A. S.; Cameron, N. R.; Davis, B. G.; Howard, J. A. K.; Hunter, R. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 2002, 45.
87. Hermanson, G.T. *Bioconjugate techniques*. Academic Press, Inc., 1250 Sixth Ave., San Diego, California 92101, USA; Academic Press Ltd., 14 Belgrave Square, 24-28 Oval Road, London NW1 70X, England, UK, 1996
- 50 88. Li, R. C.; Boryer, R. M.; Maynard, H. D. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 2006., 44, 2004.
89. Perrier, S., Takolpuckdee, P. & Mars, C.A. Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization: End group modification for functionalized polymers and chain transfer agent recovery. *Macromolecules* 38, 2033-2036 (2005)
- 55 90. Pikal-Cleland, K. A.; Carpenter, J. F. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 90, 1255.
91. Reisener, H.J., Perlin, A.S., Ledingham, G.A. & Goldschmid, H.R. FORMATION OF TREHALOSE AND POLYOLS BY WHEAT STEM RUST (*PUCCINIA GRAMINIS TRITICI*) UREDOSPORES. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 40, 1248-& (1962)
- 60 92. Steinem, C. et al. Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45, 17-26 (1998)
- 65 93. Sun, G.R., Cheng, C. & Wooley, K.L. Reversible addition fragmentation chain transfer polymerization of 4-

vinylbenzaldehyde. *Macromolecules* 40, 793-795 (2007)

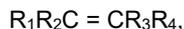
94. Vazquez-Dorbatt, V.; Maynard, H. D. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2297.

5 95. Zabransky, J.; Houska, M.; Kalal, J. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* 1985, 186, 223.

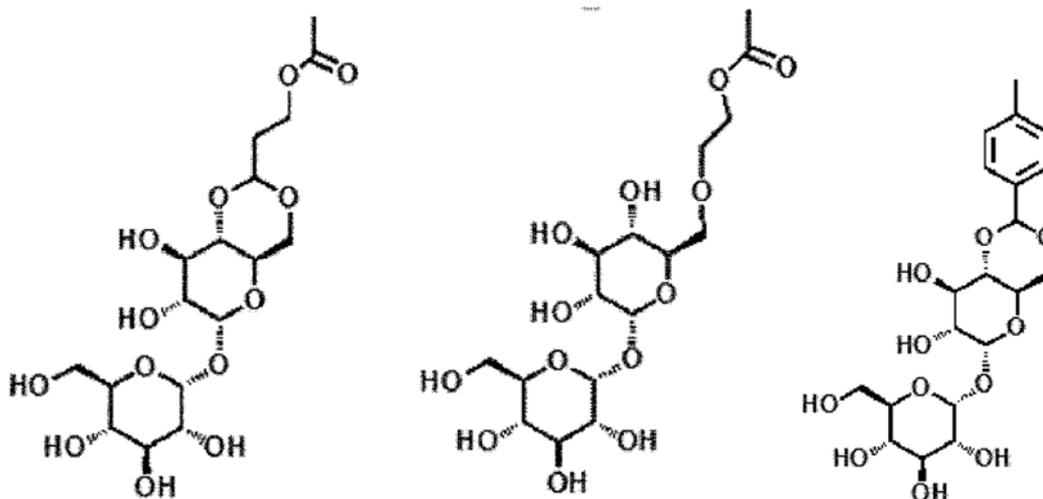
10 96 Nguyen, T. H.; Kim, S. H.; Wong, D. Y.; Decker, C. G.; Loo, J. A.; Maynard, H. D., "Heparin Mimicking Polymer Conjugate Stabilizes bFGF to Environmental Stressors," *Nature Chemistry*, 2013, DOI: 10.1038/NCHEM.1573

REIVINDICACIONES

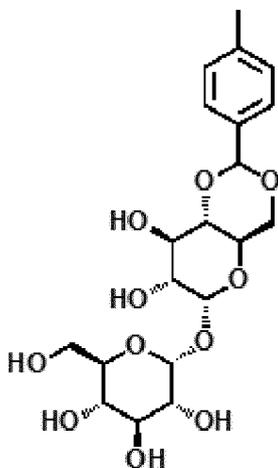
1. Un monómero para su uso en la fabricación de un homopolímero o un copolímero para estabilizar una biomolécula, teniendo el monómero la estructura general:



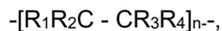
en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidrógeno, R<sub>3</sub> es hidrógeno o metilo y R<sub>4</sub> es una cadena lateral de la fórmula -L-trehalosa, en la que L es un enlazador que une trehalosa al monómero y L-trehalosa tiene una estructura seleccionada de:



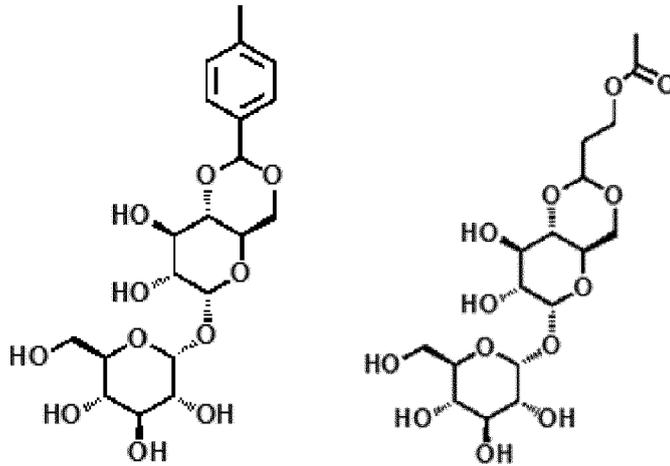
2. El monómero de la reivindicación 1, en el que -L-trehalosa tiene la estructura



3. Un homopolímero o copolímero que comprende la estructura general:

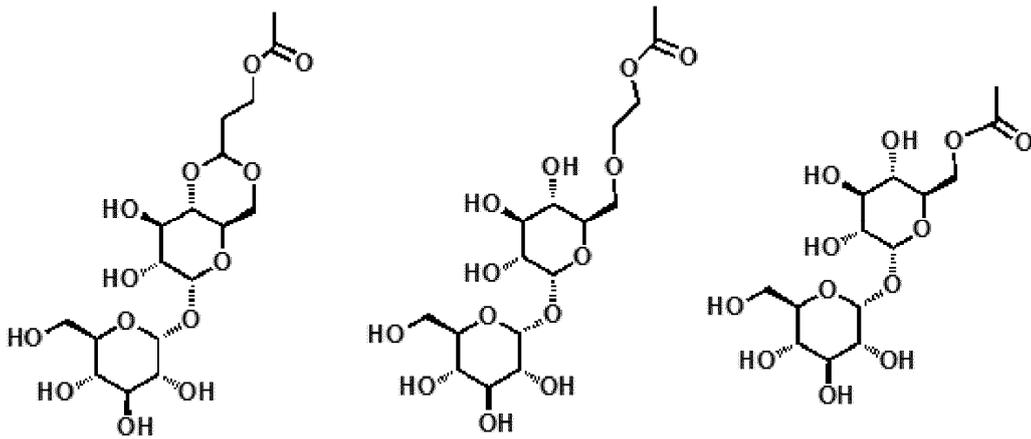


en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidrógeno, R<sub>3</sub> es hidrógeno o metilo, y R<sub>4</sub> es una cadena lateral de la fórmula -L-trehalosa, en la que L es un enlazador que une trehalosa al monómero a través de al menos uno de los grupos hidroxilo (-OH) de trehalosa, en la que L es -(COO)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- (n=0-6), o en la que la -L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura seleccionada de:

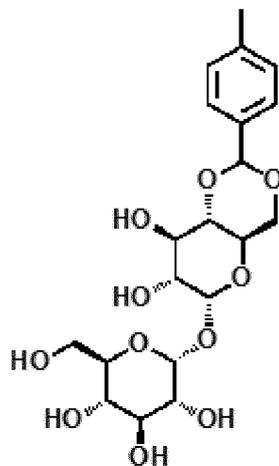


4. El homopolímero o copolímero de la reivindicación 3, en el que el enlazador L es  $-(COO)-(CH_2)_n-$  ( $n=0-6$ ).

5. El homopolímero o copolímero de la reivindicación 4, en el que la L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:

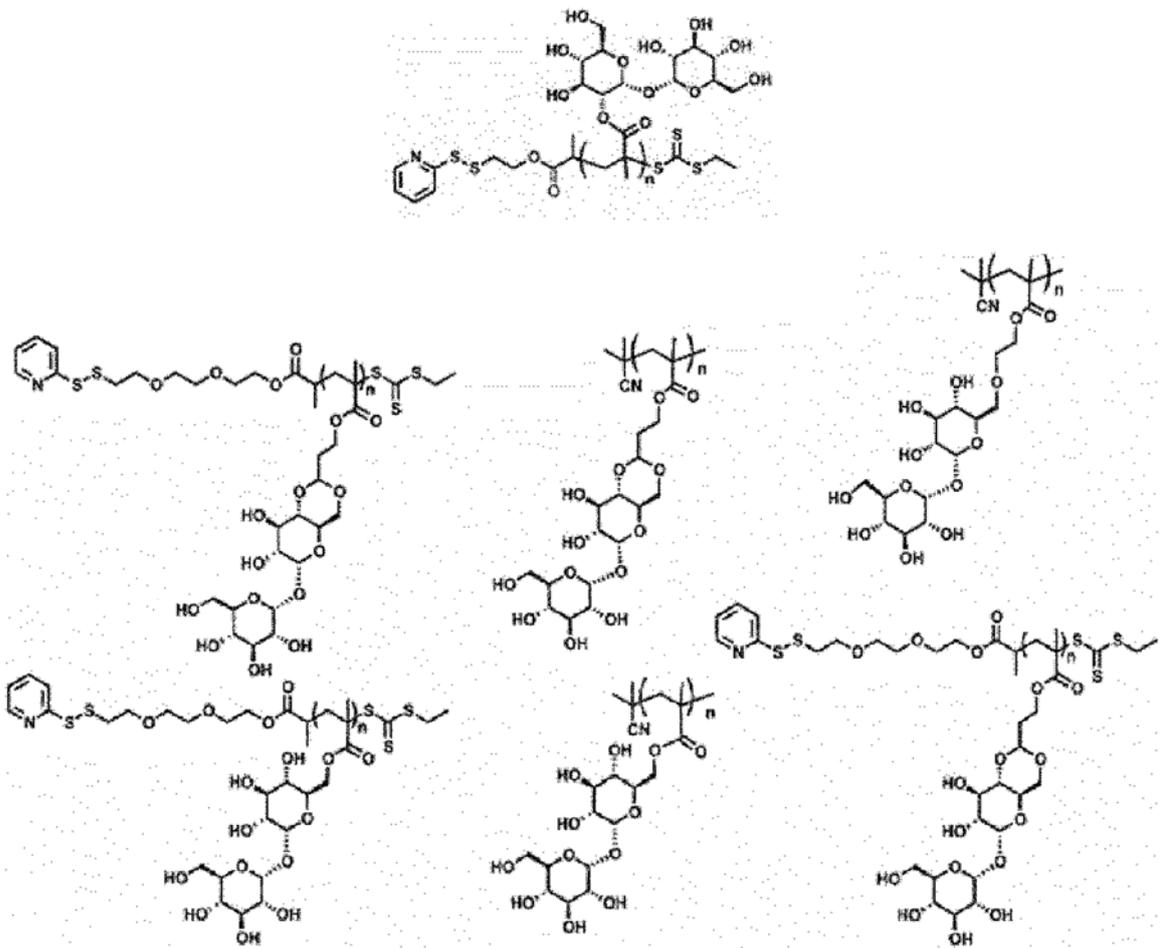


10 6. El homopolímero o copolímero de la reivindicación 3, en el que la -L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura:

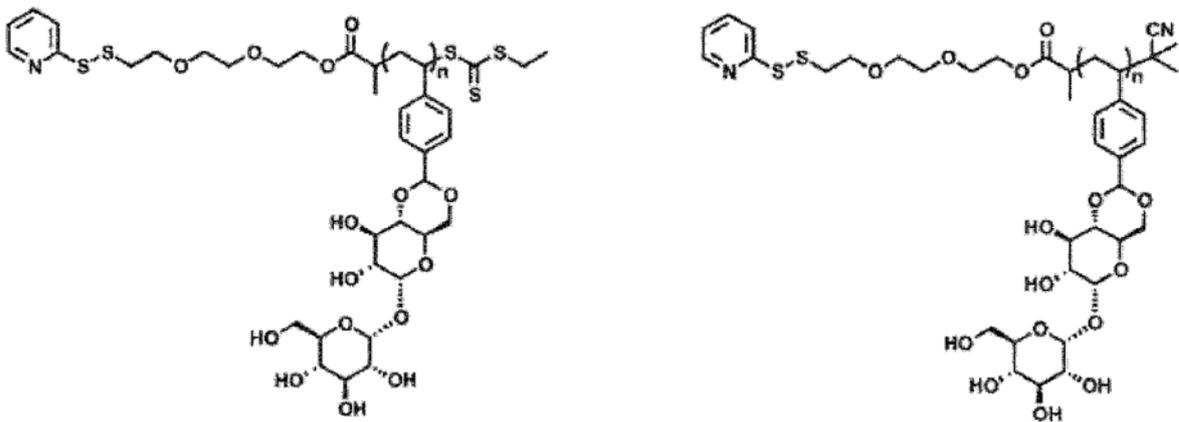


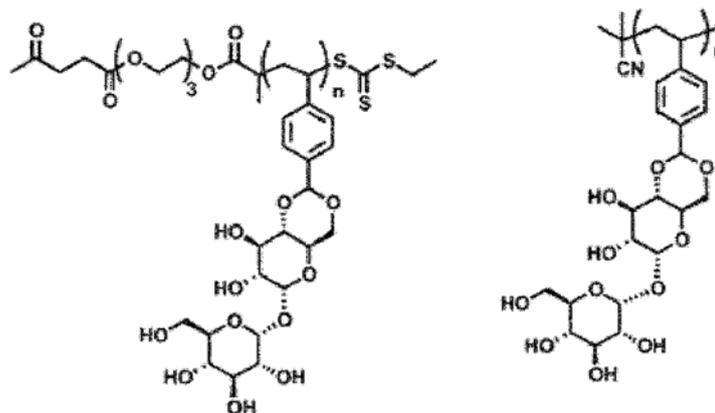
7. El homopolímero o copolímero de la reivindicación 4 o 5, que tiene la estructura:

15



5 8. El homopolímero o copolímero de la reivindicación 6, que tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:





9. Un método para sintetizar un homopolímero o copolímero para estabilizar una biomolécula, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) incorporar una cadena lateral que comprende una molécula de trehalosa en un monómero polimerizable; y  
 (b) polimerizar el monómero resultante para obtener un polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.

10 10. El método de la reivindicación 9, en el que el monómero polimerizable se selecciona del grupo que consiste en un monómero de acrilato y un monómero de metacrilato.

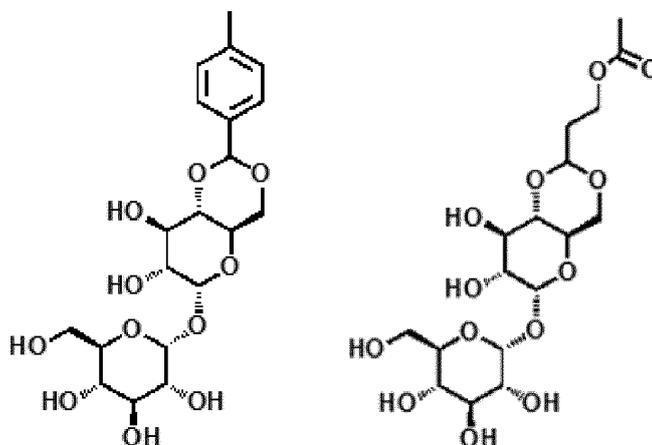
11. Un método para estabilizar una biomolécula que comprende la etapa de conjugar la biomolécula con un homopolímero o copolímero de un monómero de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 8.

12. El método de la reivindicación 11, en el que la biomolécula se selecciona del grupo que consiste en proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN, ARN, ARNsi, y composiciones farmacéuticas.

13. Una composición que comprende una biomolécula conjugada con un homopolímero o copolímero que comprende la estructura general:



25 en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidrógeno, R<sub>3</sub> es hidrógeno o metilo, y R<sub>4</sub> es una cadena lateral de la fórmula -L-trehalosa, en la que L es un enlazador que une la trehalosa a través de al menos uno de los grupos hidroxilo (-OH) de trehalosa, en la que L es -(COO)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- (n=0-6),  
 o en la que la -L-trehalosa de cadena lateral tiene una estructura seleccionada de:



30 y en la que el homopolímero o copolímero comprende además un agente de transferencia de cadena reactivo de biomolécula unido a uno o ambos extremos del esqueleto del homopolímero o copolímero.

14. La composición de la reivindicación 13, en el que la biomolécula se selecciona del grupo que consiste en proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN, ARN, ARNsi, y composiciones farmacéuticas.

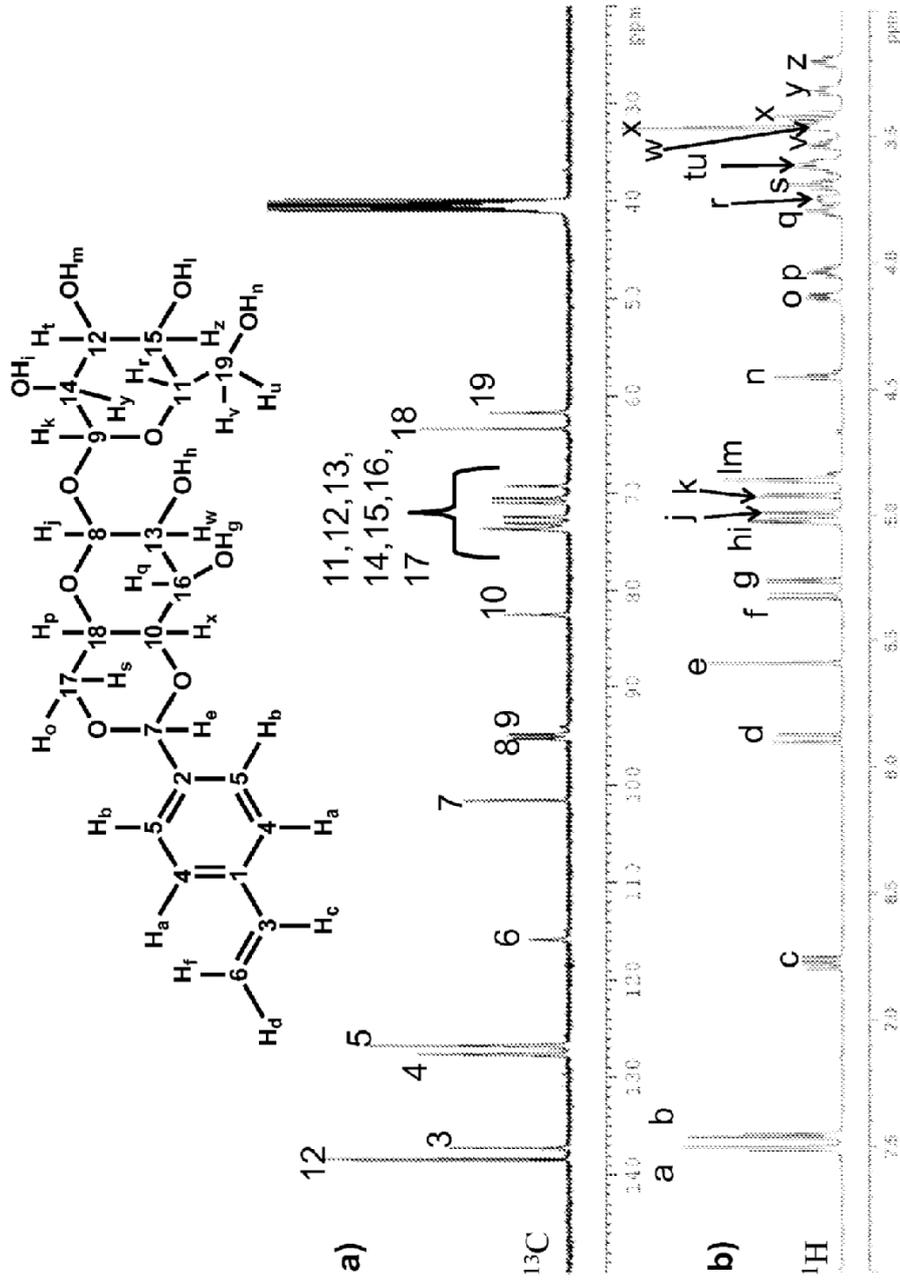


FIGURA 1 - a-b

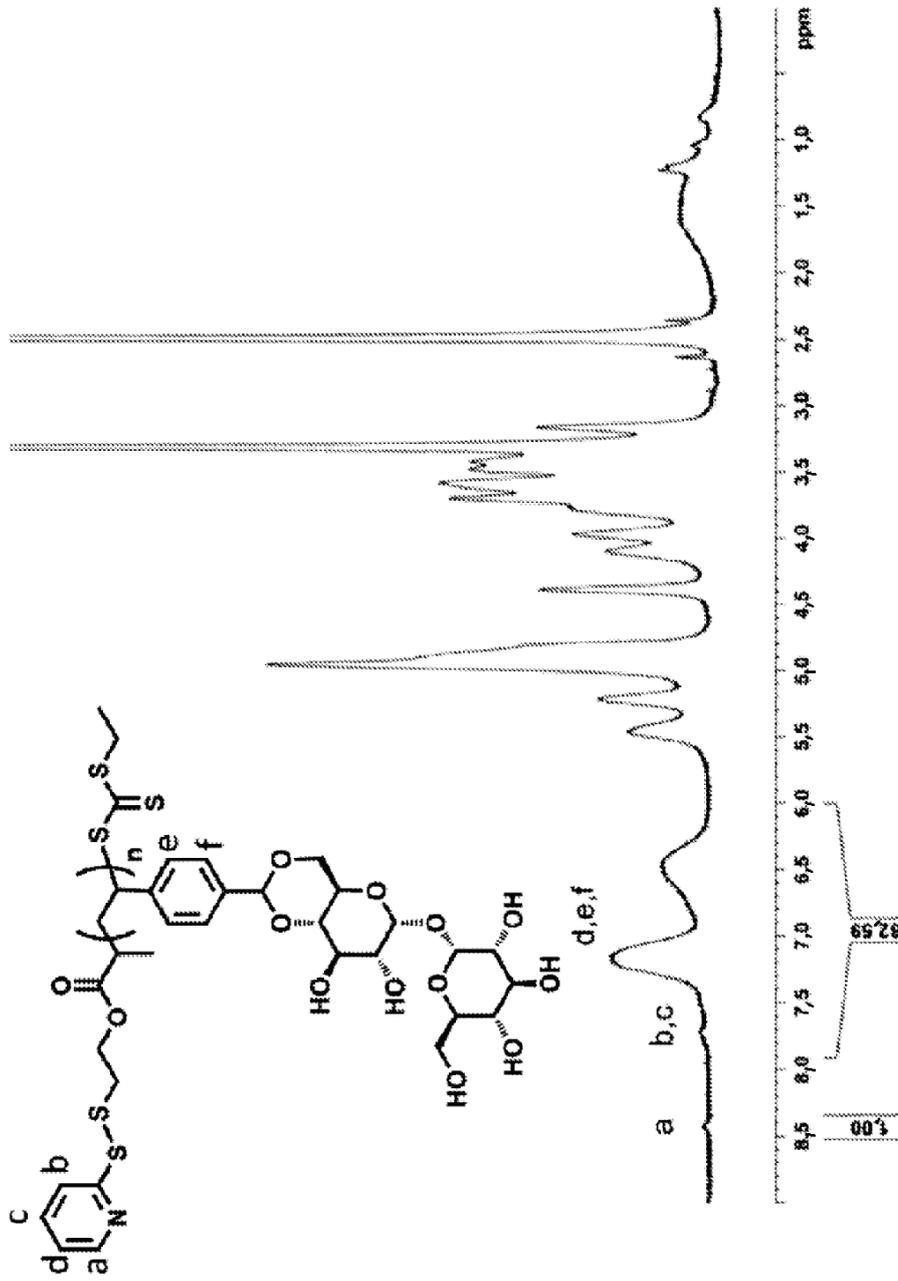


FIGURA 2

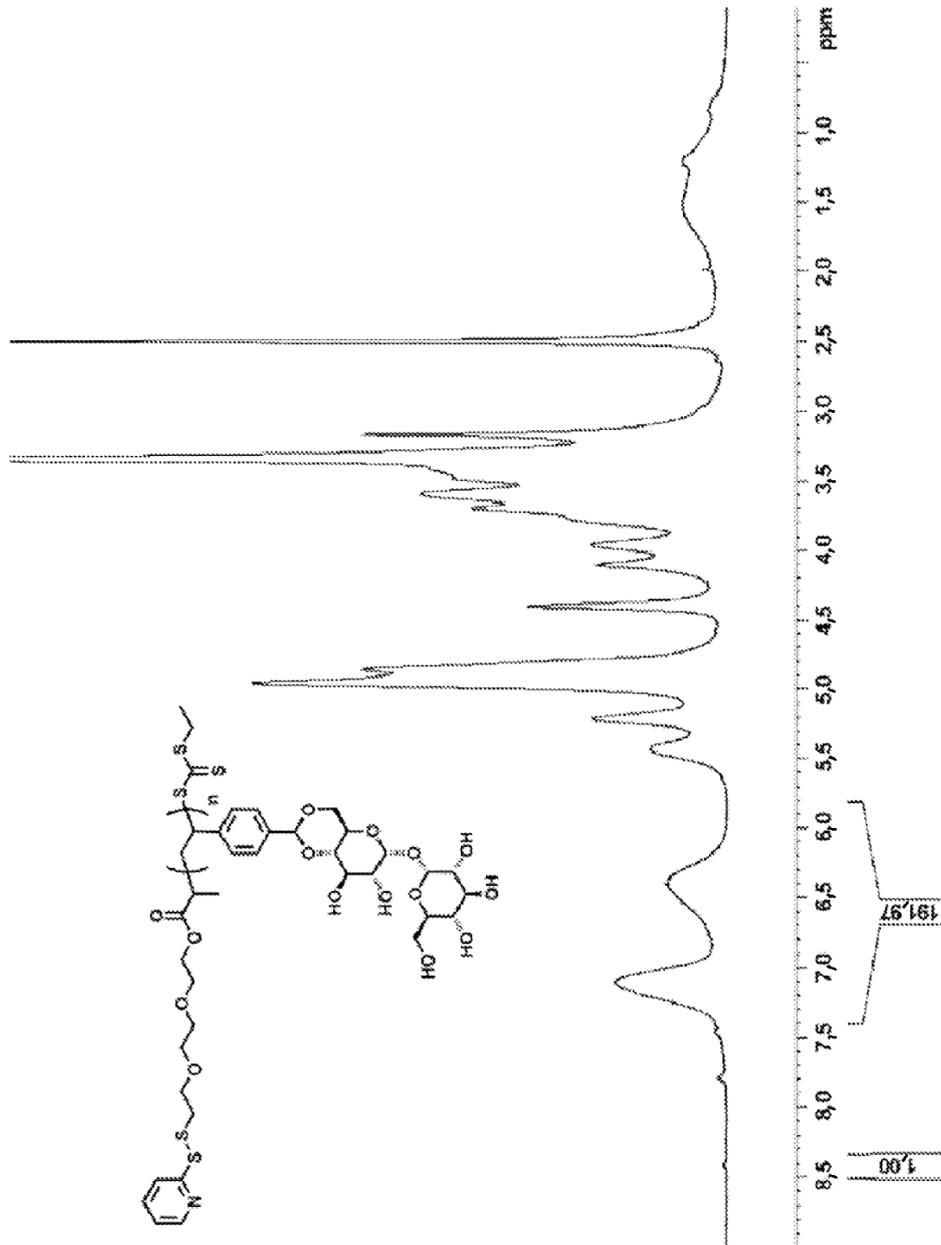


FIGURA 3

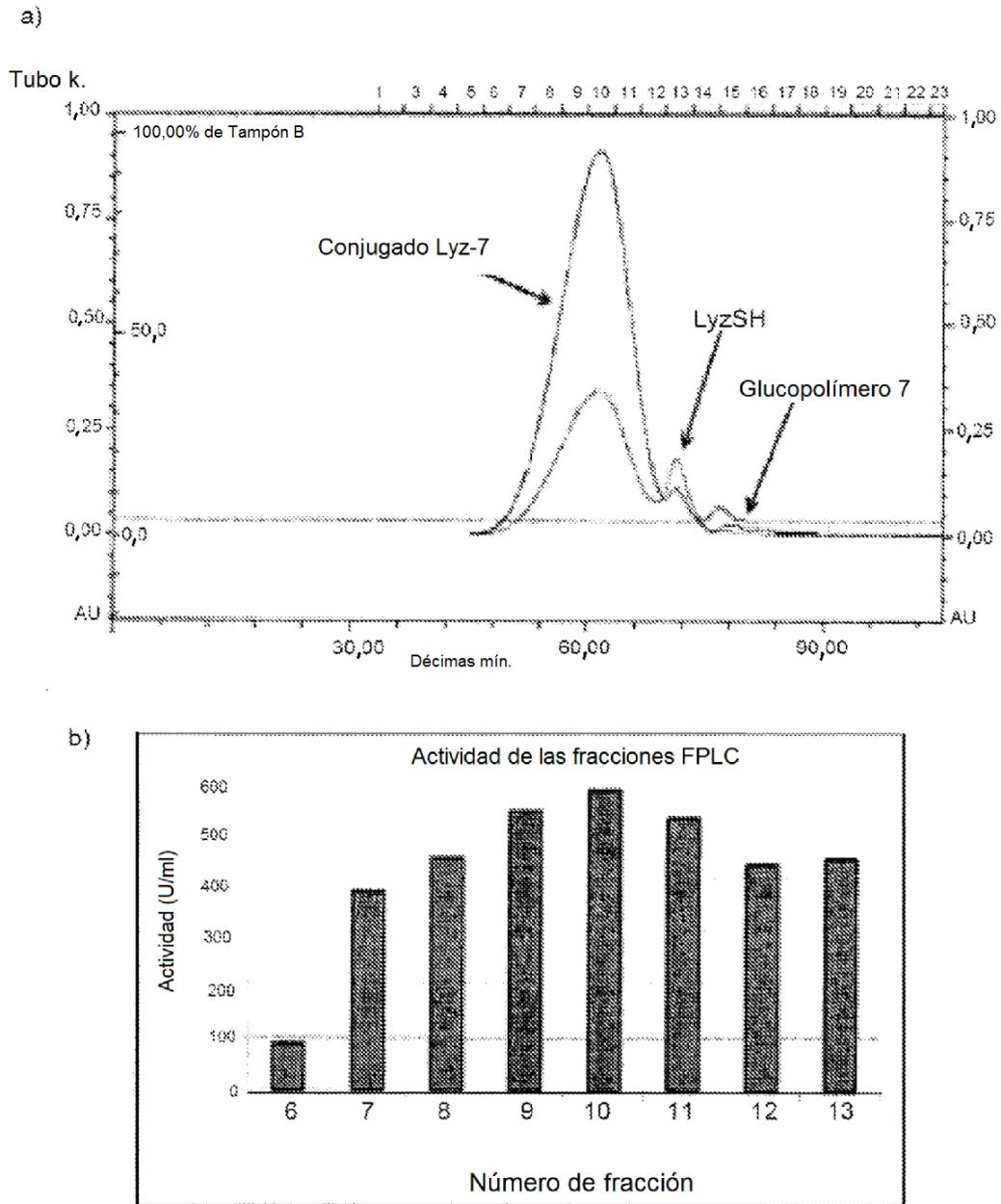


FIGURA 4 a-b

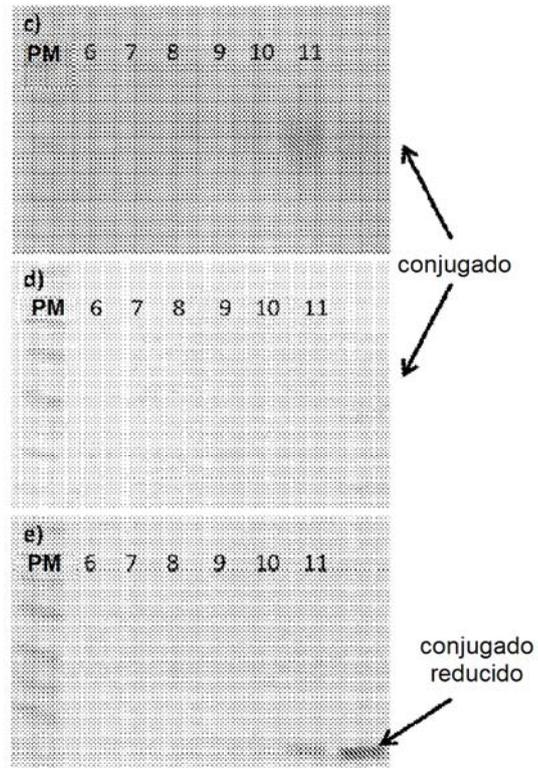


FIGURA 4 c-e

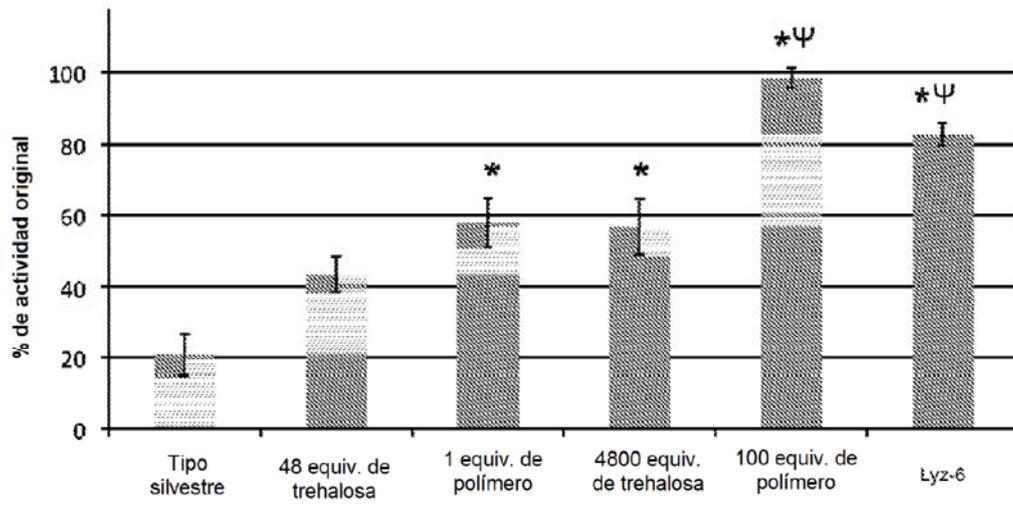


FIGURA 5

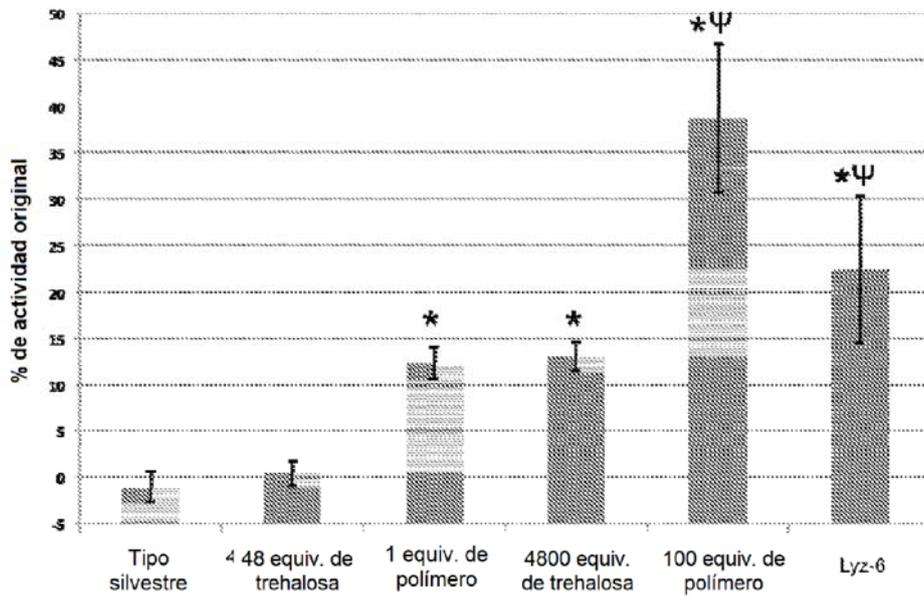
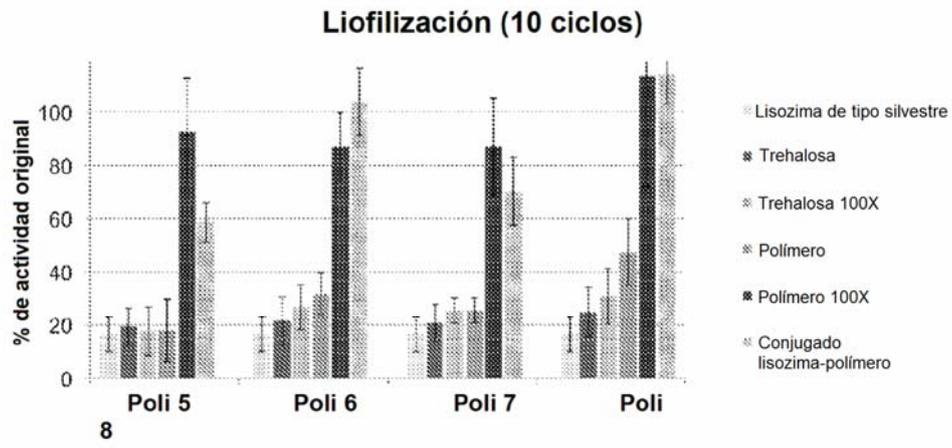
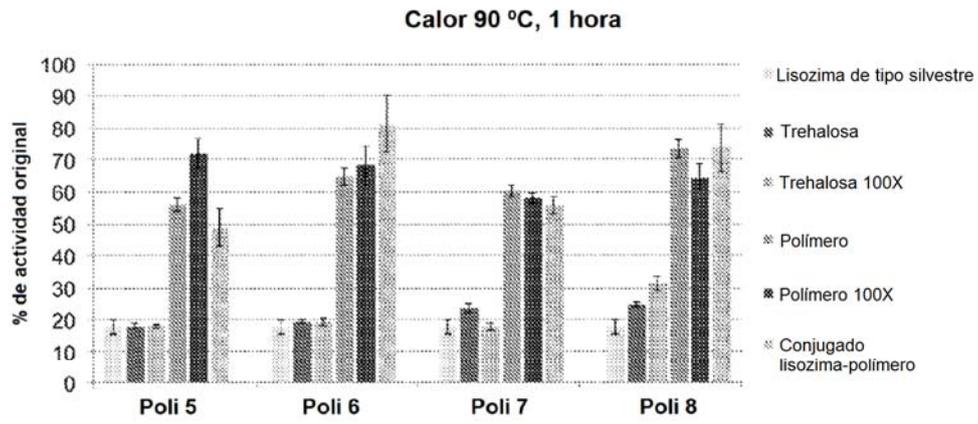


FIGURA 6



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**



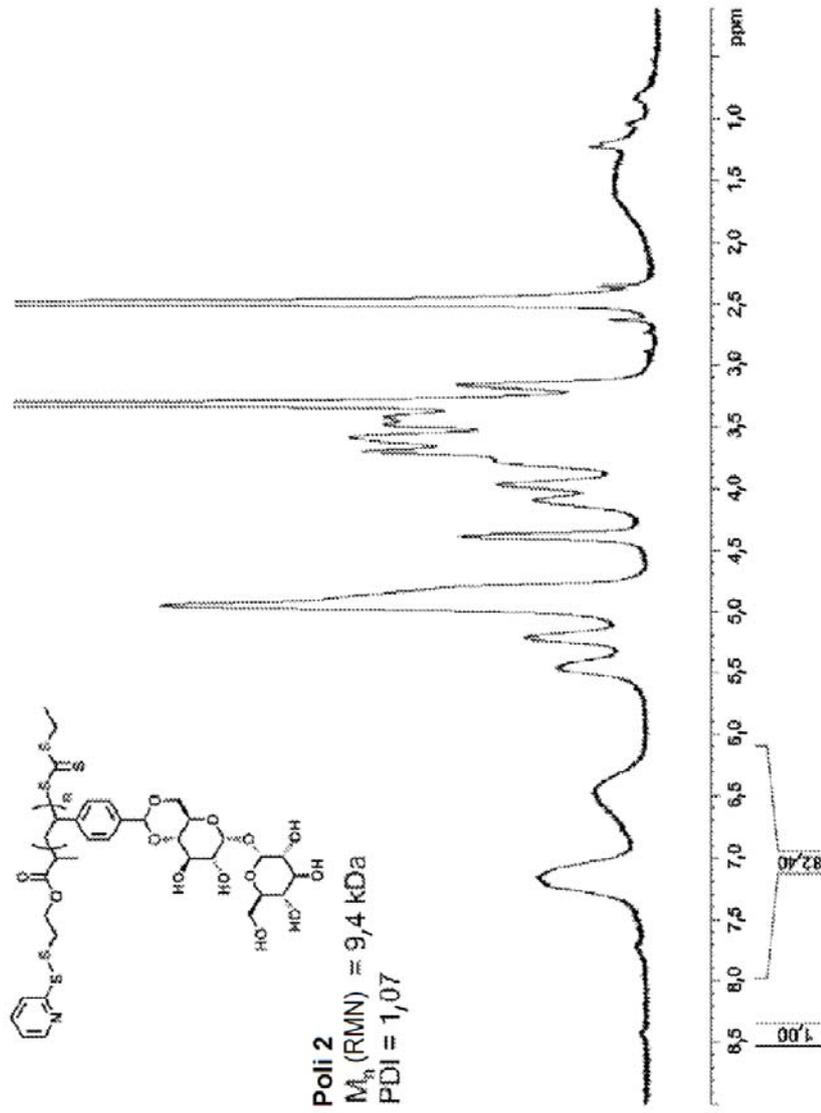


FIGURA 9 (continuación)

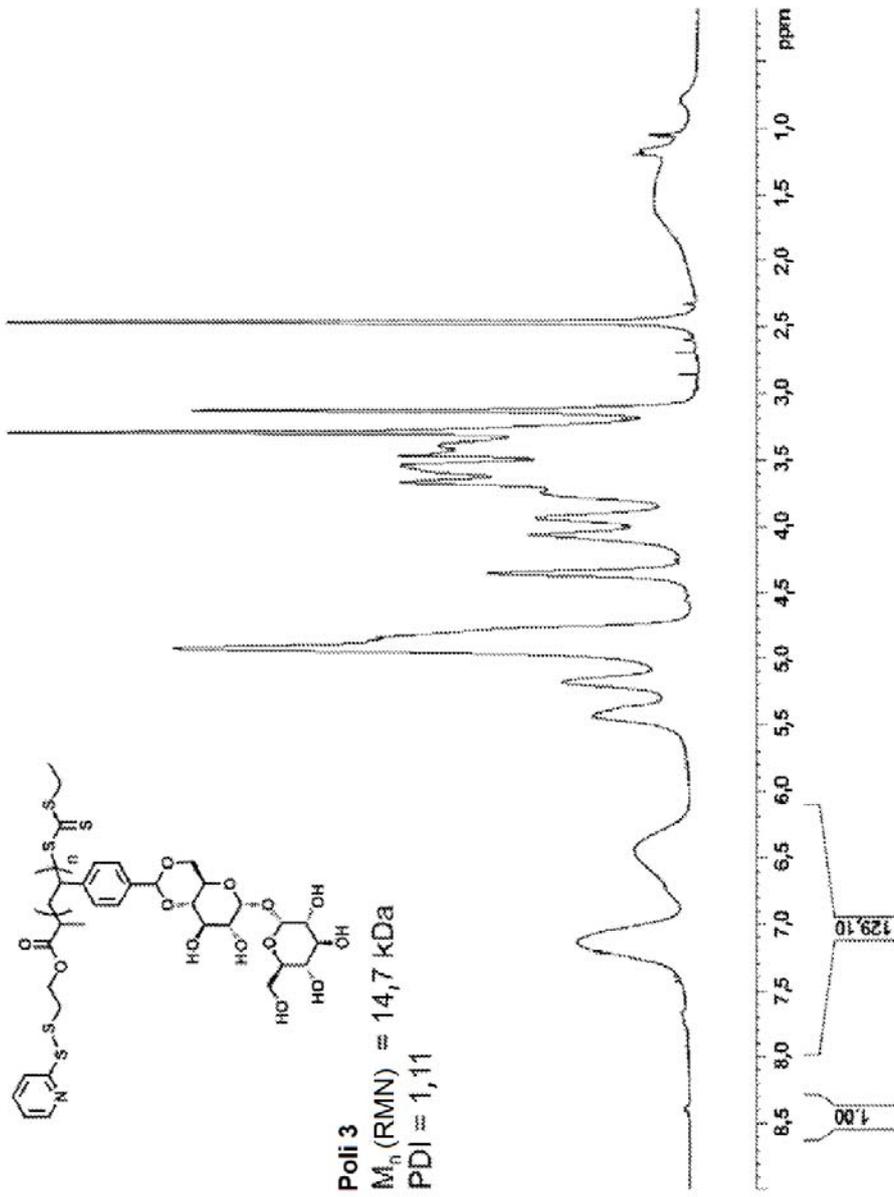


FIGURA 9 (continuación)

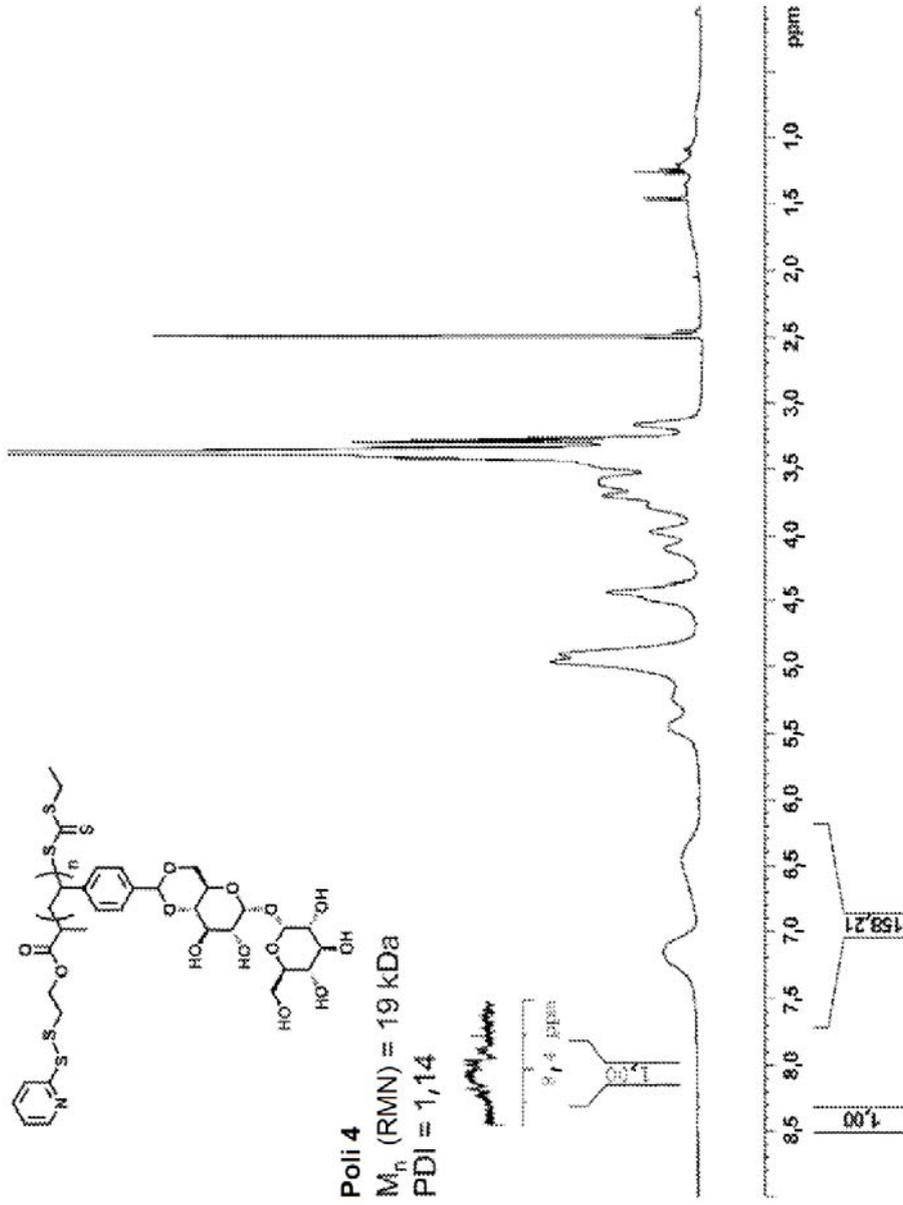


FIGURA 9 (continuación)

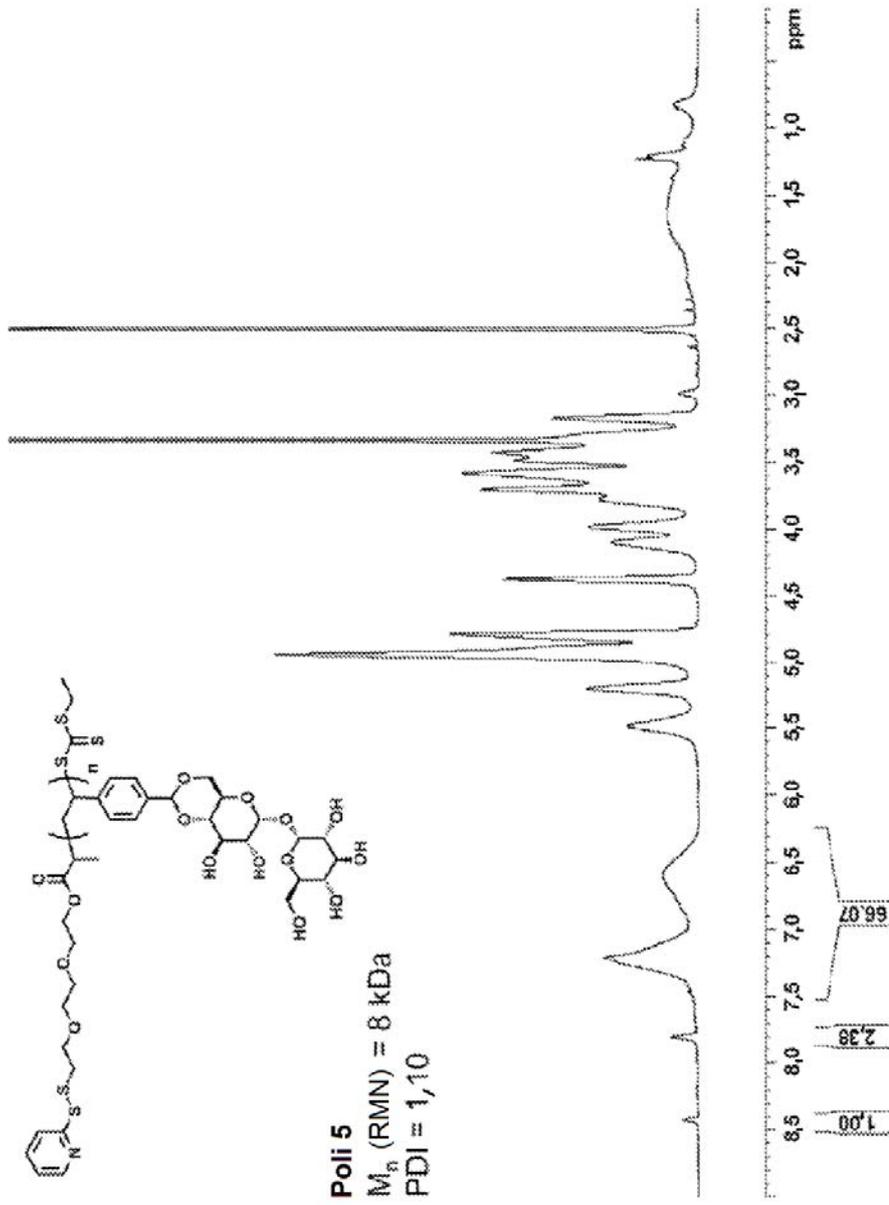


FIGURA 10

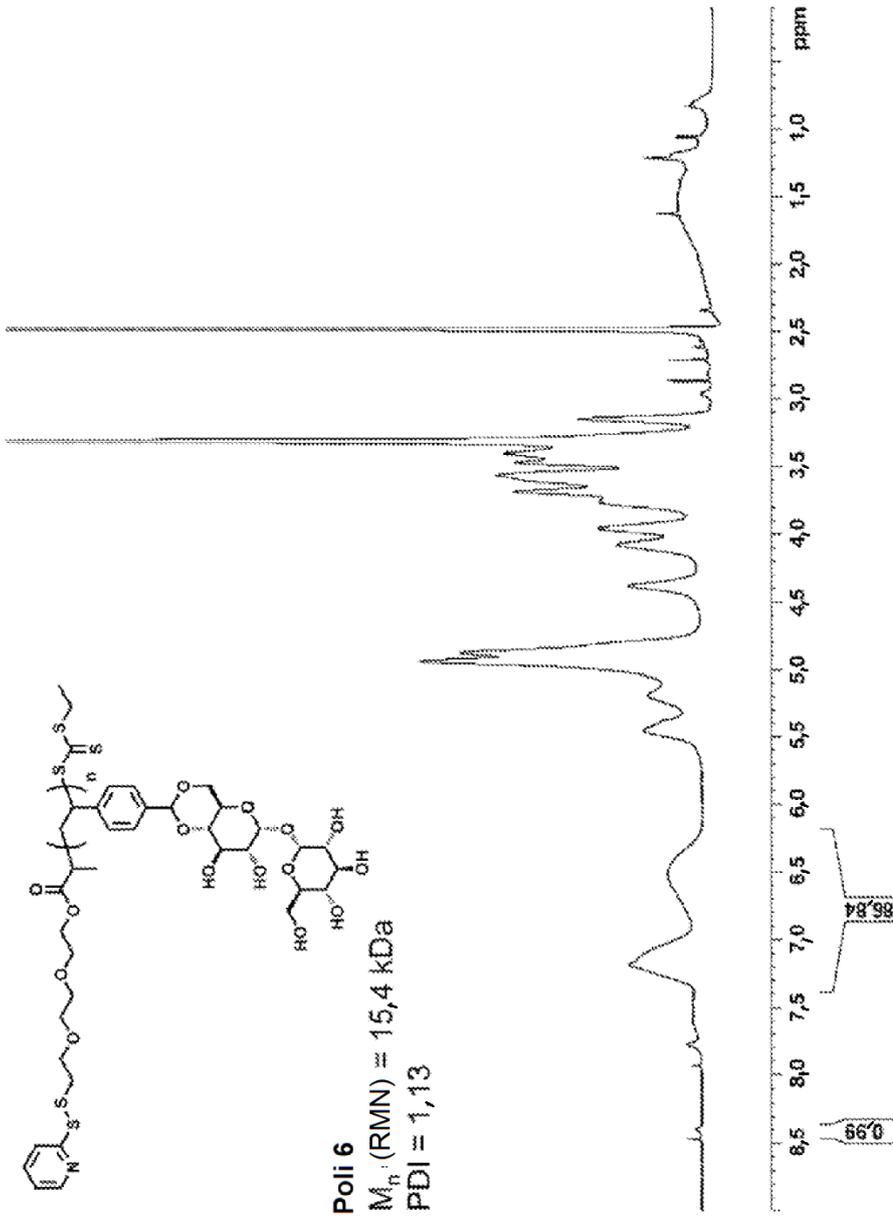


FIGURA 10 (continuación)

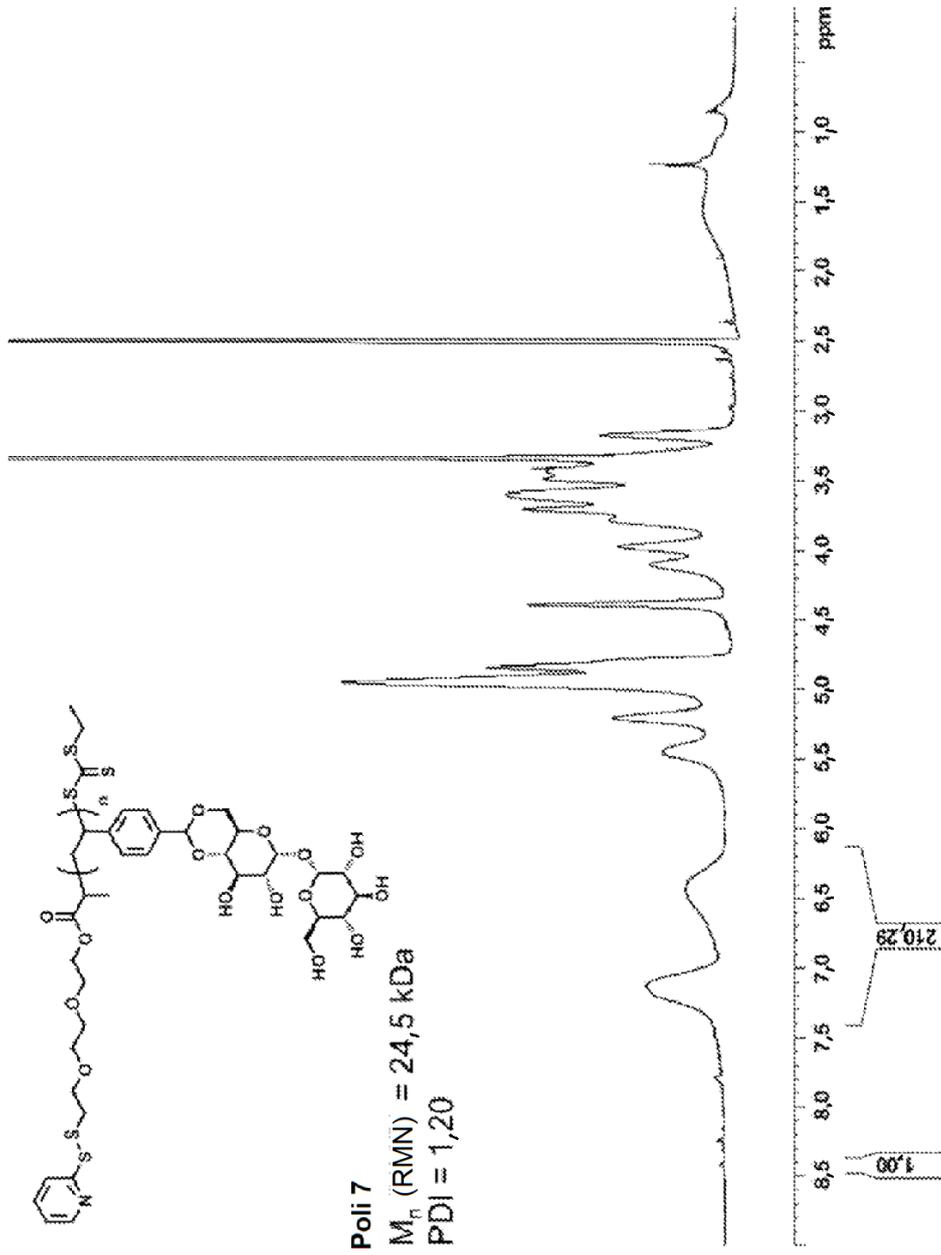


FIGURA 10 (continuación)

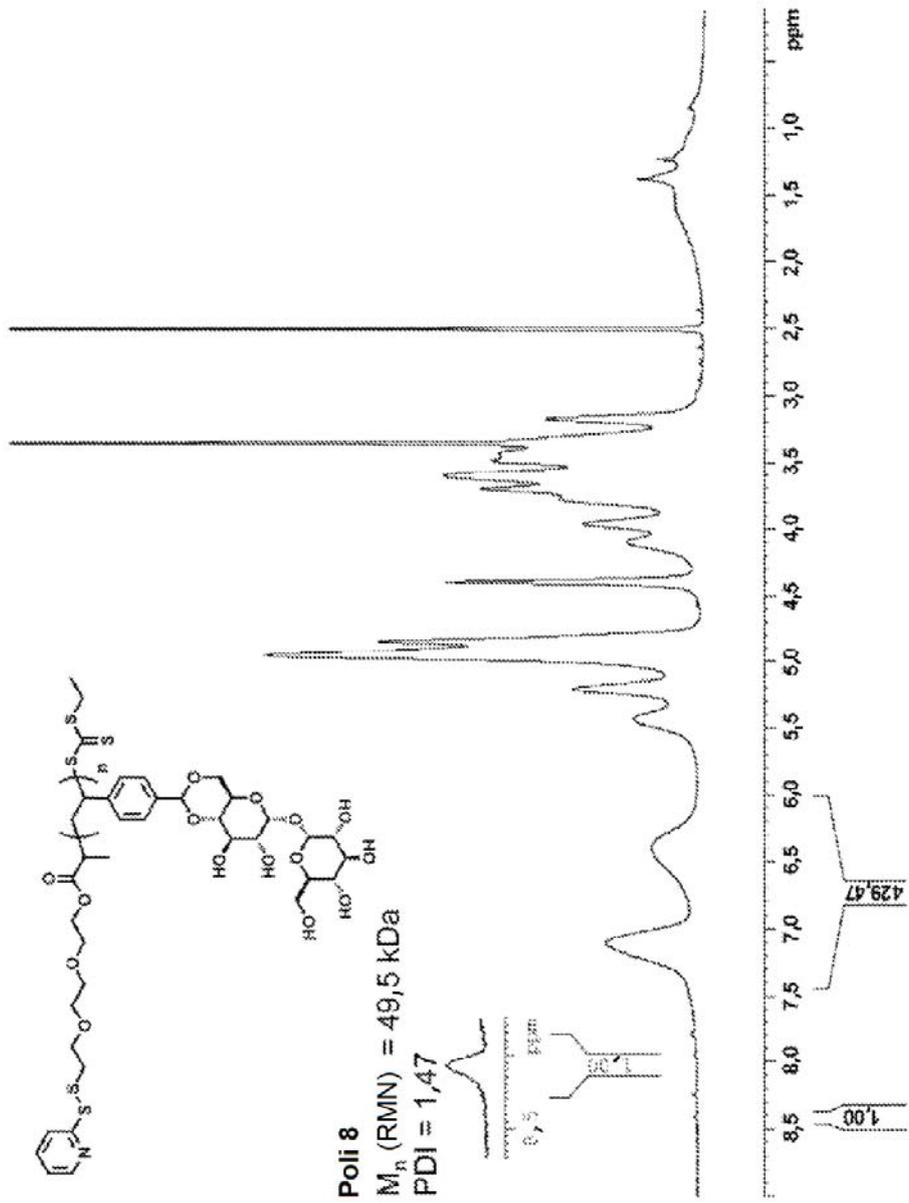


FIGURA 10 (continuación)

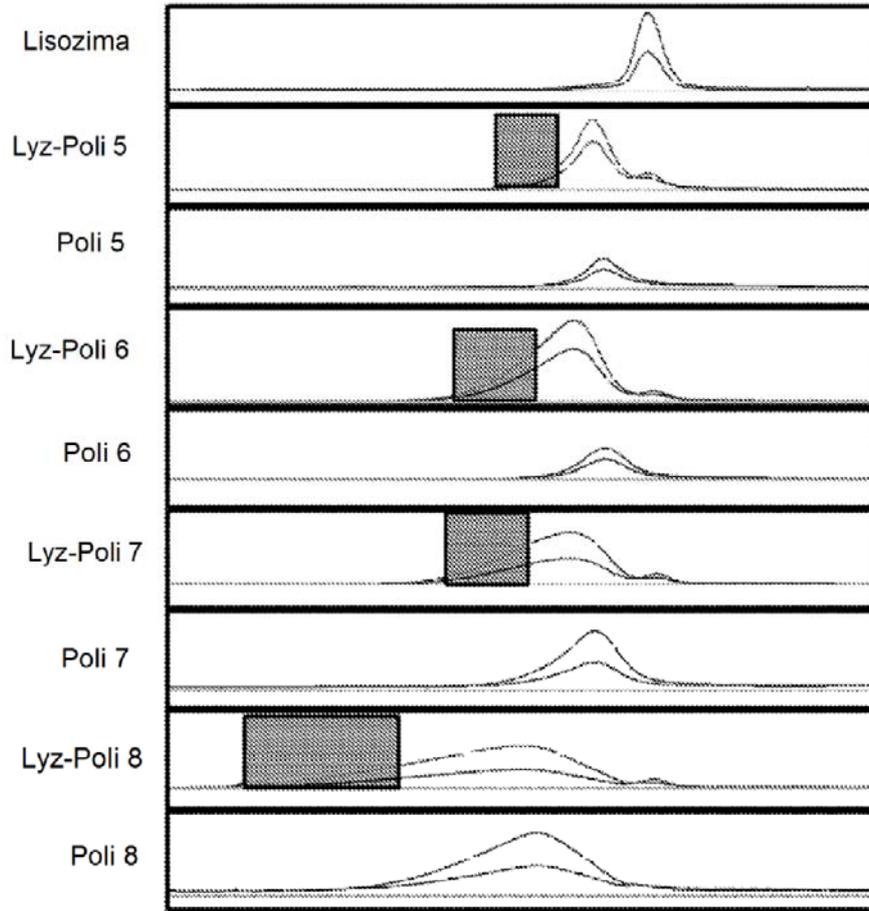
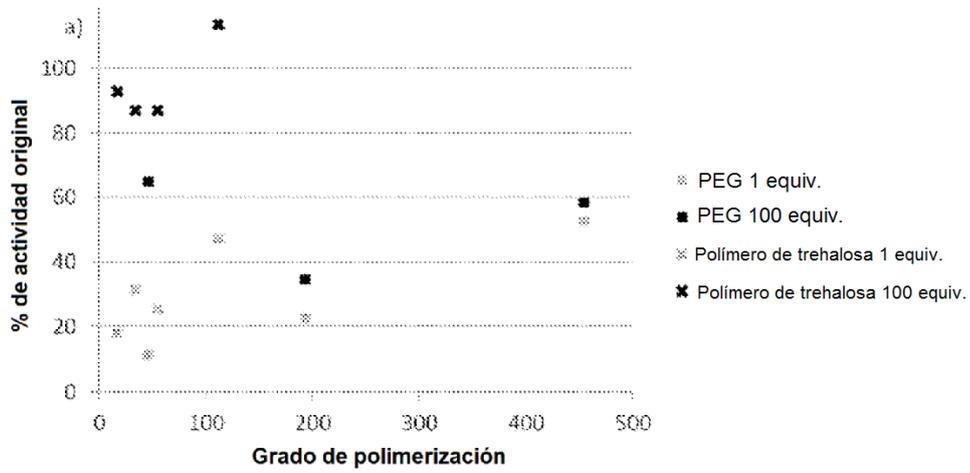
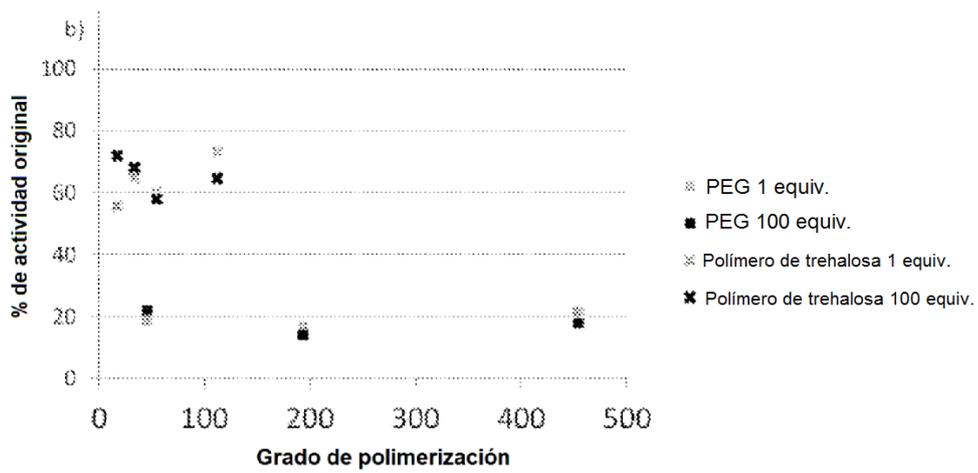


FIGURA 11

**Liofilización (10 ciclos)**

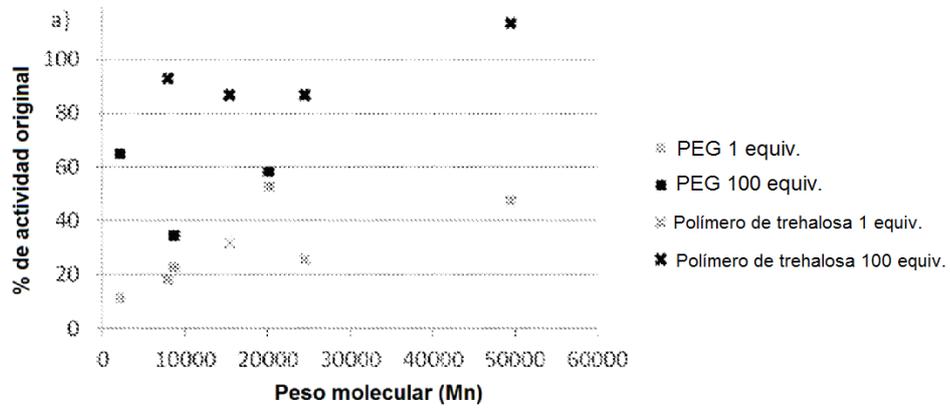


**Calor 90 °C, 1 hora**

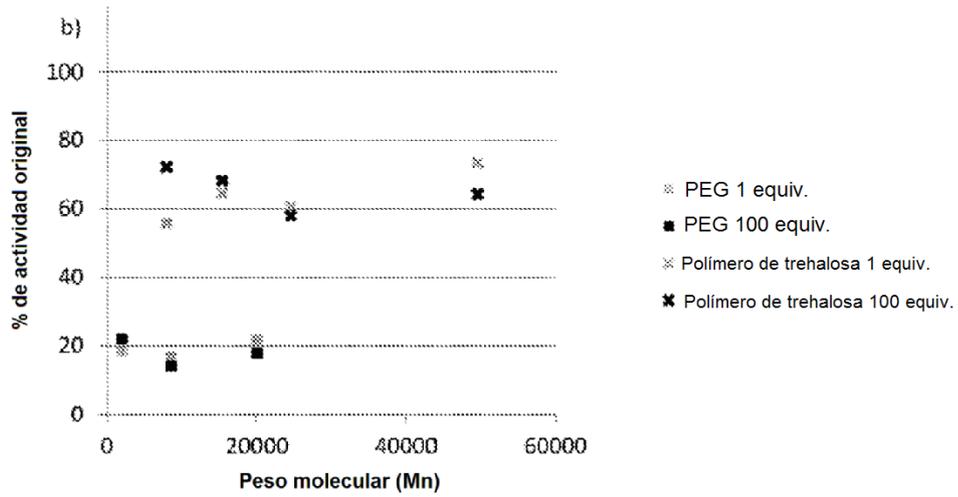


**FIGURA 12 a-b**

**Liofilización (10 ciclos)**



**Calor 90 °C, 1 hora**



**FIGURE 13 a-b**

FIGURA 14

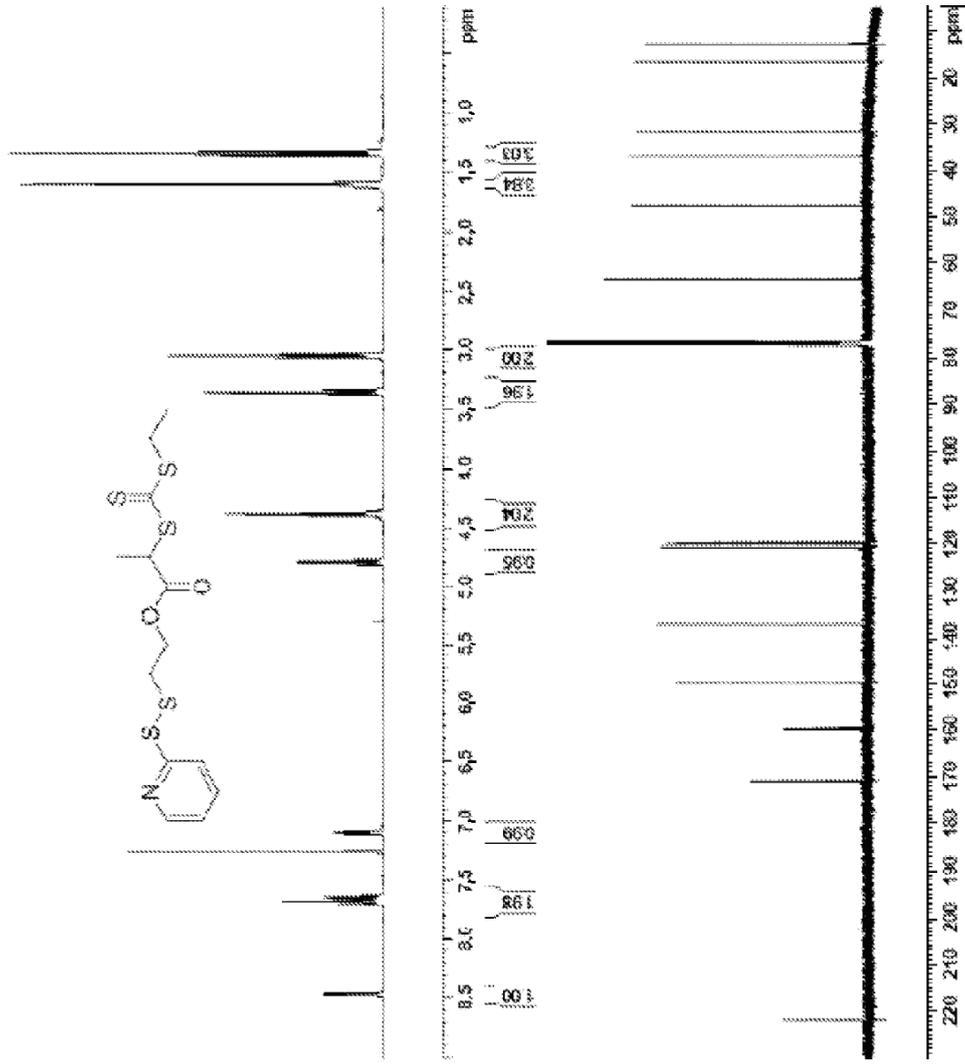




FIGURA 16

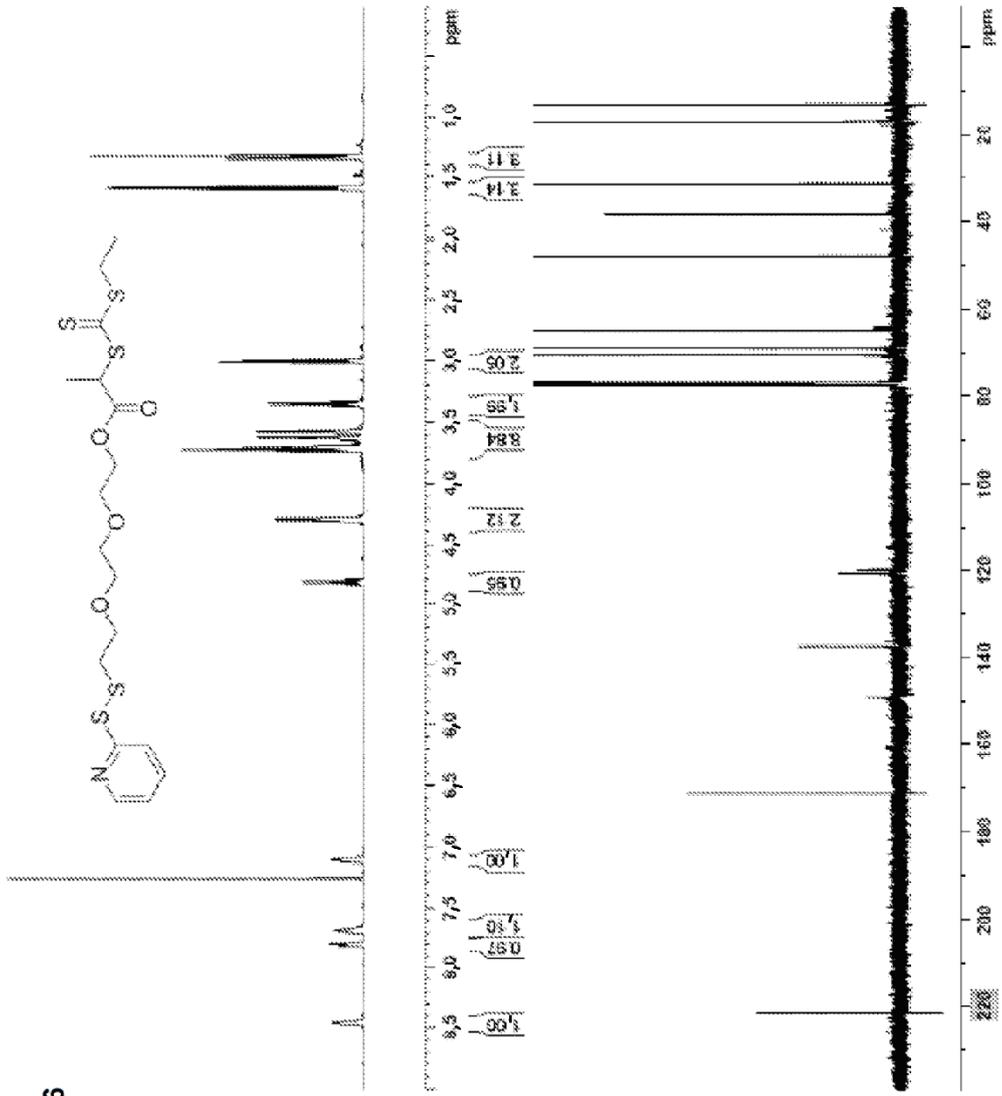
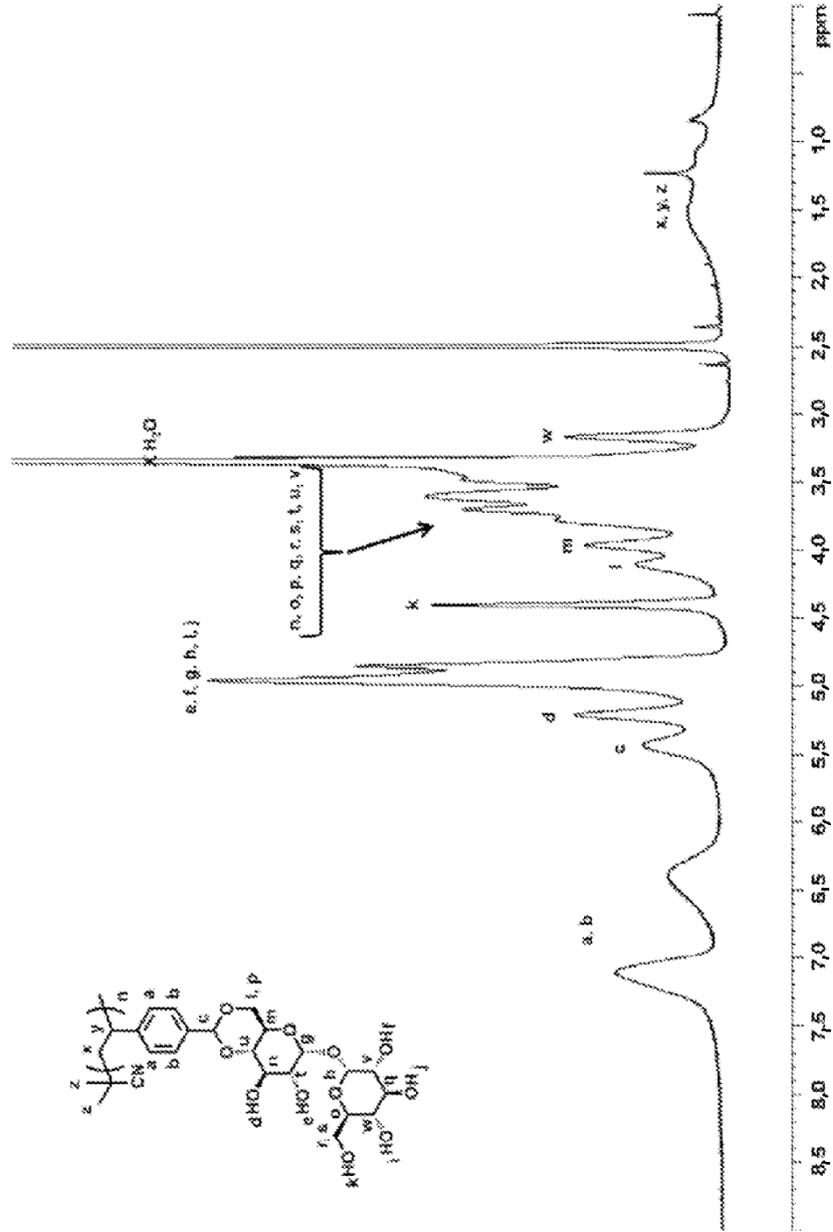


FIGURA 17



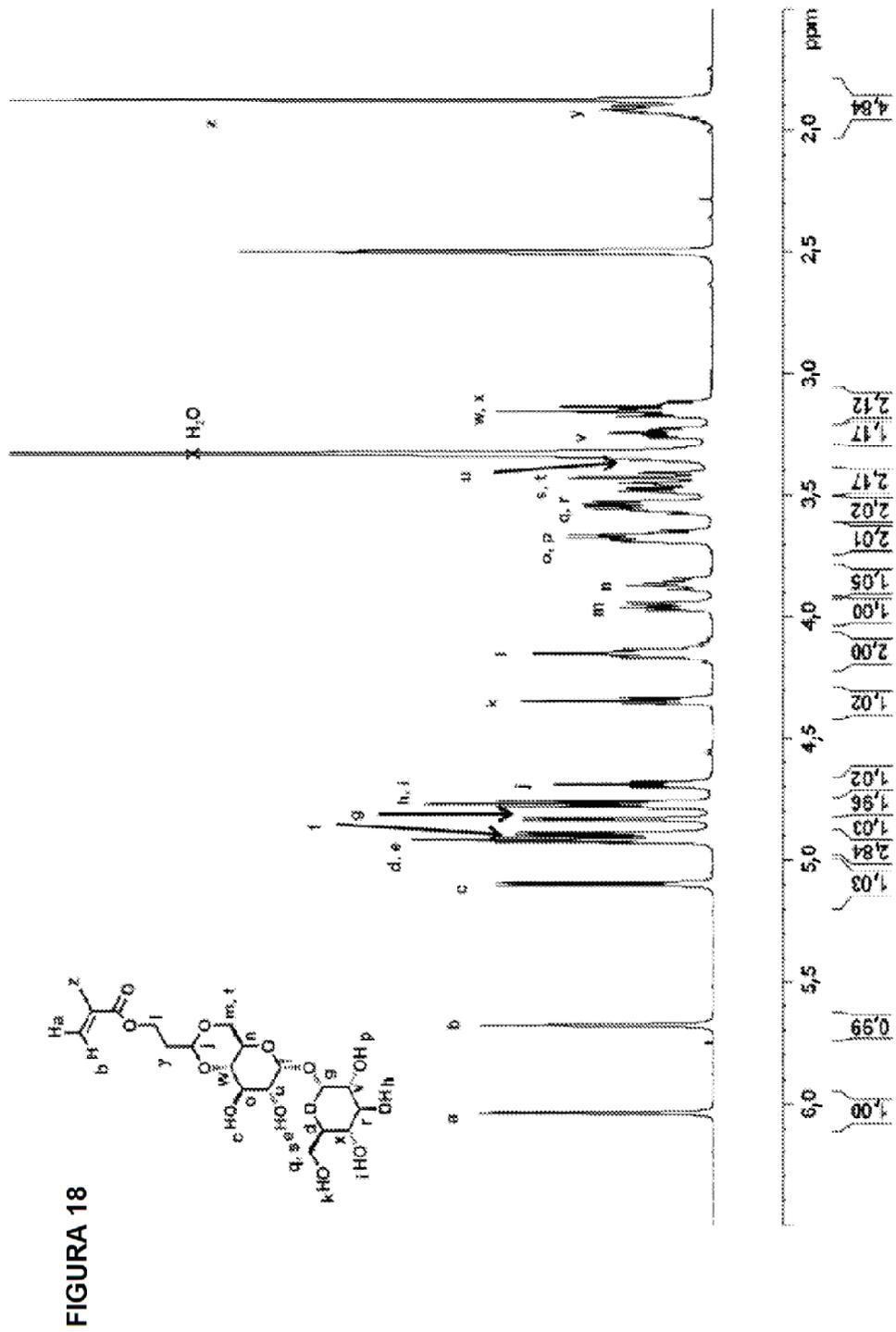
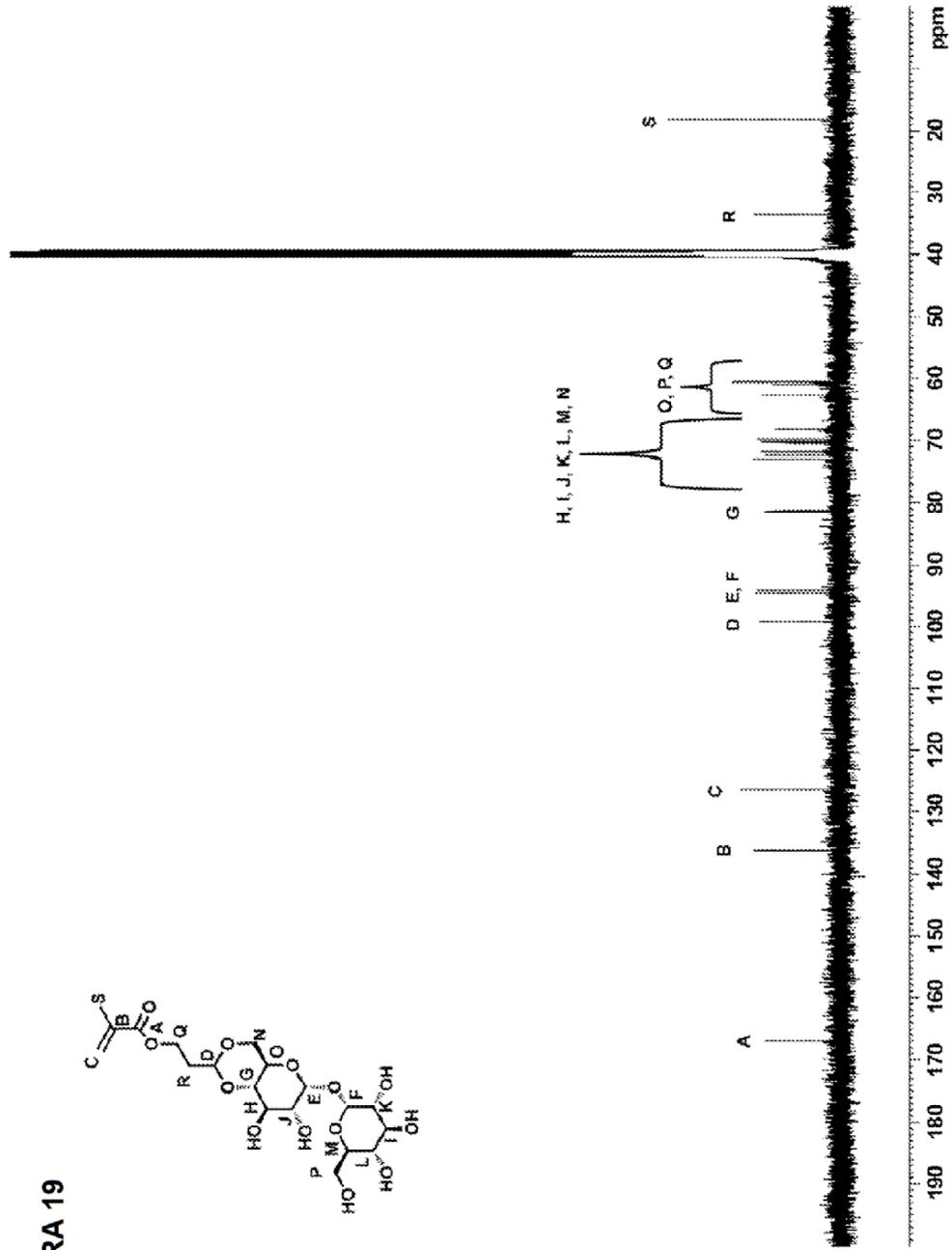
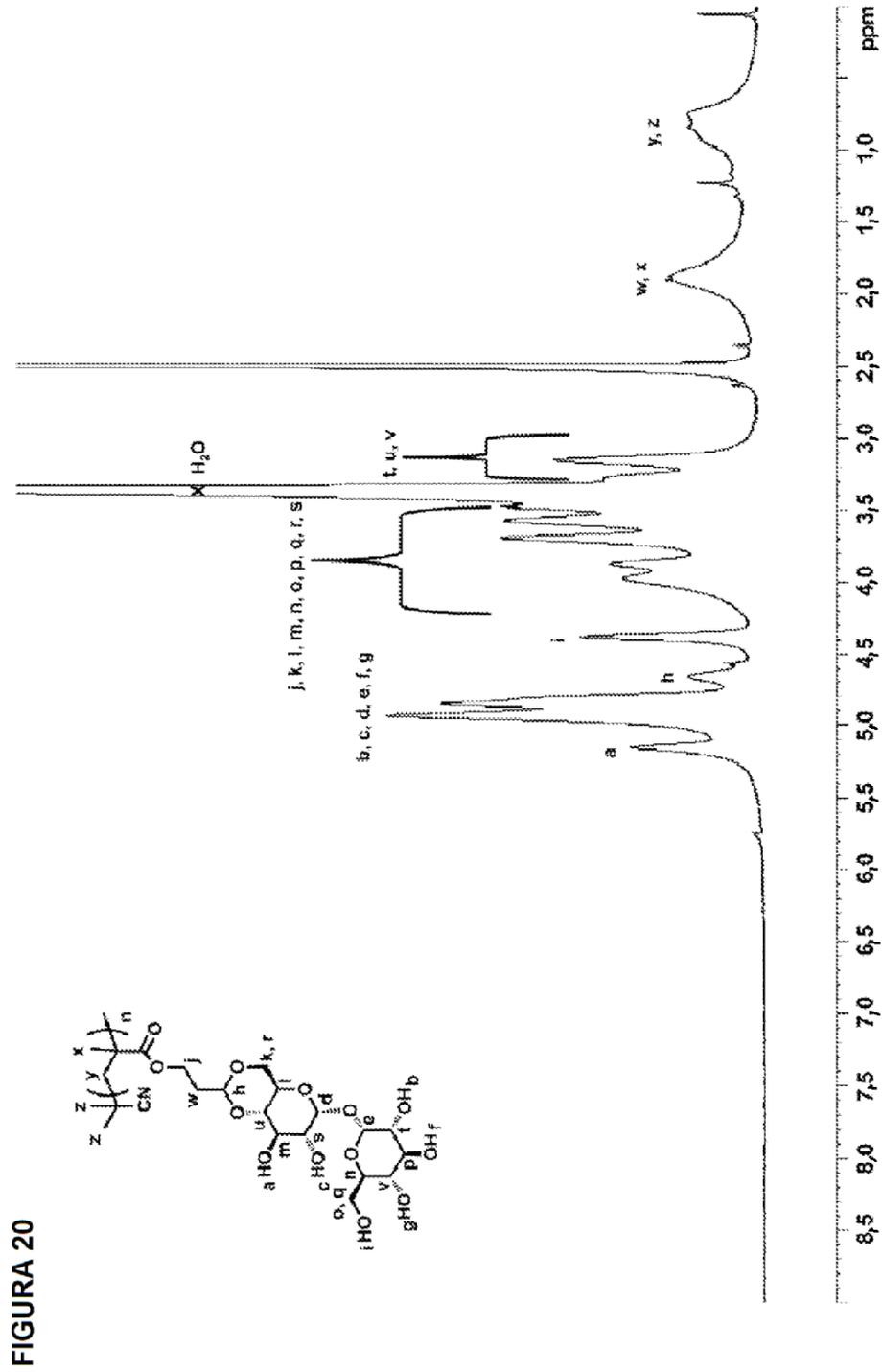


FIGURA 19





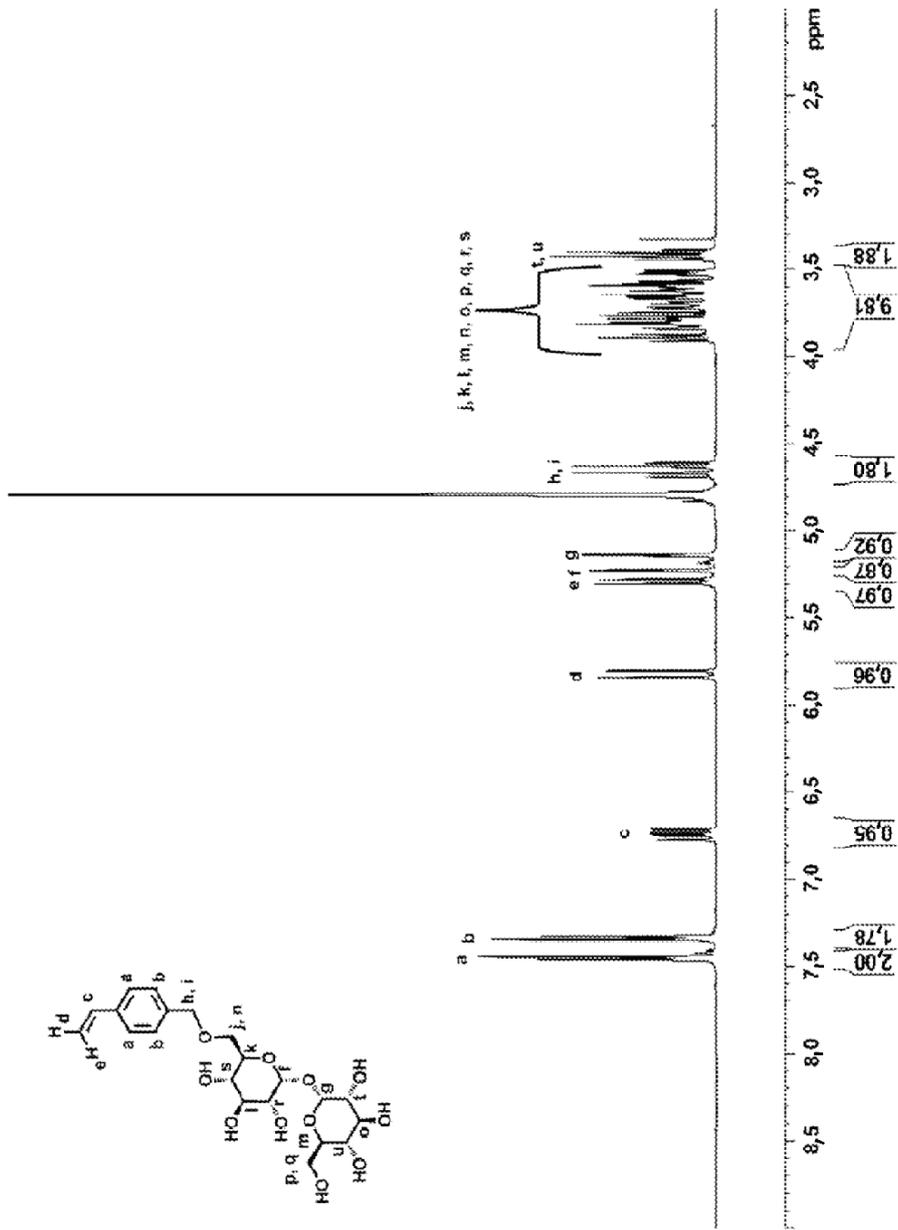


FIGURA 21

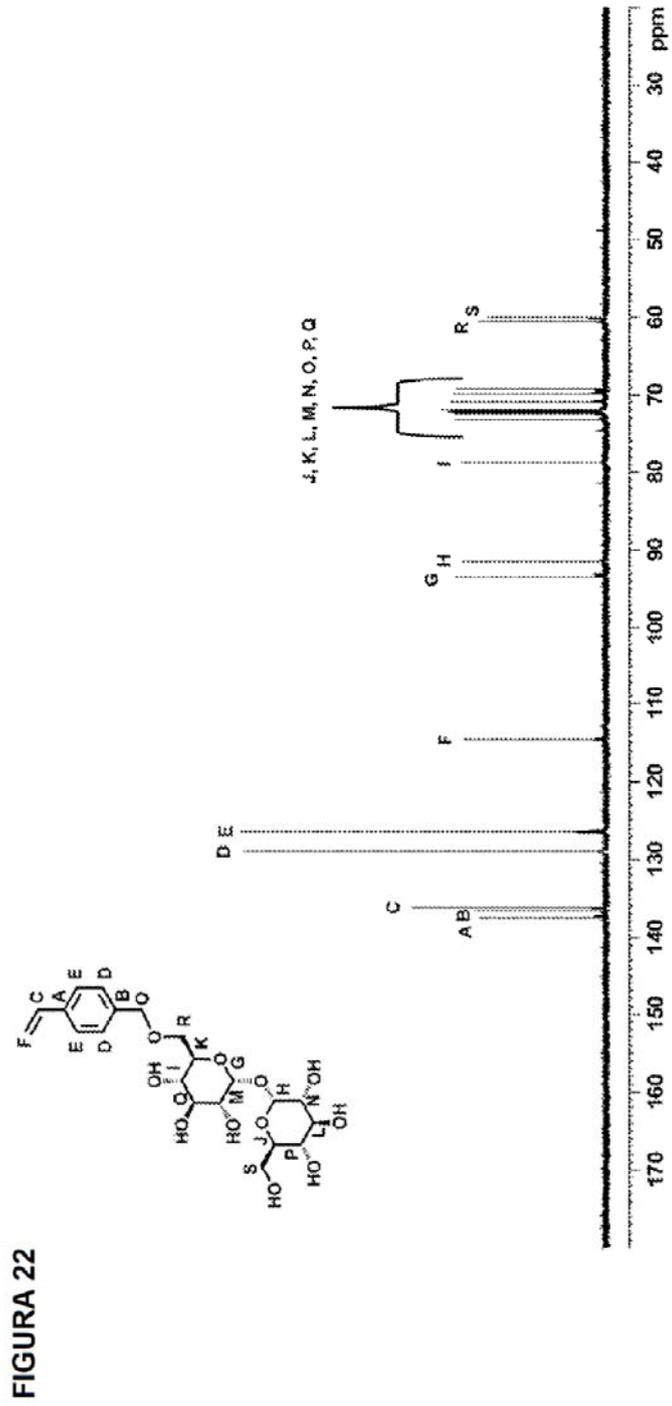
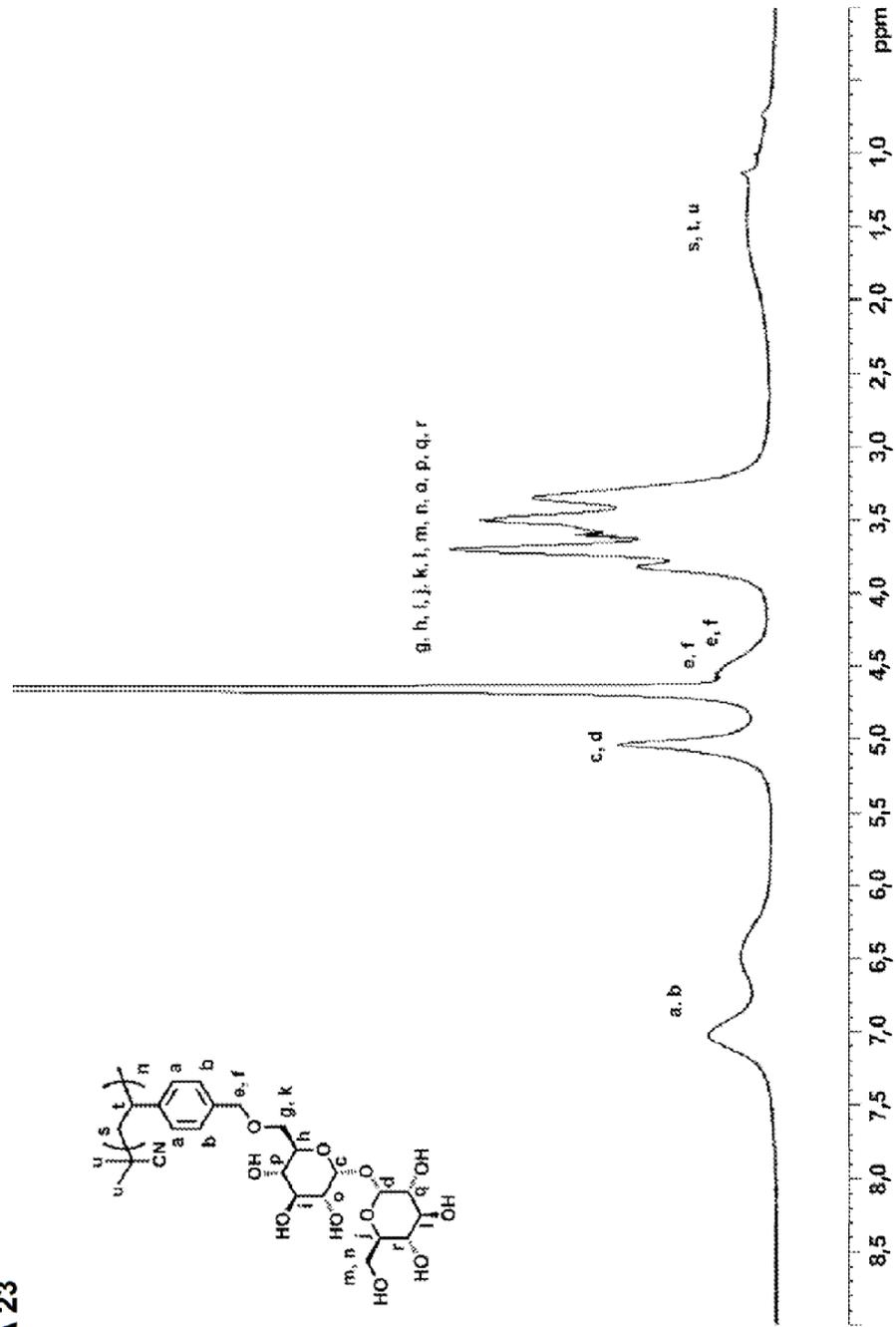


FIGURA 23





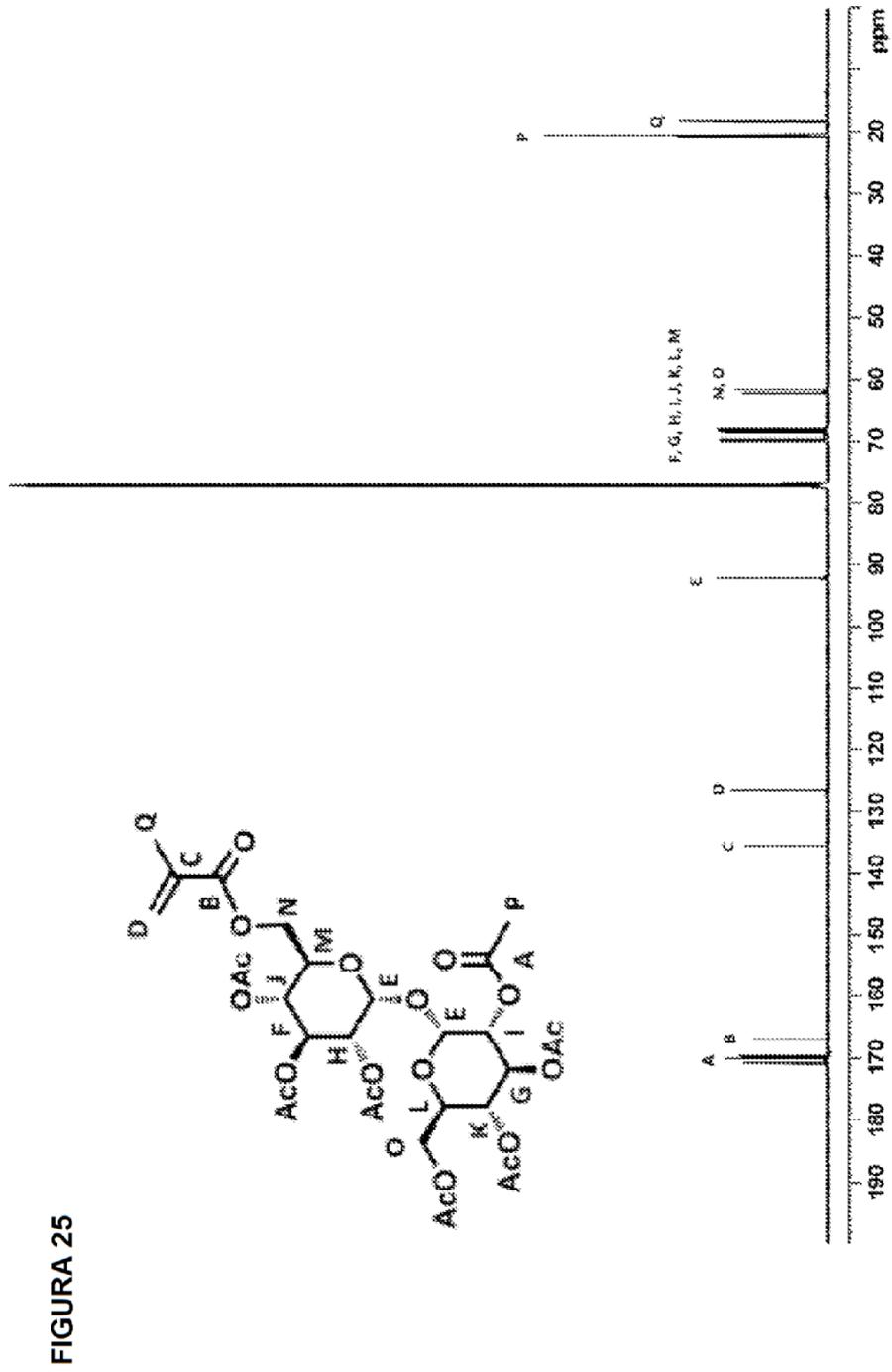


FIGURA 26

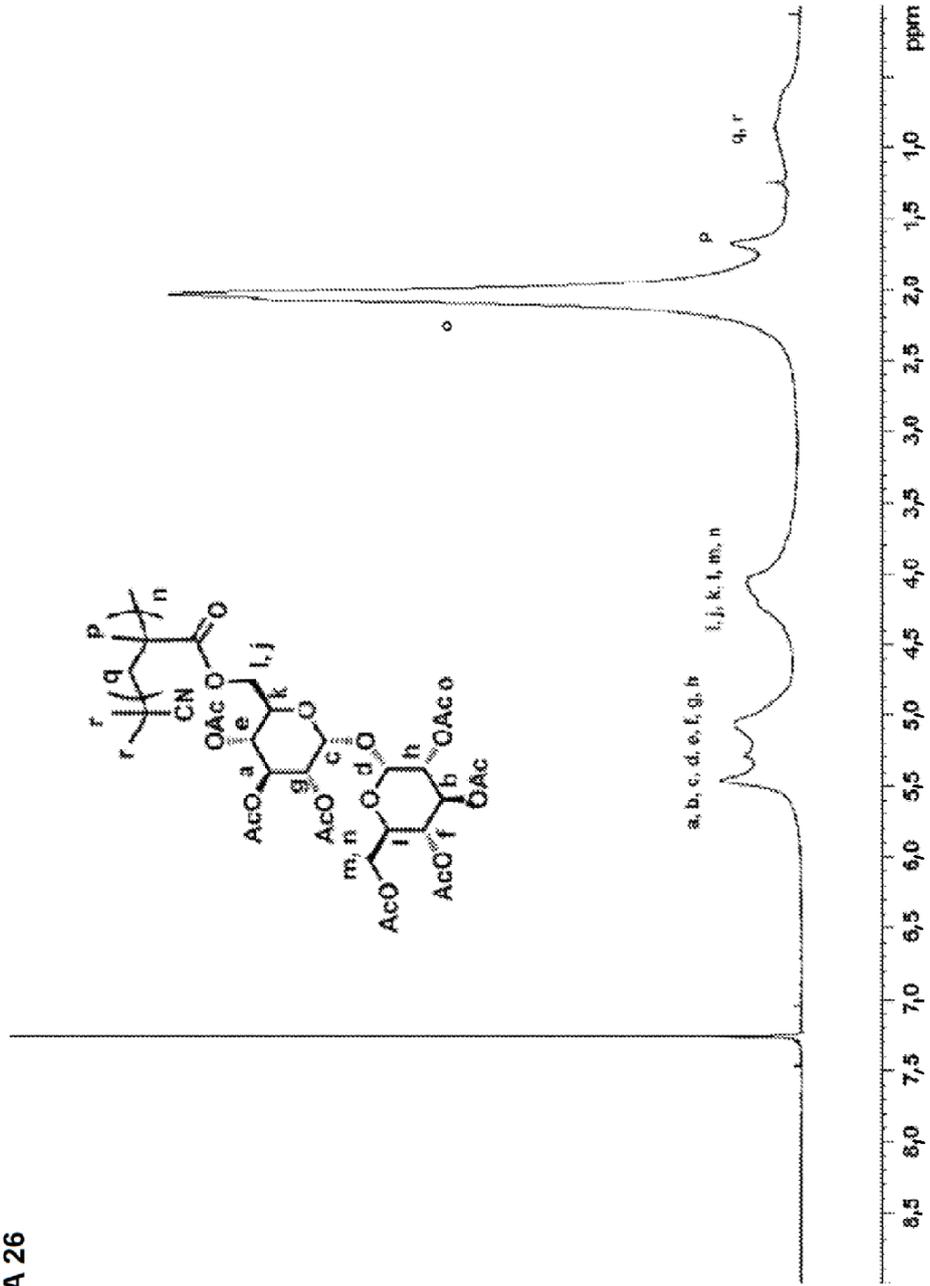
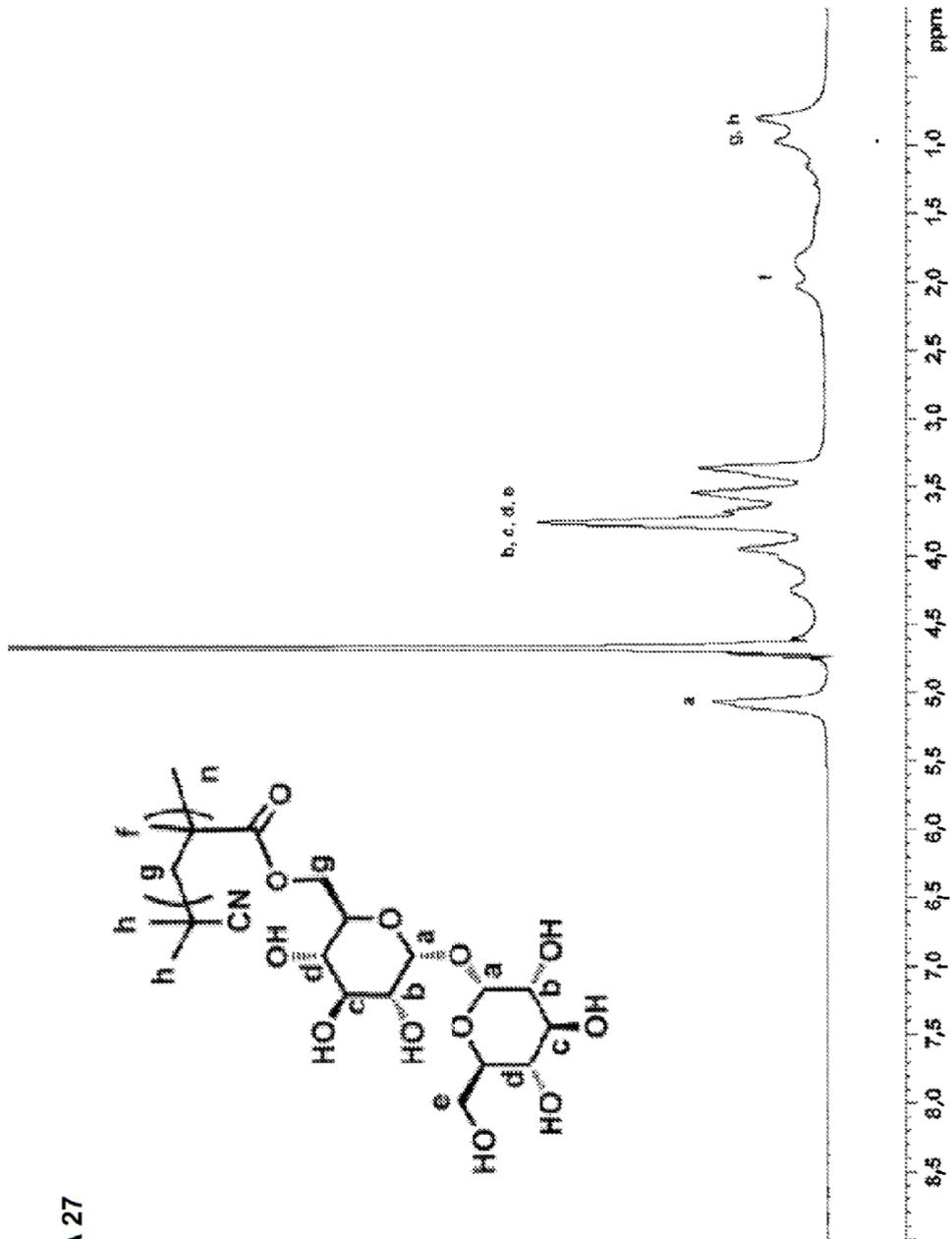


FIGURA 27



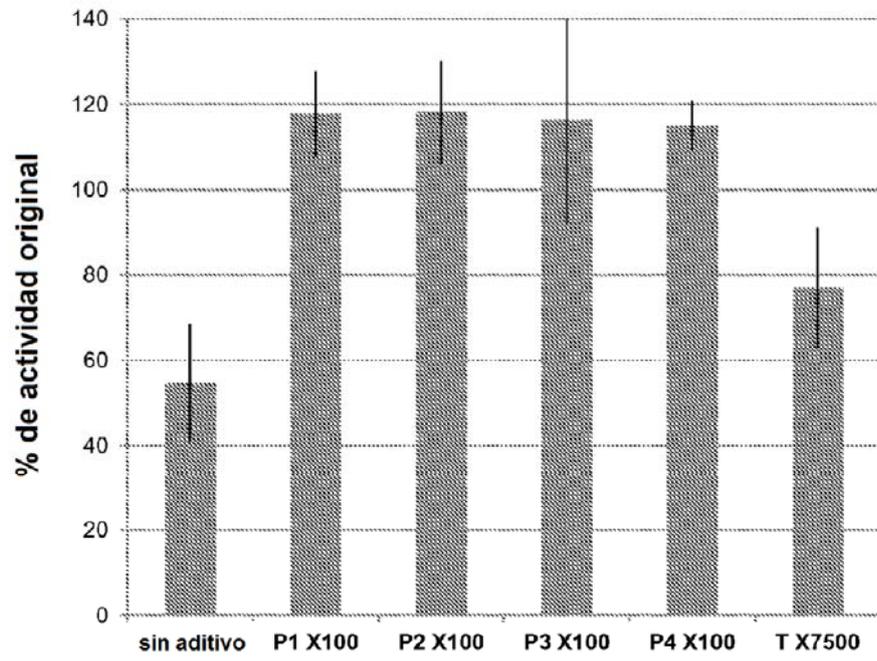


FIGURA 28

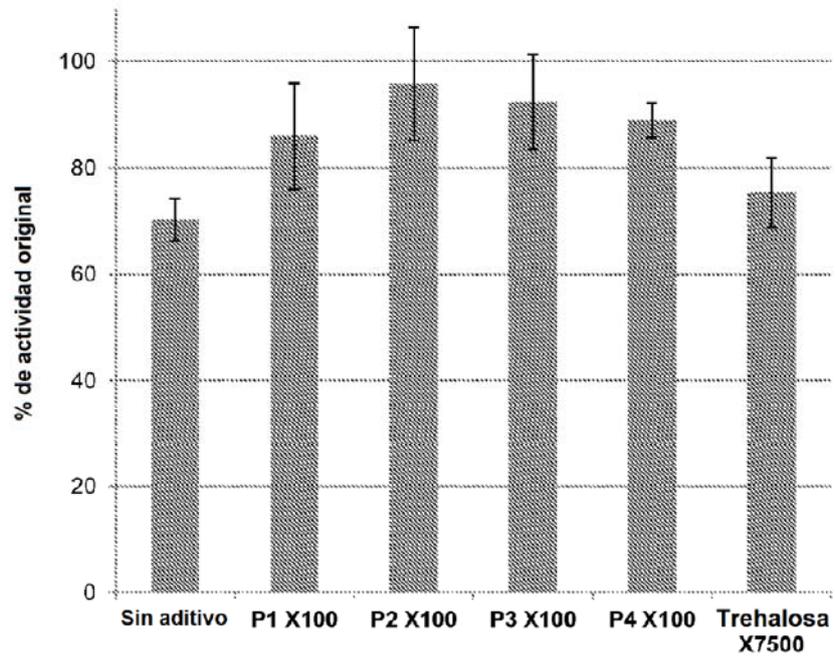


FIGURA 29

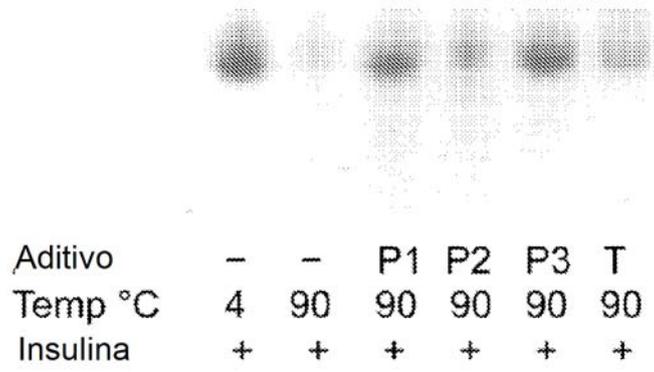


FIGURA 30

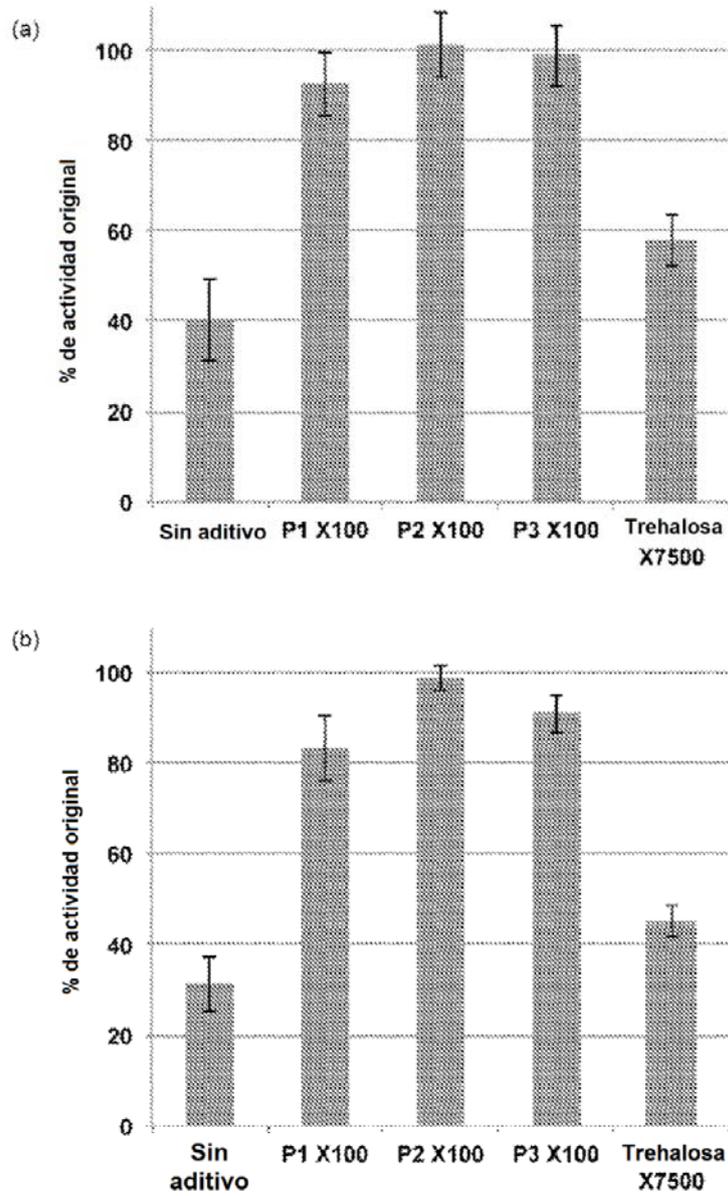


FIGURA 31 a-b

FIGURA 32

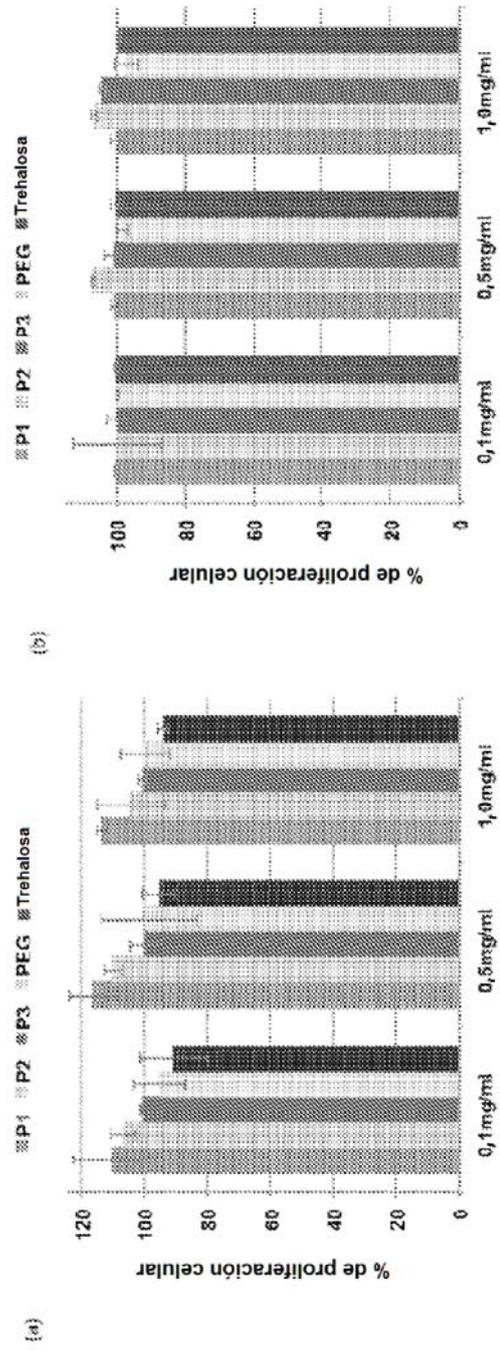
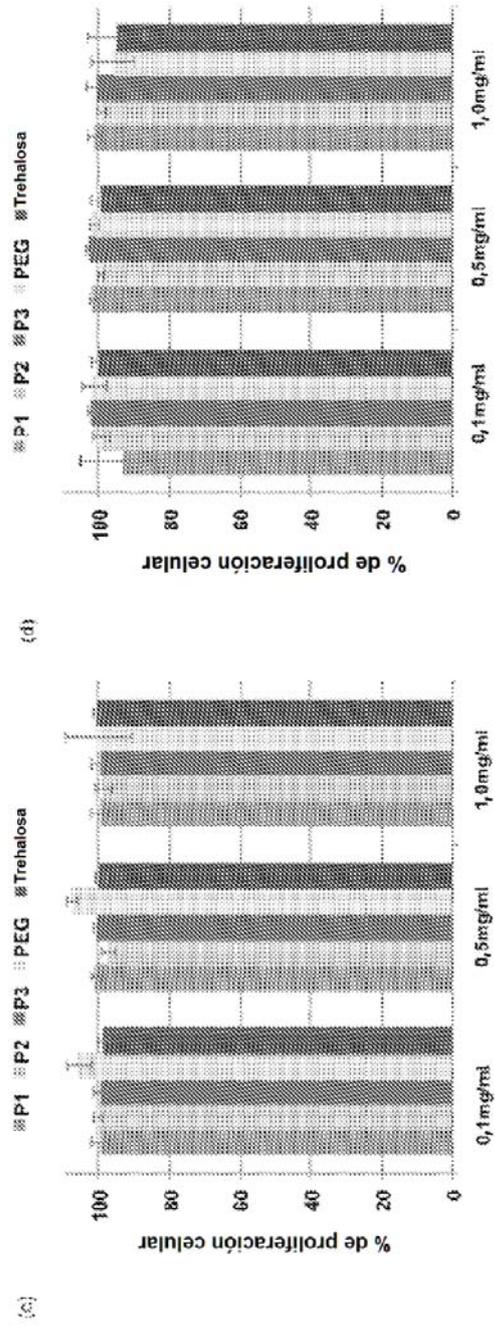


FIGURA 32



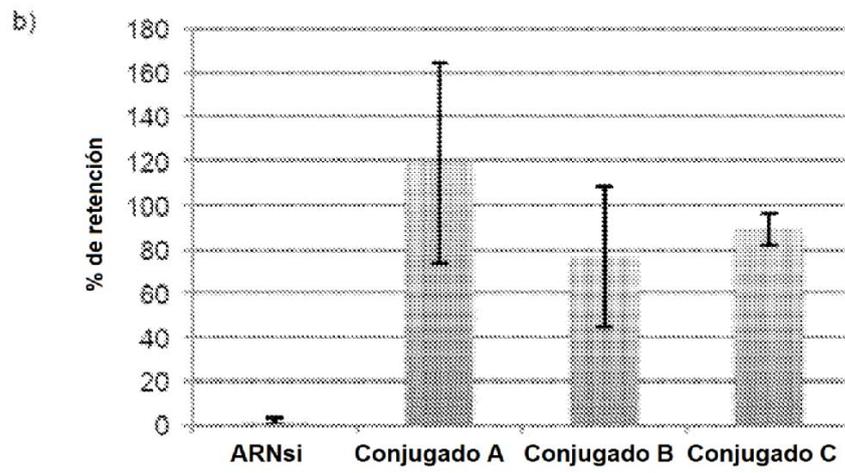
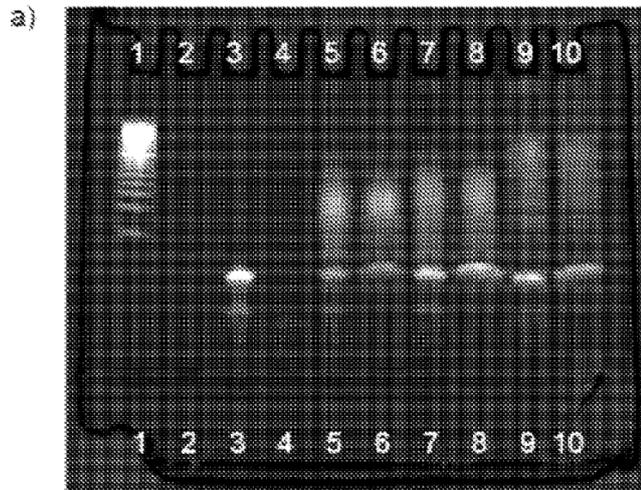


FIGURA 33

FIGURA 34

