

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 858 460**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/50** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2005 E 09161154 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 2111872**

54 Título: **Conjugados de hidrogel**

30 Prioridad:

**05.07.2004 GB 0415041**  
**13.08.2004 EP 04019303**  
**15.03.2005 GB 0505250**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.09.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 858 460 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

Conjugados de hidrogel

### Campo

5 La presente divulgación se dirige a formulaciones de depósito de hidrogel de restos biológicamente activos. Las formulaciones de depósito de hidrogel comprenden restos biológicamente activos, tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos o polinucleótidos, productos naturales o compuestos químicos sintéticos conectados de manera reversible a hidrogeles mesoporosos.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

### Antecedentes de la invención

#### 10 Definiciones

Microporo:

Poros en una red de polímero tridimensional que es más pequeño que un resto biológicamente activo dado (menor de 1 nm).

Mesoporo:

15 Poros en una red de polímero tridimensional que es más grande que un resto biológicamente activo dado (depende del tamaño del resto biológicamente activo, pero normalmente es mayor de 1 nm y menor de 100 nm).

Macromonomero:

20 Un polímero u oligómero cuyas moléculas tienen, cada una, al menos un grupo funcional polimerizable, a menudo en el extremo o en los extremos, que le permite actuar como monómero. Después de la polimerización, los grupos son parte de la cadena principal del polímero final.

La homopolimerización o copolimerización de un macromonomero produce polímeros de peine, de injerto o reticulados.

Reticulación:

25 Una reacción que implica pares de cadenas de polímero que da como resultado la formación de regiones en un polímero a partir de las que emanan al menos cuatro cadenas.

La región puede ser un átomo, un grupo de átomos o varios puntos de ramificación relacionados mediante enlaces, grupos de átomos, cadenas oligoméricas o poliméricas.

Polímero biodegradable:

30 Un polímero susceptible a la degradación en condiciones *in vivo*. Las condiciones *in vivo* incluyen la degradación mediante medios enzimáticos o químicos en las condiciones presentes en un organismo vivo. La degradación se define como un cambio químico en un material polimérico, acompañado de una escisión de enlaces químicos en el polímero y una reducción de su masa molar.

Polímero reactivo:

35 Un polímero que tiene grupos funcionales reactivos que se puede transformar en las condiciones requeridas para una reacción o aplicación dada.

Hidrogel:

40 Un hidrogel se puede definir como una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfífila capaz de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de reticulaciones químicas o físicas covalentes (entrelazamientos e interacciones iónicas e hidrófobas). Las reticulaciones proporcionan la estructura de red y la integridad física. Los hidrogeles presentan una compatibilidad

termodinámica con el agua que les permite hincharse en medios acuosos. Las cadenas de la red se relacionan de tal manera que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros es de unas dimensiones entre 1 nm y 1.000 nm.

Profármaco:

5 Un profármaco es cualquier compuesto que experimenta una biotransformación antes de presentar sus efectos farmacológicos. Por tanto, los profármacos se pueden considerar como restos biológicamente activos (es decir, fármacos) que contienen grupos protectores no tóxicos especializados usados de manera transitoria para alterar o eliminar propiedades no deseables en la molécula original.

Profármaco conectado al vehículo (profármaco de vehículo):

10 Un profármaco conectado al vehículo es un profármaco que contiene una conexión temporal de una sustancia activa dada con un grupo de vehículo transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y que se puede retirar fácilmente *in vivo*, normalmente mediante una escisión hidrolítica.

Profármaco en cascada:

Un profármaco en cascada es un profármaco en el que la escisión del grupo de vehículo se vuelve eficaz únicamente después del desenmascaramiento de un grupo de activación.

## 15 Depósitos de proteínas

Entre los primeros polímeros empleados en aplicaciones de administración de fármacos proteicos se encontraban los polilactida-co-glicólidos (PLGA en inglés). Estos materiales son bastante hidrófobos y únicamente se podrían formular en sistemas de administración unos pocos fármacos proteicos y peptídicos (por ejemplo, somatropina, Nutropin Depot; triptorelina, Trelstar™ Depot; octreotida, Sandostatin® LAR®; leuprolida, Lupron Depot®). La naturaleza hidrófoba del PLGA se aprovecha en el proceso de producción de tales formulaciones de PLGA-proteína. El PLGA se proporciona como solución en un disolvente orgánico miscible en agua, la proteína se disuelve en agua y las dos soluciones se mezclan en una etapa de mezclado. Como consecuencia, el PLG se precipita y atrapa físicamente la proteína en un precipitado. El precipitado tiene un contenido de agua bajo y los tamaños de poro son menores de 1 nm y no presenta propiedades similares al hidrogel. Dependiendo de las condiciones de la etapa de mezclado, el disolvente orgánico miscible en agua usado y las propiedades fisicoquímicas de la proteína, la carga del precipitado del PLGA y la proteína puede variar en gran medida.

Además, Dong Hee Na y col. demostraron que, tras la degradación de los precipitados, los fármacos proteicos y peptídicos encapsulados se modifican químicamente mediante acilación, dando como resultado la liberación de restos de fármacos modificados (véase Dong Hee Na y col. 2003, J.Contr. Release 92, 291-299).

30 Con el fin de abordar una deficiencia fundamental de los precipitados de PLGA, los desarrollos recientes se centraron en el uso de hidrogeles para la administración de proteínas. Los hidrogeles son materiales prometedores en aplicaciones de administración de fármacos, en particular, en la administración de fármacos peptídicos, proteicos, oligonucleotídicos o polinucleotídicos ("opciones bioterapéuticas"). Estas opciones bioterapéuticas son macromoléculas frágiles que a menudo requieren un entorno bien hidratado para su actividad e integridad estructural. El alto contenido de agua de los hidrogeles hace que el material sea biocompatible y minimiza las reacciones de inflamación del tejido en contacto con el hidrogel. Especialmente en la administración de opciones terapéuticas proteicas, el alto grado de hidratación puede ayudar a conservar el pliegue de la proteína, que es un requisito previo para su bioactividad. En entornos hidrófobos, las proteínas tienden a desnaturalizarse, agregarse y perder actividad.

40 Se conocen, en la técnica, dos enfoques diferentes para la preparación de depósitos basados en hidrogel, los depósitos no covalentes y los covalentes.

En el enfoque no covalente, los restos biológicamente activos, tales como fármacos, se encapsulan físicamente sin una conexión química al hidrogel. En este enfoque, el tamaño de poro promedio en la red tridimensional del hidrogel ha de ser menor que el tamaño del resto biológicamente activo para una encapsulación eficaz mediante el hidrogel. Por lo tanto, el resto biológicamente activo no se puede incorporar al hidrogel después de la formación del hidrogel.

45 En el enfoque no covalente, los hidrogeles se han de reticular químicamente en presencia del resto biológicamente activo o los poros se han de formar a través de reticulaciones físicas en un proceso de autoensamblaje, también en presencia del resto biológicamente activo. El tamaño del tamaño de poro es el factor clave que determina la encapsulación del resto biológicamente activo. Si los poros son más grandes que el resto biológicamente activo, el resto biológicamente activo se retirará por efusión rápidamente del interior del hidrogel (lo que se denomina liberación "rápida"). Por lo tanto, se deja que la reticulación avance hasta tal punto que se forme un hidrogel con poros y el resto biológicamente activo quede atrapado físicamente en el interior de los poros.

El tamaño del poro en un hidrogel reticulado químicamente se puede determinar mediante la medición de la difusión de diferentes moléculas con tamaños conocidos (por ejemplo, un conjunto de proteínas diferentes) en los hidrogeles. Por ejemplo, esto se puede realizar experimentalmente mediante la cromatografía de exclusión por tamaño en la que el hidrogel se conforma en forma de perlas y se empaqueta en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. Una vez que el diámetro hidrodinámico de la proteína es mayor que los poros en el hidrogel, no puede tener lugar ninguna difusión de la proteína en las perlas preparadas del hidrogel y la proteína se eluye en el volumen de exclusión de la columna de cromatografía de exclusión.

El tamaño de los poros en las redes autoensambladas resulta difícil de medir debido a la inestabilidad estructural de las redes de autoensamblaje, que se debe a las interacciones físicas normalmente débiles dentro de la red autoensamblada.

Los hidrogeles se pueden preparar mediante la reticulación de biopolímeros hidrófilos o polímeros sintéticos. Los ejemplos de los hidrogeles formados a partir de la reticulación física o química de biopolímeros hidrófilos incluyen hialuronanos, quitosanos, alginatos, colágeno, dextrano, pectina, carragenano, polilisina, gelatina o agarosa (véanse: W.E. Hennink y C.F. van Nostrum, Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 13-36 y A.S. Hoffman, Adv. Drug Del. Rev. 2002, 43, 3-12). Estos materiales consisten en cadenas de cadenas principales de alto peso molecular preparadas de polisacáridos o polipéptidos lineales o ramificados.

Los ejemplos de encapsulación de hidrogel de fármaco-biopolímero incluyen la encapsulación de interleucina-2 humana recombinante en hidrogeles basados en dextrano reticulados químicamente (J.A. Cadée y col., J Control. Release. 2002, 78, 1-13) y la encapsulación de insulina en un complejo de quitosano/hialuronano reticulado iónicamente (S. Surini y col., J. Control. Release 2003, 90, 291-301).

Los ejemplos de hidrogeles basados en polímeros sintéticos de reticulación química o física incluyen (met)acrilatooligolactida-PEO-oligolactida-(met)acrilato, poli(etilen glicol) (PEG), poli(propilen glicol) (PPO), copolímeros de PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(fosfaceno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), copolímeros de PL(G)A-PEO-PL(G)A y poli(etilen imina) (véase A.S Hoffman, Adv. Drug Del. Rev 2002, 43, 3-12).

Los ejemplos de encapsulación de proteína-polímero incluyen la encapsulación de insulina en copolímeros de PEG-g-PLGA y PLGA-g-PEG reticulados físicamente (véase B. Jeong y col. Biomacromolecules 2002, 3, 865-868) y la encapsulación de albúmina de suero bovino en macromonomeros de acrilato-PGA-PEO-PGA-acrilato reticulados químicamente (véase A.S. Sawhney y col. Macromolecules 1993, 26, 581-587).

Este primer enfoque no covalente tiene varios inconvenientes: ya que la etapa de polimerización o reticulación para formar el hidrogel se ha de llevar a cabo en presencia del resto biológicamente activo (es decir, una proteína), el resto biológicamente activo se expone a disolventes y condiciones de reacción de polimerización que pueden causar la desnaturalización o modificación química del resto biológicamente activo. Además, la calidad del producto final resulta difícil de controlar y se pueden producir variaciones de lote a lote. Adicionalmente, la carga de los hidrogeles con el resto biológicamente activo normalmente es bastante baja (<1,5 % de proteína) y resulta difícil de controlar.

Un inconveniente adicional del tipo no covalente de los hidrogeles es el denominado efecto de liberación rápida. El efecto de liberación rápida se caracteriza por una liberación inicial rápida y descontrolada de un resto biológicamente activo débilmente enlazado del hidrogel. La liberación rápida inicial puede representar hasta el 20 % del resto biológicamente activo encapsulado.

Como en los precipitados de PLGA, se requiere la degradación de los hidrogeles para la liberación del resto biológicamente activo de los hidrogeles reticulados. Los sistemas autoensamblados también pueden depender de la degradación o desagregación para la liberación del resto biológicamente activo. La degradación del hidrogel aumenta el tamaño del poro en la medida en que el resto biológicamente activo se puede retirar por difusión del interior del hidrogel hacia los fluidos corporales circundantes para ejercer su bioactividad. La degradación del hidrogel es un proceso que depende de varios parámetros, algunos de los cuales no se comprenden bien. Ya que la degradación del hidrogel depende de las condiciones *in vivo*, puede haber una contribución significativa de los procesos complejos de biodegradación a la degradación global del hidrogel.

El pequeño tamaño del poro puede reducir el contenido de agua del hidrogel y, por lo tanto, su compatibilidad con biomoléculas frágiles.

Resulta difícil optimizar la cinética de liberación *in vivo* que, a su vez, depende de las condiciones del proceso de copolimerización llevado a cabo en presencia del resto biológicamente activo. Esto plantea en conjunto un obstáculo significativo para el desarrollo exitoso de estos tipos de sistemas de administración de fármacos.

Otros inconvenientes inherentes de la liberación dependiente de la degradación del resto biológicamente activo son la variabilidad entre pacientes y en la zona de inyección cuando la degradación se cataliza mediante enzimas. Los niveles y las especificidades de las enzimas varían en gran medida entre los pacientes y también dependen del tejido elegido para la inyección y otros parámetros difíciles de controlar, tales como la profundidad de la inserción de la aguja. Además, la falta de control sobre la degradación, típicamente, puede conducir a efectos de liberación rápida.

Otra complicación radica en el hecho de que la degradación de polímero en condiciones *in vivo* también se puede producir químicamente, sin la contribución de factores biológicos, tales como las enzimas. Por ejemplo, los enlaces de éster empleados típicamente como enlaces biodegradables (escindibles mediante esterasas, pero también mediante determinadas proteasas) se pueden hidrolizar espontáneamente a un pH biológico de 7,4 en tampón puro en ausencia de proteínas de escisión de ésteres. Típicamente, los hidrogeles microporosos requieren una cantidad alta de enlaces de éster con el fin de efectuar una liberación eficaz del resto biológicamente activo.

Tanto la alta concentración local de los enlaces de éster como la encapsulación ajustada del resto biológicamente activo pueden conducir a reacciones secundarias. Puede resultar posible que un grupo amino presente en el resto biológicamente activo se pueda posicionar en la proximidad de un grupo éster, proporcionando el grupo amino un nucleófilo que efectúe la escisión de éster y la posterior amidación. Este proceso da como resultado una conexión de amida muy estable entre el resto biológicamente activo y el polímero. El resto biológicamente activo no se liberará hasta que se degrade la cadena de polímero a la que se une el resto biológicamente activo y el resto biológicamente activo se modificará permanentemente. Se sabe que tales modificaciones reducen la bioactividad del resto biológicamente activo y también pueden causar efectos secundarios, tales como inmunogenia o carcinogénesis. Además, este proceso de modificación no deseable está en gran medida descontrolado y da lugar a una diversidad de especies moleculares. Este tipo de reacción secundaria se describe en Dong Hee Na y col. 2003, J. Contr. Release 92, 291-299.

En el enfoque de depósito covalente alternativo, el resto biológicamente activo (tal como una molécula de fármaco) se une de manera reversible al hidrogel mediante una conexión covalente o iónica. En este caso, se puede usar un hidrogel con mesoporos (el llamado hidrogel mesopórico). La liberación del resto biológicamente activo de los mesoporos en los hidrogeles se evita mediante la unión del resto biológicamente activo.

Existen únicamente unos pocos ejemplos que describen este segundo enfoque de conexión de manera reversible del resto biológicamente activo al hidrogel.

J. Harris y X. Zhao (en la patente europea n.º EP 1053 019 B1) describen la unión covalente reversible de una proteína lisozima a un hidrogel preparado mediante la copolimerización por radicales de un PEO-diacrilato y un PEO-monoacrilato modificado con lisozima. La lisozima se acopló al PEO-monoacrilato a través de un grupo tiourea y un conector de éster biodegradable corto. La liberación de la lisozima del hidrogel se efectuó mediante la incubación en un tampón de pH 7.

Tras la escisión del enlace de éster en el enfoque descrito en la solicitud de patente '019, se liberan los restos de proteína modificados, ya que el resto de conector escindido sigue unido a la proteína a través del grupo tiourea estable. Además, ya que la reacción del conector activado-PEO-monoacrilato con los grupos amino de la lisozima no es regioselectiva, se libera una diversidad de regioisómeros modificados de manera diferente, lo que resulta no deseable. Además, ya que la encapsulación de la proteína se produce tras la formación de hidrogel mediante la polimerización por radicales, la proteína, además de la unión covalente, también se puede encapsular en poros de la red tridimensional formada que son más pequeños que el diámetro de la proteína. Por lo tanto, la liberación de la proteína no se determina únicamente mediante la escisión del conector, sino que también se puede ver influida por la estructura del hidrogel.

Hubbell y colaboradores (patente estadounidense 2 322 0245 A1) describieron, en un enfoque similar, la unión reversible de un pequeño péptido sintético a través de un residuo de cisteína a un hidrogel no biodegradable. El péptido se acopló al PEO-diacrilato mediante una reacción de adición de Michael. El PEO-monoacrilato modificado con péptido se reticuló por radicales con una PEG-diacrilamida para formar un hidrogel modificado con péptido. La liberación del péptido modificado con propionilo se efectuó mediante la incubación del hidrogel en un tampón de pH 7,4 a 37 °C.

Debido al uso actual de materiales de hidrogel microporoso en depósitos de fármacos tanto no covalentes como covalentes, varios problemas han impedido el desarrollo de un sistema resistente y fiable para la administración mantenida de fármacos de un depósito formado a partir de un hidrogel.

El documento WO 03/101425 A2 desvela materiales de hidrogel, que se componen de un armazón polimérico que comprende bloques de construcción hidrófilos reticulados, un agente terapéutico unido covalentemente al armazón polimérico y, opcionalmente, dos o más elementos de reconocimiento unidos covalentemente al armazón polimérico. Los restos basados en polietilén glicol se usan para la construcción de las fijaciones para los elementos de reconocimiento. Las fijaciones de polietilén glicol únicamente se unen al hidrogel después de polimerizarse dicho

hidrogel.

### Descripción detallada de la invención

Actualmente, se ha descubierto, sorprendentemente, que los hidrogeles mesoporosos se pueden usar como vehículos de polímero para los depósitos de fármaco si se proporcionan como vehículo en un sistema de profármaco.

- 5 La invención se dirige hacia un método para la fabricación de un profármaco polimérico en forma de un conjugado de hidrogel-fármaco que comprende el hidrogel, el fármaco y un conector de profármaco reversible, en donde el hidrogel está reticulado, con un tamaño de poro de una fracción sustancial de poros mayor de 1 nm y menor de 100 nm en estado hidratado, en donde el tamaño promedio del poro del hidrogel es mayor que el diámetro del fármaco, en donde el hidrogel es un artículo conformado en forma de perlas blandas de material microparticulado que tienen un diámetro de entre 1 y 500  $\mu\text{m}$  y en donde el hidrogel comprende enlaces biodegradables seleccionados del grupo de enlaces escindibles químicamente que consisten en enlaces de fosfato, fosfonato, carbonato, carbamato, disulfuro y éster, en donde la conexión entre el conector de profármaco y el fármaco es reversible y en donde, después de la escisión del conector, el fármaco se libera en forma no modificada y en donde el fármaco es un pequeño agente bioactivo orgánico, comprendiendo el método
- 10
- 15 - una primera etapa de sintetización del hidrogel; seguida de
- una etapa de relación covalente del conector de profármaco reversible con el hidrogel;
- y
- una etapa de conjugación covalente del fármaco con el conector de profármaco reversible; en donde las últimas etapas se pueden llevar a cabo en cualquier orden.
- 20

Los profármacos de hidrogel mesoporoso (MHP en inglés) de restos biológicamente activos, es decir, las moléculas de fármaco, se pueden administrar a un paciente para formar un depósito en el interior del paciente que proporcione una liberación mantenida del resto biológicamente activo durante un período de tiempo deseado.

- 25 Una ventaja principal de los MHP es que proporcionan formulaciones de depósito sin necesidad de encapsulación. Hasta ahora, muchos materiales de hidrogel biocompatibles con tamaños de poro grandes no se podían usar para la formulación de fármacos debido a su falta de propiedades de encapsulación. En tales materiales de hidrogel biocompatibles, el resto biológicamente activo se liberaría demasiado rápido para la mayoría de las aplicaciones terapéuticas a partir de tales materiales bien hidratados y mecánicamente blandos. La provisión de un hidrogel como vehículo de profármaco de acuerdo con la invención permite el desarrollo de sistemas superiores de administración de fármacos. Las propiedades del material de vehículo, tales como la biocompatibilidad (mínima irritación, inmunogenia y toxicidad), se pueden optimizar independientemente de las propiedades de liberación del resto biológicamente activo, ya que las propiedades de liberación se determinan únicamente mediante la cinética de escisión del conector de profármaco. Por lo tanto, la liberación del resto biológicamente activo es, en gran medida, independiente del material de vehículo (es decir, el hidrogel) y no requiere la degradación química o enzimática del hidrogel.
- 30
- 35

El sistema de MHP consiste en tres partes, un vehículo de hidrogel mesoporoso, un conector de profármaco y un resto biológicamente activo, es decir, una molécula de fármaco. El conector de profármaco se enlaza covalentemente al vehículo de hidrogel mesoporoso y al resto biológicamente activo de tal manera que el conjugado de resto biológicamente activo-conector-hidrogel es un profármaco de vehículo.

### 40 Resto biológicamente activo

Asimismo, los restos biológicamente activos desvelados son los biopolímeros, como las proteínas, los polipéptidos y los oligonucleótidos o polinucleótidos (ARN, ADN), y los ácidos nucleicos peptídicos (PNA en inglés).

- 45 Los restos biológicamente activos de la invención son fármacos bioactivos orgánicos de moléculas pequeñas e incluyen restos, tales como agentes activos del sistema nervioso central, agentes antiinfecciosos, antineoplásicos, antibacterianos, antifúngicos, analgésicos, anticonceptivos, antiinflamatorios, esteroideos, vasodilatadores, vasoconstrictores y cardiovasculares. Los ejemplos de tales compuestos son daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitoxantrona, aminoglutetimida, amantadina, diafenilsulfona, etambutol, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxazol, sulfaleno, clinafloxacina, paclitaxel, moxifloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina, neomicina B, espectinomina, kanamicina A, meropenem, dopamina, dobutamina, lisinopril, serotonina, carbutamida y acivicina.
- 50

Asimismo, las proteínas y los polipéptidos desvelados incluyen ACTH, adenosina desaminasa, agalsidasa, albúmina, alfa-1 antitripsina (AAT), inhibidor de la alfa-1 proteinasa (API en inglés), alteplasa, anistreplasa, serina proteasa ancrod, anticuerpos (monoclonales o policlonales y fragmentos o fusiones), antitrombina III, antitripsinas, aprotinina,

asparaginidasas, bifalina, proteínas óseas morfogénicas, calcitonina (salmón), colagenasa, desoxirribonucleasa, endorfinas, enfuvirtida, encefalinas, eritropoyetinas, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisisina, proteínas de fusión, hormonas estimulantes de los folículos, factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF en inglés), galactosidasa, glucagón, glucocerebrosidasa, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF en inglés), proteína de activación de la fosfolipasa (PLAP en inglés), gonadotropina coriónica (hCG), hemoglobinas, vacunas contra la hepatitis B, hirudina, hialuronidasas, iduronidasa, inmunoglobulinas, vacunas contra la gripe, interleucinas (1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12), antagonista del receptor de IL-1 (ar de IL-1 hr), insulinas, interferones (alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a, gamma 1b), factor del crecimiento de queratinocitos (KGF en inglés), factor del crecimiento transformante, lactasa, leuprolida, levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna contra Lyme, péptido natriurético, pancrelipasa, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, factor acetilhidrolasa de activación de las plaquetas (PAP-AH en inglés), prolactina, proteína C, octreotida, secretina, sermorelina, superóxido dismutasa (SOD), somatotropinas (hormona del crecimiento), somatostatina, estreptoquinasa, sacarasa, fragmento de toxina tetánica, tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tirotropina, factor de necrosis tumoral (TNF en inglés), receptor de TNF-Fc de IgG, activador del plasminógeno tisular (tPA en inglés), TSH, urato oxidasa, uroquinasa, vacunas y proteínas vegetales, tales como lectinas y ricinas. En el presente documento, también se desvela cualquier polipéptido sintético o cualquier parte de un polipéptido con bioactividad *in vivo*. Además, las proteínas preparadas mediante metodologías de ADN recombinante, incluyendo las versiones mutantes de las proteínas mencionadas anteriormente, los fragmentos de anticuerpos, las proteínas de enlace monocatenarias, los anticuerpos catalíticos y las proteínas de fusión, también se desvelan.

### Conector

El agente conector forma una conexión reversible con el resto biológicamente activo de tal manera que, después de la escisión del conector, el resto biológicamente activo se libera en forma no modificada. Se puede aplicar una diversidad de diferentes agentes conectores o grupos conectores para este fin, tal como describen B. Testa y col. (B. Testa, J. Mayer, *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Wiley-VCH, 2003).

En una realización preferida, el conector es un conector de profármaco en cascada constituido por un grupo de enmascaramiento y un grupo de activación. El resto biológicamente activo se enlaza al grupo de activación, preferentemente a través de un enlace de carbamato. La liberación del resto biológicamente activo se efectúa mediante un mecanismo de dos etapas. En la primera etapa, el grupo de enmascaramiento se desprende del conector mediante la escisión del enlace que relaciona el grupo de enmascaramiento y el grupo de activación. El enlace que relaciona el grupo de enmascaramiento y el grupo de activación también puede ser un enlace de carbamato. Posteriormente, en una segunda etapa, se escinde el enlace entre el resto biológicamente activo y el grupo de activación y se libera el resto biológicamente activo. Ya que esta segunda etapa es más rápida que la primera etapa, la escisión del grupo de enmascaramiento es la etapa limitante de la velocidad de la liberación del resto biológicamente activo.

La escisión del grupo de enmascaramiento se basa preferentemente en un proceso hidrolítico, lo más preferentemente se cataliza mediante un nucleófilo presente en el grupo de enmascaramiento. De manera autocatalítica, este nucleófilo ataca de manera intramolecular al carbono del grupo carbamato que constituye la conexión entre el grupo de enmascaramiento y el grupo de activación. La presencia del nucleófilo en la proximidad del grupo carbamato potencia la susceptibilidad del grupo carbamato a la hidrólisis. En una realización preferida, el nucleófilo es una amina terciaria que no experimenta una reacción con el carbamato carbonilo y no conduce a un producto de ciclación.

La liberación del resto biológicamente activo se inicia mediante un reordenamiento intramolecular del tipo de eliminación en 1,6, seguido de autohidrólisis.

También se prefiere que al menos parte del conector permanezca unido al hidrogel después de la escisión del enlace con el resto biológicamente activo. Si el conector es un conector de profármaco en cascada, se prefiere que el grupo de activación permanezca enlazado de manera estable al hidrogel.

### Hidrogel mesoporoso reactivo

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales, hidrófilas o anfífilas capaces de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros y son insolubles debido a la presencia de reticulaciones químicas o físicas covalentes (entrelazamientos e interacciones iónicas e hidrófobas). Las reticulaciones proporcionan a la red estructura e integridad física.

Tales hidrogeles mesoporosos reactivos se caracterizan por los siguientes componentes estructurales: resto de reticulación, resto de cadena principal, grupos funcionales reactivos, poros y, opcionalmente, enlaces biodegradables.

#### Restos de cadena principal y de reticulación

Los ejemplos de polímeros adecuados para la síntesis de hidrogeles son polímeros basados en polialquiloxi funcionalizados o no funcionalizados reticulados química o físicamente, como poli(propileno glicol) o poli(etileno glicol), dextrano, quitosano, ácido hialurónico y derivados, alginato, xilano, manano, carragenano, agarosa, celulosa, almidón, almidón de hidroxietilo (RES en inglés) y otros polímeros basados en carbohidrato, poli(alcoholes vinílicos), poli(oxazolinas), poli(anhídridos), poli(orto ésteres), poli(carbonatos), poli(uretanos), poli(ácidos acrílicos), poli(acrilamidas), tales como poli(hidroxipropilmetacrilamida) (HMPA), poli(acrilatos), poli(metacrilatos), como poli(hidroxietilmetacrilato), poli(organofosfocenos), poli(siloxanos), poli(vinilpirrolidona), poli(cianoacrilatos), poli(ésteres), tales como poli(ácido láctico) o poli(ácidos glicólicos), poli(iminocarbonatos), poli(aminoácidos), tales como poli(ácido glutámico) o polilisina, colágeno, gelatina, copolímeros, copolímeros de injerto, polímeros reticulados, hidrogeles y copolímeros de bloques de los polímeros enumerados anteriormente. Estos polímeros pueden servir como restos de cadena principal o restos de reticulación. Además de los restos de reticulación oligoméricos o poliméricos, se pueden usar restos de reticulación de bajo peso molecular, especialmente cuando se usan restos de cadena principal hidrófilos de alto peso molecular para la formación de hidrogel.

Los métodos de reticulación física o química adecuados son conocidos por parte de la persona experta en la materia y se describen en W.E. Hennink y C.F. van Nostrum, Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 1336.

### Poros

Las cadenas de la red en un hidrogel mesoporoso se relacionan de tal manera que existen poros en estado hidratado y que una fracción sustancial de estos poros es de unas dimensiones entre 1 y 100 nm.

El hidrogel es mesoporoso con respecto al resto biológicamente activo (por ejemplo, la molécula de fármaco) a transportar, es decir, el tamaño promedio del poro del hidrogel es mayor que el diámetro del resto biológicamente activo. Por ejemplo, un hidrogel que es mesoporoso con respecto a las moléculas de insulina tiene poros de más de 4 nm de tamaño (en estado hidratado).

Las dimensiones de los poros se pueden controlar mediante el ajuste de tanto la longitud del reticulante como del grado de reticulación.

Por ejemplo, si se usan reticulantes de moléculas pequeñas, por ejemplo, en un biopolímero, tal como dextrano, la porosidad se puede controlar a través del grado de reticulación. Normalmente, cuanto menor es el grado de reticulación, mayor es el tamaño de los poros.

El tamaño del poro aumenta con la longitud del reticulante. La longitud del reticulante se refiere a la longitud espaciadora entre los dos grupos reactivos usados para la reticulación del resto de cadena principal. Un reticulante polimérico típico para el hidrogel mesoporoso tiene al menos dos grupos funcionales normalmente en los extremos de la cadena polimérica. Los grupos funcionales normalmente se relacionan mediante una cadena lineal o ramificada de PM entre 500 y 50.000. Tales reticulantes pueden ser macromonómeros, en cuyo caso, los macromonómeros se caracterizan por tener al menos dos grupos funcionales polimerizables.

### Grupos funcionales

El hidrogel es un material funcionalizado. Los grupos funcionales reactivos sirven como sitios de conjugación para el conector. Idealmente, los grupos funcionales reactivos se dispersan homogéneamente por todo el hidrogel y pueden estar presentes o no sobre la superficie del hidrogel. Los ejemplos de tales grupos funcionales reactivos incluyen ácido carboxílico y derivados activados, amino, maleimida, tiol, ácido sulfónico y derivados, carbonato y derivados, carbamato y derivados, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico y derivados, ácido fosfónico y derivados, haloacetilo, haluros de alquilo, acrililo y otros aceptores de Michael alfa-beta insaturados, agentes de alquilación, como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros, como disulfuro de piridilo, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, epóxido, oxirano y aziridina.

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

En una divulgación preferida, el hidrogel mesoporoso reactivo es un artículo conformado, tal como una malla o una endoprótesis vascular. El hidrogel se forma hasta dar perlas de material microparticulado que se pueden administrar por inyección subcutánea o intramuscular por medio de una jeringa convencional. Tales perlas blandas pueden tener un diámetro de entre 1 y 500 micrómetros.

### Enlaces biodegradables

La biodegradabilidad del hidrogel mesoporoso resulta de importancia si el hidrogel se va a usar en aplicaciones médicas, tales como la cicatrización de heridas, el sellado de heridas o para la administración de fármacos (o, en



efecto, la administración de cualquier tipo de restos biológicamente activos). En tales aplicaciones, el hidrogel se administra mediante una inyección subcutánea o intramuscular o se aplica por vía tópica a una herida y se deja en el organismo para que se degrade *in vivo* y se reabsorba o excrete.

5 En cuanto a la biodegradabilidad del hidrogel, los enlaces biodegradables se han de incorporar en los restos de cadena principal y/o reticulación. La susceptibilidad de estos enlaces biodegradables a escindirse en condiciones *in vivo* puede causar la degradación completa del hidrogel después de un determinado período de tiempo, lo que resulta deseable en las aplicaciones mencionadas anteriormente en el campo médico. La escisión de estos enlaces biodegradables se puede desencadenar enzimática o químicamente o ser una combinación de ambas.

10 Los enlaces biodegradables que se pueden escindir químicamente en condiciones *in vivo* incluyen enlaces de fosfato, fosfonato, carbonato, carbamato, disulfuro y éster.

Existe una gran diversidad de enlaces que se puede escindir enzimáticamente. Los hidrogeles con cadenas principales de biopolímero o reticulantes de biopolímero son, de por sí, biodegradables sobre la superficie del artículo de hidrogel si están presentes las enzimas para las que las cadenas de cadenas principales son sustratos. La velocidad de degradación en condiciones *in vivo* es diferente en cada tipo diferente de hidrogel.

15 En general, la velocidad de degradación va en función de la degradabilidad de la cadena principal (número de enlaces escindibles, dependencia de la escisión del enlace tras la autohidrólisis o catálisis enzimática) y el grado de reticulación. Aunque las reticulaciones no contribuyen directamente a la degradabilidad del hidrogel, las reticulaciones pueden permitir el acceso de la enzima al hidrogel si el grado de reticulación es lo suficientemente pequeño como para que los poros sean lo suficientemente grandes para que las enzimas penetren en el hidrogel. Los biopolímeros  
20 adecuados incluyen polímeros basados en carbohidrato, como dextrano, quitosano, ácido hialurónico y derivados, alginato, xilano, manano, carragenano, agarosa, celulosa, almidón y almidón de hidroxietilo y oligómeros o polímeros basados en polipéptidos u oligopéptidos, como las secuencias de péptidos sintéticos, el colágeno y la gelatina.

#### Proceso de preparación de MHP

25 Con el fin de garantizar que el profármaco del resto biológicamente activo únicamente se acople a los mesoporos del hidrogel, el resto biológicamente activo se ha de hacer reaccionar con el hidrogel después de que el hidrogel se haya sintetizado. Esto asegura que la liberación del resto biológicamente activo del hidrogel se determine mediante el conector de profármaco y sea independiente de la degradación de hidrogel opcional. Esto se debe a que, después de la escisión del conector de profármaco, el resto biológicamente activo se puede retirar por difusión libremente de los  
30 mesoporos del hidrogel.

Una ventaja adicional de este método de preparación es que los reactivos y disolventes que se ponen en contacto con el hidrogel durante la preparación del hidrogel se pueden retirar del hidrogel una vez completada la preparación mediante una etapa de filtración. La retirada eficaz de reactivos y disolventes evita la desnaturalización o modificación del resto biológicamente activo añadido al hidrogel. La retirada eficaz de reactivos y disolventes también evita la  
35 filtración de sustancias potencialmente tóxicas después de la administración a un organismo.

En la sección de Ejemplos, se proporcionan ejemplos representativos para la preparación de MHP. Los MHP también se pueden preparar mediante varios métodos de otro tipo.

40 A fin de preparar un MHP (Método A en la Figura 1), se puede acoplar un agente conector de profármaco al hidrogel mesoporoso reactivo en una primera etapa de reacción. Tal agente conector de profármaco adecuado transportaría dos grupos funcionales. El primero de los grupos funcionales serviría como unión del conector de profármaco al hidrogel y el segundo de los grupos funcionales se conjugaría posteriormente con el resto biológicamente activo a través de un grupo funcional adecuado presente en el resto biológicamente activo.

45 Tales primeros grupos funcionales reactivos deberían ser complementarios a un grupo funcional presente en el hidrogel mesoporoso reactivo. Los ejemplos de tales primeros grupos funcionales reactivos incluyen ácido carboxílico y derivados activados, amino, maleimida, tiol, ácido sulfónico y derivados, carbonato y derivados, carbamato y derivados, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico y derivados, ácido fosfónico y derivados, haloacetilo, haluros de alquilo, acrilóilo y otros aceptores de Michael alfa-beta insaturados, agentes de arilación, como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros, como disulfuro de piridilo, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, epóxido, oxirano y aziridina.

50 Los primeros grupos funcionales preferidos del conector de profármaco incluyen tiol, maleimida, amino, ácido carboxílico y derivados, carbonato y derivados, carbamato y derivados, aldehído y haloacetilo.

Después de la activación del segundo de los grupos funcionales del conector de profármaco, el conjugado de conector-hidrogel se puede poner en contacto con el resto biológicamente activo en la segunda etapa de reacción y el exceso

de resto biológicamente activo (por ejemplo, exceso de fármaco) se puede retirar mediante filtración después de la conjugación del resto biológicamente activo con el conector de profármaco enlazado al hidrogel. A pesar del gran tamaño del poro del hidrogel, el resto biológicamente activo permanece enlazado en el interior del hidrogel mediante la unión covalente de un grupo funcional adecuado presente en el resto biológicamente activo al segundo grupo funcional del conector de profármaco.

Los segundos grupos funcionales adecuados del conector de profármaco incluyen ácido carboxílico y derivados, carbonato y derivados, hidroxilo, hidrazina, hidroxilamina, ácido maleámico y derivados, cetona, amino, aldehído, tiol y disulfuro.

Los grupos funcionales adecuados presentes en el resto biológicamente activo incluyen tiol, ácido carboxílico, amino, hidroxilo, cetona e imidazol.

Opcionalmente, esta secuencia de reacción se puede invertir y el conector de profármaco se puede conjugar, en primer lugar, con el resto biológicamente activo y el conjugado de resto biológicamente activo - conector de profármaco resultante se puede hacer reaccionar, a continuación, con el hidrogel mesoporoso reactivo (Método B en la Figura 1).

Estos métodos de preparación se muestran esquemáticamente en la Figura 1.

#### 15 **Proceso de síntesis de hidrogel mesoporoso reactivo**

Los hidrogeles que son reactivos y mesoporosos se pueden preparar mediante una diversidad de métodos diferentes. Un proceso de síntesis particular se basa en el uso de un macromonomero reticulante que transporta al menos dos grupos funcionales polimerizables y un macromonomero o monómero no reticulante que transporta un grupo funcional polimerizable y al menos un grupo funcional que no está destinado a intervenir en la etapa de polimerización. Pueden estar presentes o no monómeros diluyentes adicionales. La copolimerización de estos componentes da como resultado un hidrogel que contiene grupos funcionales proporcionados mediante el macromonomero no reticulante. Con el fin de asegurar que el grupo funcional esté disponible para las reacciones una vez completada la polimerización, las condiciones de polimerización se eligen de tal manera que el grupo funcional no se modifique. Como alternativa, el grupo funcional se puede proteger mediante el uso de un grupo protector reversible conocido por parte de la persona experta en la materia, que se retira después de la polimerización.

Los grupos funcionales polimerizables útiles incluyen grupos polimerizables por radicales, como vinilo, vinil-benceno, acrilato, acrilamida, metacrilato y metacrilamida, grupos polimerizables iónicamente, como oxetano, aziridina y oxirano.

En un método alternativo de preparación, el hidrogel se genera a través de reacciones de ligación química. El hidrogel se puede formar a partir de dos eductos macromoleculares con funcionalidades complementarias que experimentan una reacción, tal como una condensación o adición. Uno de estos materiales de partida es un reticulante con al menos dos grupos funcionales idénticos y el otro material de partida es una estructura de cadena principal homomultifuncional. Los grupos funcionales adecuados presentes en el reticulante incluyen grupos amino terminal, ácido carboxílico y derivados, maleimida y aceptores de Michael alfa y beta insaturados de otro tipo, como vinilsulfona, tiol e hidroxilo. Los grupos funcionales adecuados presentes en la estructura de cadena principal incluyen grupos amino, ácido carboxílico y derivados, maleimida y aceptores de Michael alfa y beta insaturados de otro tipo, como vinilsulfona, tiol e hidroxilo.

Si los grupos funcionales reactivos del reticulante se usan subestequiométricamente con respecto a los grupos funcionales reactivos de la cadena principal, el hidrogel resultante será un hidrogel reactivo con los grupos funcionales reactivos libres unidos a la estructura de cadena principal.

#### 40 **MHP con cinética de degradación y liberación en fases**

La presente divulgación también incluye profármacos de hidrogel mesoporoso degradable que presentan una liberación mínima del resto biológicamente activo conjugado con productos de degradación de hidrogel.

En general, resulta ventajoso limitar la diversidad estructural de los productos de degradación de una formulación de fármaco polimérico con respecto a las longitudes de cadena, sustituciones o modificaciones. Específicamente, se debe evitar la liberación de conjugados de resto biológicamente activo-polímero.

La degradación del hidrogel puede dar como resultado la liberación de conjugados de productos de degradación del resto biológicamente activo fijados a productos de degradación por medio del conector de profármaco si la cinética de degradación del hidrogel es de un orden similar a la cinética de escisión del profármaco. Los conjugados de productos de degradación (mostrados esquemáticamente en la Figura 4) son modificaciones no deseadas de los restos biológicamente activos. Únicamente aparecerán unos pocos de estos conjugados de productos de degradación si la escisión del hidrogel degradable es al menos un orden de magnitud más lenta que la liberación del resto biológicamente activo. Sin embargo, pueden existir aplicaciones, tales como inyecciones semanales de MHP, en las

que resulte deseable una disgregación más rápida del hidrogel.

Actualmente, se ha hallado, sorprendentemente, que a través del control del grado de reticulación, el grado de la longitud de cadena del polímero de cadena principal, el posicionamiento de los enlaces degradables y el sitio del conector de profármaco, la cinética de liberación de los productos de degradación resultantes del hidrogel se puede ajustar con precisión y la heterogeneidad de los productos de degradación se puede minimizar. En tal hidrogel con propiedades de degradación controlada, los enlaces degradables se localizan exclusivamente en las cadenas de reticulación lineal y estos se posicionan entre la cadena y el sitio de unión de la cadena principal. El reticulante que transporta los enlaces degradables es simétrico con respecto a los enlaces degradables, haciendo que los enlaces sean químicamente idénticos. Tal profármaco de hidrogel mesoporoso biodegradable se muestra esquemáticamente en la Figura 2. Los grupos funcionales para la unión del conector de profármaco se posicionan en las cadenas laterales que emanan del polímero de cadena principal. No existen enlaces degradables entre estos grupos funcionales y la cadena principal no biodegradable o en la propia cadena principal no biodegradable.

La escisión de los enlaces degradables del reticulante da como resultado un proceso de dos fases. Poco después del tiempo inicial, únicamente se liberan del hidrogel los productos de escisión que contienen unidades de reticulante, cuando cada cadena principal no biodegradable se conecta con al menos otra cadena principal no biodegradable a través de varios reticulantes. Si, por ejemplo, se han usados ésteres de PEG, el compuesto liberado es PEG. La liberación de PEG de este tipo de hidrogel sigue aproximadamente una cinética de primer orden.

Después de un determinado tiempo de retardo, se liberan las estructuras de cadena principal. A diferencia de la liberación del producto de escisión de reticulante, la liberación de las estructuras de cadena principal sigue una cinética sigmoidea. La cadena principal liberada es una cadena lineal sustituida con residuos anteriormente relacionados con restos de reticulación (por ejemplo, cadenas laterales que terminan con ácidos carboxílicos) y el resto de grupo funcional. La Figura 3 muestra esquemáticamente un MHP parcialmente degradado (Figura 3a) y uno completamente degradado (Figura 3b).

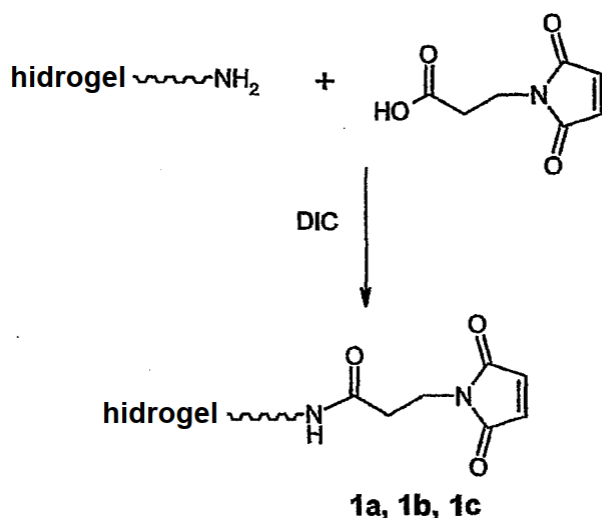
Resulta deseable prolongar el tiempo de retardo hasta tal punto que casi toda la liberación del fármaco (>90 %) se haya producido antes de que haya tenido lugar una cantidad significativa de liberación de la cadena principal (<10 %). Este tiempo de retardo se puede controlar mediante el ajuste del número de reticulaciones y la semivida del enlace biodegradable. El tiempo de retardo se puede aumentar mediante la incorporación de más reticulaciones por cadena principal y el aumento de la semivida del enlace biodegradable. El efecto de un tiempo de retardo aumentado mediante el aumento del número de reticulaciones se muestra en la Figura 10.

#### Breve descripción de las figuras:

La Figura 1 muestra el proceso de preparación de profármacos de hidrogel mesoporoso  
 la Figura 2 muestra esquemáticamente la estructura de profármacos de hidrogel mesoporoso biodegradable  
 la Figura 3 muestra el proceso de degradación de profármacos de hidrogel mesoporoso biodegradable  
 la Figura 4 muestra esquemáticamente un profármaco modificado con polímero no deseado  
 la Figura 5 muestra la liberación de insulina a partir de un profármaco de hidrogel mesoporoso basado en poliacrilamida  
 la Figura 6 muestra la liberación de insulina a partir de un profármaco de hidrogel mesoporoso basado en carbohidrato  
 la Figura 7 muestra la liberación *in vivo* de insulina a partir de profármacos de hidrogel mesoporoso  
 la Figura 8 muestra la liberación de insulina a partir de un profármaco de hidrogel mesoporoso biodegradable  
 la Figura 9 muestra la caracterización por CL-EM de la insulina liberada después de la explantación  
 la Figura 10 muestra la degradación de hidrogeles biodegradables

Ejemplos (los ejemplos relacionados con hidrogeles descritos como no biodegradables y/o que comprenden insulina no son de acuerdo con la invención)

**Derivatización de maleimida de hidrogel mesoporoso reactivo no biodegradable basado en poliacrilamida (amino-PEGA)**



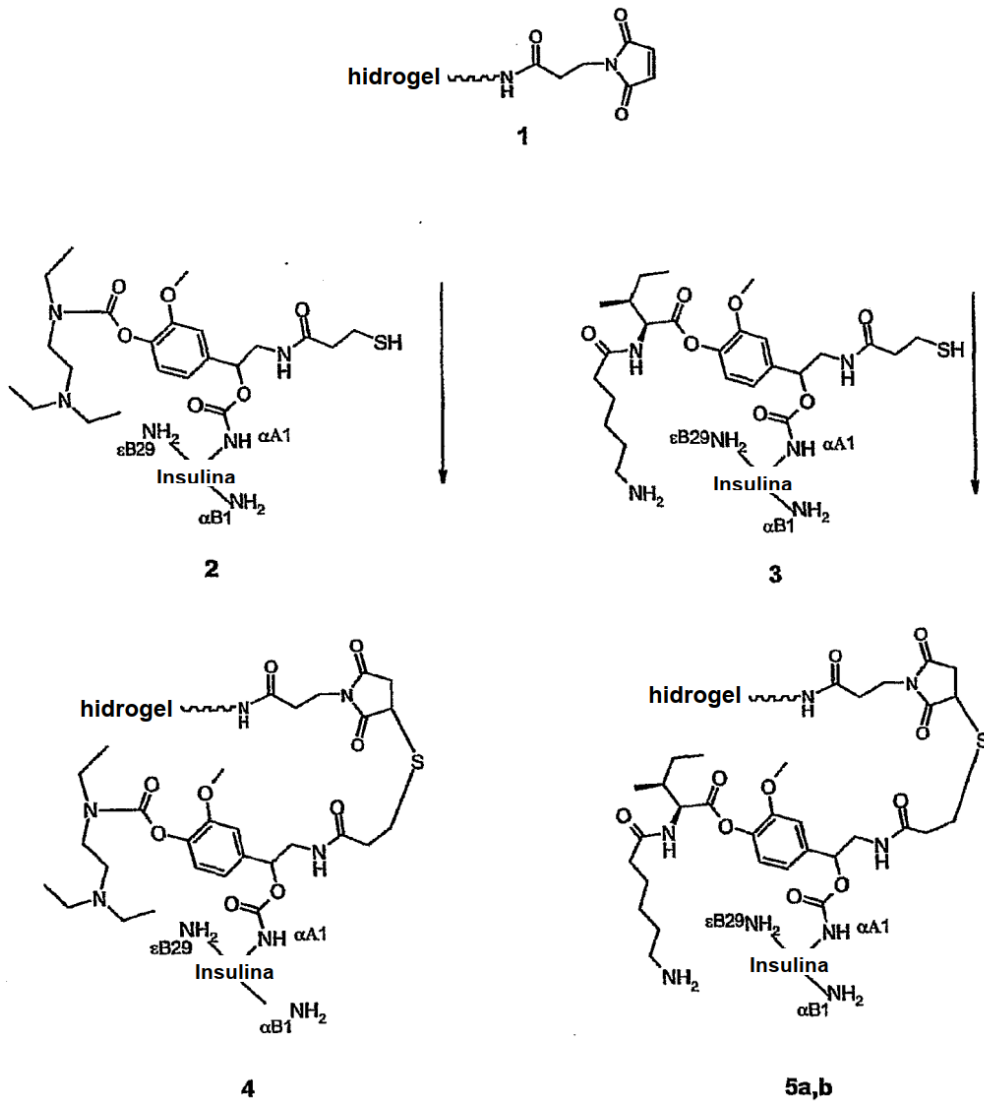
Las perlas de hidrogel de  $\text{NH}_2$ -PEGA mesoporoso no biodegradable con una carga de 0,4 mmol/g y un tamaño de perla de 150-300  $\mu\text{m}$  se adquirieron a través de Novabiochem. Las perlas de hidrogel Versamatrix-800 de  $\text{NH}_2$ -PEGA con una carga de 0,31 mmol/g y un tamaño de perla de 80-100  $\mu\text{m}$  se adquirieron a través de Versamatrix (Dinamarca).

- 5 Se pesaron 2,5 g de hidrogel de  $\text{NH}_2$ -PEGA humedecido en metanol (0,4 mmol/g de carga de  $\text{NH}_2$ ) en una jeringa equipada con una frita de polipropileno. La carga de maleimida se ajustó mediante acilación empleando una mezcla de ácido maleimidopropiónico activado y ácido acético, tal como se describe a continuación. El hidrogel se lavó 5 veces con DMF y se hizo reaccionar con 13,5 mg (0,08 mmol) de ácido 3-maleimidopropiónico, 115,2  $\mu\text{l}$  (1,92 mmol) de ácido acético y 313  $\mu\text{l}$  (2 mmol) de DIC en 4 ml de DMF durante 30 min. El hidrogel 1a derivatizado de maleimida se lavó 10 veces con DMF y DCM y, finalmente, con acetonitrilo.

El hidrogel 1b se sintetizó siguiendo el protocolo anterior con la siguiente modificación. Se hicieron reaccionar 2,5 g de hidrogel de  $\text{NH}_2$ -PEGA humedecido en metanol (~250 mg de resina seca) con 6,8 mg (0,04 mmol) de ácido 3-maleimidopropiónico, 117,6  $\mu\text{l}$  (1,96 mmol) de ácido acético y 313  $\mu\text{l}$  (2 mmol) de DIC en 4 ml de DMF durante 30 min. Finalmente, el hidrogel se lavó tal como se describe.

- 15 El hidrogel 1c se sintetizó siguiendo el protocolo anterior con la siguiente modificación. Se lavaron 2 g de hidrogel Versamatrix-800 de  $\text{NH}_2$ -PEGA humedecido en metanol (0,31 mmol/g de carga de  $\text{NH}_2$ , resina seca), tal como se describe, y se hicieron reaccionar con 25,3 mg (0,15 mmol) de ácido 3-maleimidopropiónico, 115,2  $\mu\text{l}$  (1,85 mmol) de ácido acético y 313  $\mu\text{l}$  (2 mmol) de DIC en 4 ml de DMF durante 30 min. Finalmente, el hidrogel se lavó tal como se describe.

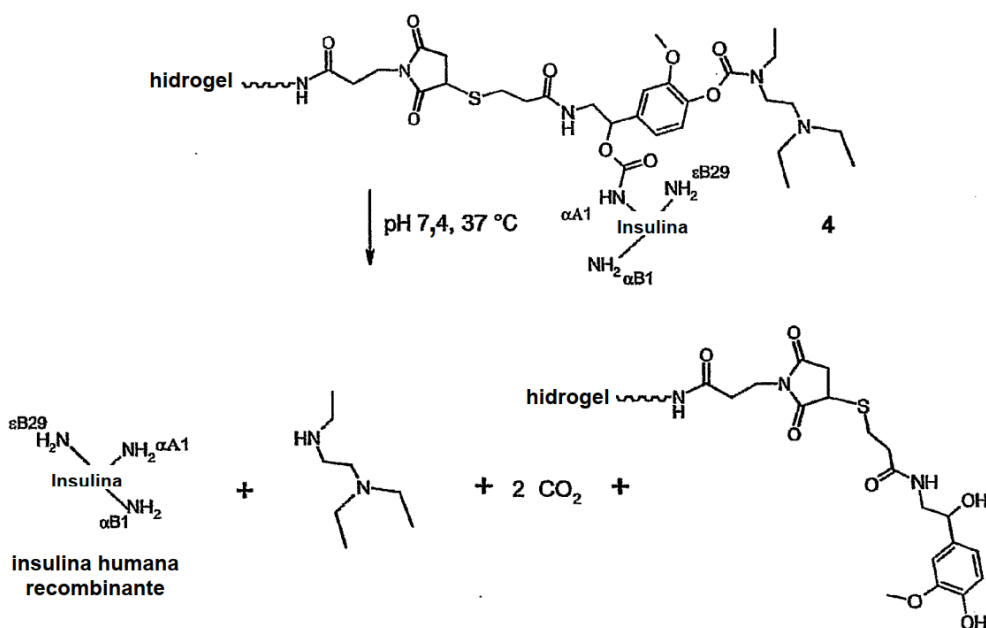
20 **Síntesis de hidrogel 4 y 5a,b de PEGA cargado con insulina humana recombinante**



5 El 2 y 3 se sintetizaron tal como se describe en la solicitud de patente de Reino Unido en trámite junto con la presente n.º 0415043.9. Se hicieron reaccionar 30 mg de resina 1b derivatizada de maleimida (carga de 15  $\mu$ mol/g, 450 nmol) con 3 mg del compuesto 2 (480 nmol, 1,06 equiv.) en 600  $\mu$ l de acetonitrilo/tampón de fosfato 50 mM (pH 7,4) a 20/80 (v/v) durante 10 min para dar el hidrogel 4 cargado con insulina humana recombinante. El hidrogel 4 se lavó 5 veces con acetonitrilo/agua a 50/50 (v/v) y tres veces con acetonitrilo y se secó al vacío.

La síntesis del hidrogel 5a o 5b mediante la reacción de 1 equivalente del compuesto 3 en relación con la cantidad teórica de grupos maleimida en el hidrogel con el hidrogel 1b o 1c, respectivamente, siguió el protocolo de síntesis anterior.

10 **Experimentos de liberación de insulina humana recombinante *in vitro* a partir del profármaco 4 de hidrogel mesoporoso no biodegradable**



Se pesaron 4 mg del 4 en un tubo de ensayo y se incubaron con 1.000  $\mu\text{l}$  de tampón de HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween al 0,005 % a 37 °C. Se tomaron muestras de 45  $\mu\text{l}$  a intervalos regulares y se analizaron cuantitativamente para determinar la insulina humana recombinante mediante un análisis de RP-HPLC. Se integró el pico de insulina humana recombinante y se obtuvo la concentración de insulina humana recombinante a partir de una curva típica. Se ajustó la cinética de liberación de primer orden a los puntos de datos para dar la semivida del conector y la liberación máxima de insulina humana recombinante en  $t = \infty$  (Figura 5).

La liberación de insulina humana recombinante del hidrogel 5a o 5b de PEGA se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

**10 Experimentos de liberación *in vivo* de insulina humana recombinante a partir de los profármacos 4 y 5a de hidrogel mesoporoso no biodegradable**

Los estudios *in vivo* se realizaron en el "Steinbeis-Transfer-Zentrum Biopharmazie und Analytik - Heidelberg" en ratas Wistar macho y hembra.

Las ratas que pesaban 200-300 g se mantuvieron en condiciones convencionales y se alimentaron *ad libitum*. Se tomaron muestras de sangre (150  $\mu\text{l}$ ) del plexo retroorbital y se administró por vía subcutánea una suspensión de hidrogel cargado con insulina humana recombinante en 300-400  $\mu\text{l}$  de PBS en la zona del muslo de las patas traseras. Se extrajo sangre en diferentes momentos después de la administración. Los animales se anestesiaron ligeramente con isoflurano inhalado durante todas las extracciones e inyecciones de sangre. Todas las muestras de sangre se tomaron en tubos que contenían EDTA y se centrifugaron. El plasma se separó y se almacenó a -18 °C hasta su análisis. La concentración de insulina humana recombinante se determinó a partir de muestras de plasma usando el kit ELISA de insulina humana de tipo no competitivo específico de la especie (Mercodia, Suecia). Los resultados se analizaron estadísticamente y las concentraciones de insulina humana recombinante en plasma se representaron gráficamente a lo largo del tiempo después de la administración (Figura 7).

Hidrogel	Volumen de muestra	Dosis de hidrogel/rata	Dosis de insulina humana recombinante total/rata (calculada a partir de la liberación <i>in vitro</i> )	N.º de ratas
5a	400 $\mu\text{l}$	9 mg	~26 nmol	3
4	300 $\mu\text{l}$	10,7 mg	~38 nmol	2

**25 Explantación del profármaco 5b de hidrogel mesoporoso administrado e investigación de la integridad de la insulina humana recombinante**

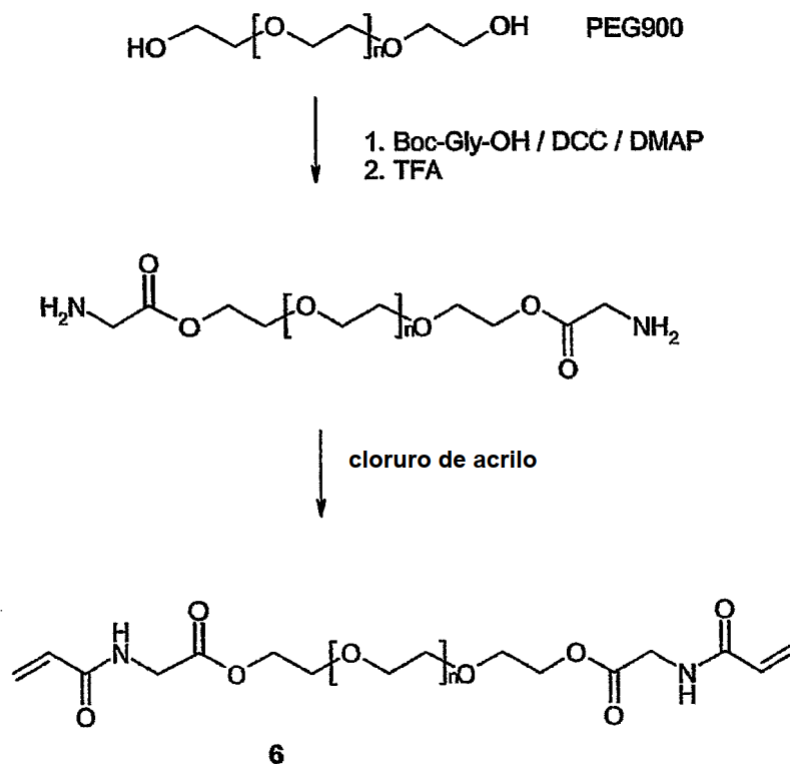
La administración de hidrogel, la toma de muestras de sangre y la determinación de la concentración de insulina humana recombinante siguieron el protocolo descrito anteriormente.

Muestra de hidrogel	Dosis de insulina humana recombinante total/rata (calculada a partir de la liberación <i>in vitro</i> )	Volumen de muestra	N.º de ratas	Dosis de hidrogel
<b>5b</b>	400 $\mu$ l	16 mg	~138 nmol	1

Después de 6 días, se sacrificó la rata. El hidrogel se explantó y se lavó 10 veces con agua, 10 veces con acetonitrilo/agua a 50/50 (v/v) y se secó al vacío. Se pesó aproximadamente 1 mg de hidrogel en un tubo de ensayo y se incubó con 400  $\mu$ l de tampón de HCl/Tris 100 mM a pH 9, a 37 °C. Después de 24 h, la solución se separó del hidrogel y se analizó para determinar la insulina humana recombinante y los productos de degradación enzimática de la misma mediante CL/EM (Figura 9). El pico fuerte en el tiempo de elución de 4,2 min se puede asignar a la insulina humana recombinante de acuerdo con el espectro de masas. Los picos más pequeños antes y después del pico de insulina humana recombinante corresponden a las cadenas A y B de la insulina recombinante humana, respectivamente. No se detectaron productos de degradación relacionados con la insulina humana recombinante. También se detectaron las cadenas A y B en experimentos de liberación *in vitro* a pH 9 y, por tanto, no indican degradación enzimática.

Síntesis de hidrogel 8 mesoporoso reactivo biodegradable

Síntesis de macromonómero bis-acril-glicil-PEG900 (6)



Se disolvieron 10 g de PEG900 (11,1 mmol) en 50 ml de DCM y la solución se enfrió hasta 0 °C. Una solución de 3,9 g (23,3 mmol) de boc-glicina, 5,67 g (46,6 mmol) de DMAP y 950 mg de DCC (4,6 mmol) en 50 ml de DCM se añadió y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El subproducto sólido dicitclohexil urea se separó por filtración y el filtrado se lavó dos veces con HCl 1 M y dos veces con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío hasta aproximadamente 50 ml. Se añadieron 50 ml de TFA a 0 °C y la solución se agitó

a temperatura ambiente durante 30 min para retirar los grupos protectores boc. El disolvente se retiró a presión reducida y el aceite resultante se volvió a disolver en 50 ml de DCM. Se añadieron 5 ml de HCl 2 M en éter de dietilo y el producto se precipitó mediante la adición de 400 ml de éter de dietilo y se recogió mediante centrifugación. El aceite resultante se disolvió en 100 ml de HCl acuoso 0,1 M y se liofilizó (rendimiento: 9,5 g). CL/EM:

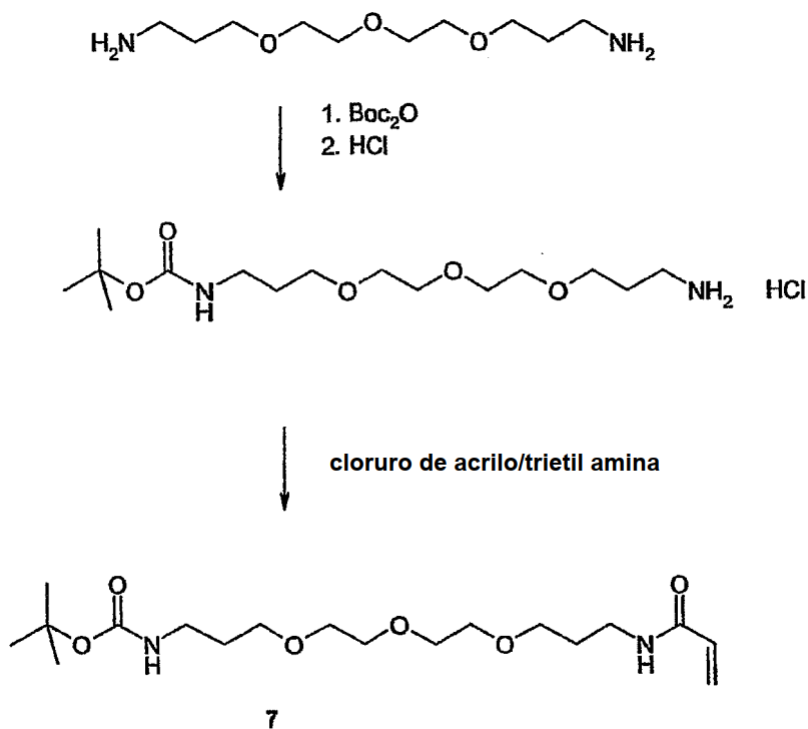
5  $[M+H]^+ = 882,3, 926,4, 970,4, 1.014,4, 1.058,4, 1.102,5, 1.146,6$  (PM de +H calculado =  $1.014,2 \pm x*44,05$  g/mol)

Se disolvieron 1,4 g de bis-glicil-PEG900 en 15 ml de DCM y se añadieron 750  $\mu$ l (5,32 mmol) de trietilamina y 220  $\mu$ l (2,66 mmol) de cloruro de acrílo a 0 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron 35 ml de DCM. La fase orgánica se lavó con HCl acuoso 1 M y 5 veces con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida hasta aproximadamente 10 ml. El producto **6** se precipitó mediante la adición de 60 ml de éter de dietilo/heptano a 1/1 (v/v) y se recogió mediante centrifugación (rendimiento de 1,05 g). CL/EM:

10

$[M+Na]^+ = 1.012,0, 1.056,6, 1.100,5, 1.144,5, 1.188,6, 1.232,5, 1.275,6, 1.319,7$   
(PM de +Na calculado =  $11.442 \pm x*44,05$  g/mol)

#### Síntesis de N-boc, N'-acrilóil-4,7,10-trioxatridecano-1,13-diamina



15

Se disolvieron 2 g (9,1 mmol) de 4,7,10-trioxatridecano-1,13-diamina en 15 ml de DCM y se añadió gota a gota 1 g (4,6 mmol) de di-*terc*-butil-dicarbonato en 10 ml de DCM a 0 °C. La solución se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y la fase orgánica se lavó cinco veces con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida hasta aproximadamente 10 ml. Se precipitó mono-boc-4,7,10-trioxatridecano-1,13-diamina como sal de clorhidrato mediante la adición de HCl 2 M en éter de dietilo (rendimiento: 1,1 g, 3,1 mmol, 67 %).

20

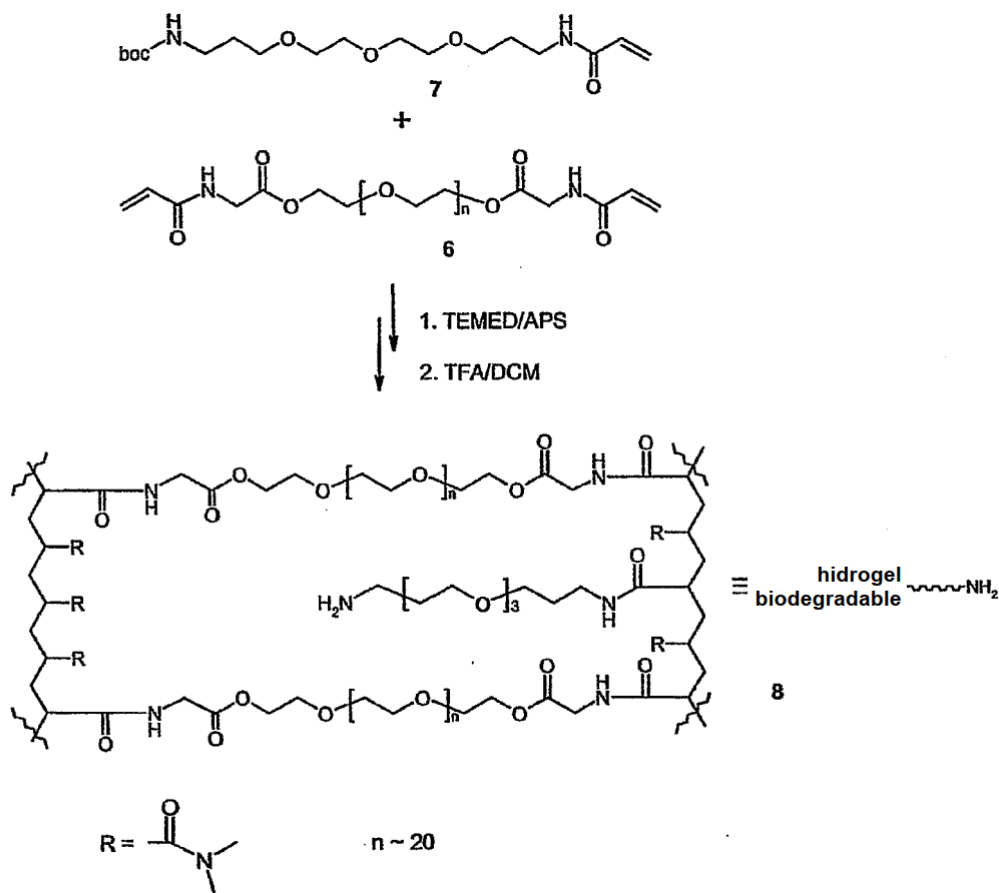
Se disolvieron 1,1 g (3,1 mmol) de mono-boc-4,7,10-trioxatridecano-1,13-diamina en 10 ml de DCM y se añadieron 900  $\mu$ l (6,2 mmol) de trietilamina. La mezcla se enfrió hasta 0 °C y se añadieron gota a gota 260  $\mu$ l (3,2 mmol) de cloruro de acrílo en 10 ml de DCM. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y la fase orgánica se lavó dos veces con HCl acuoso 0,1 M. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró hasta 7 ml a presión reducida. El producto **7** se precipitó mediante la adición de 50 ml de éter de dietilo/heptano a 1/1 (v/v) y se recogió mediante centrifugación.

25

(Rendimiento: 940 mg, 2,5 mmol, 78 %).  
CL/EM:  $[M+Na]^+ = 398,1$  (PM de +Na calculado = 397,4 g/mol)

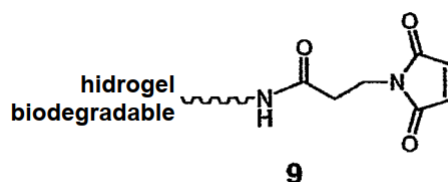
#### Formación de hidrogel mesoporoso reactivo biodegradable





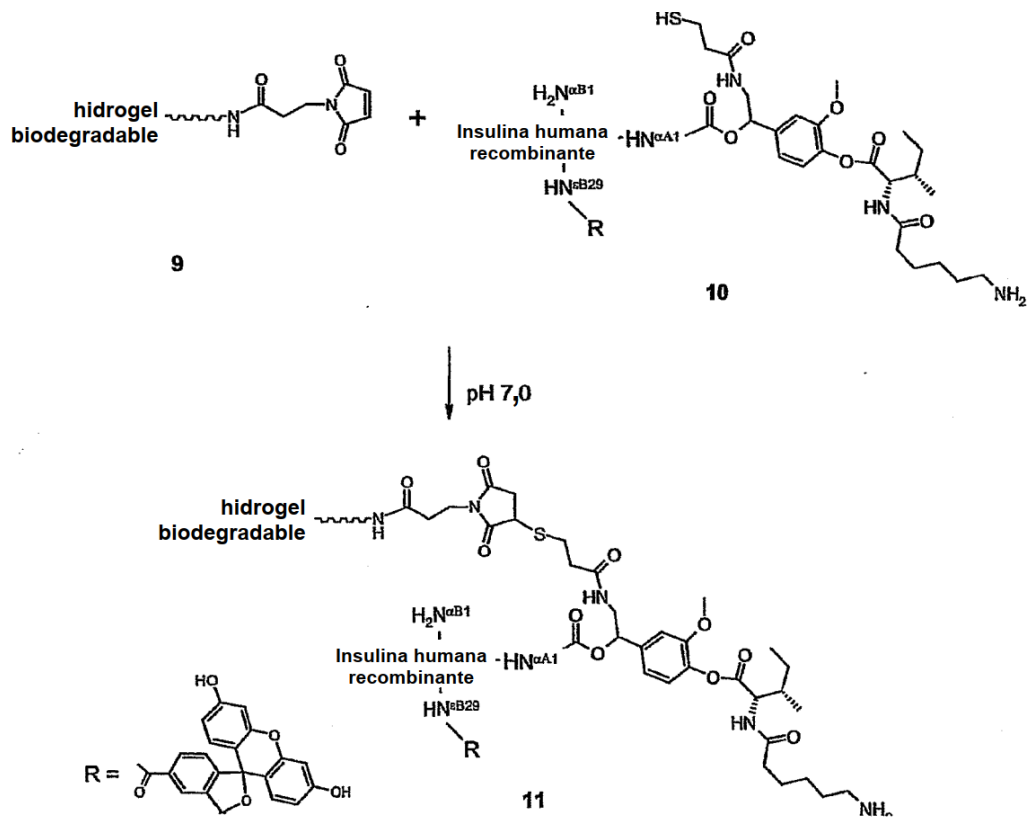
Se disolvieron 100 mg (100  $\mu\text{mol}$ ) del compuesto 6, 6 mg (15  $\mu\text{mol}$ ) del compuesto 7 y 21 mg (212  $\mu\text{mol}$ ) de N,N-dimetilacrilamida en 500  $\mu\text{l}$  de tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0) en un tubo de ensayo. Después de la adición de 30  $\mu\text{l}$  de peroxodisulfato de amonio 1 M (APS), la solución se agitó vorticialmente y la polimerización se inició mediante la adición de 80  $\mu\text{l}$  de N,N,N',N'-tetrametilendiamina 2 M (TEMED)/HCl, a pH 7,0. El hidrogel formado espontáneamente se incubó durante 30 min adicionales, se trituró en partículas de <1 mm y se transfirió a una jeringa equipada con una frita de polipropileno. Después del lavado profundo del hidrogel con agua, DMF y DCM (5 veces cada uno), los grupos protectores boc se escindieron mediante la incubación con TFA/DCM a 50/50 (v/v) durante 10 min. Finalmente, el hidrogel 8 se lavó cinco veces con DCM, cinco veces con DMF, una vez con DIEA/DMF a 1/99 (v/v) y cinco veces con DMF.

#### Síntesis de hidrogel 9 mesoporoso basado en poli(acrilamida) biodegradable derivatizado de maleimida



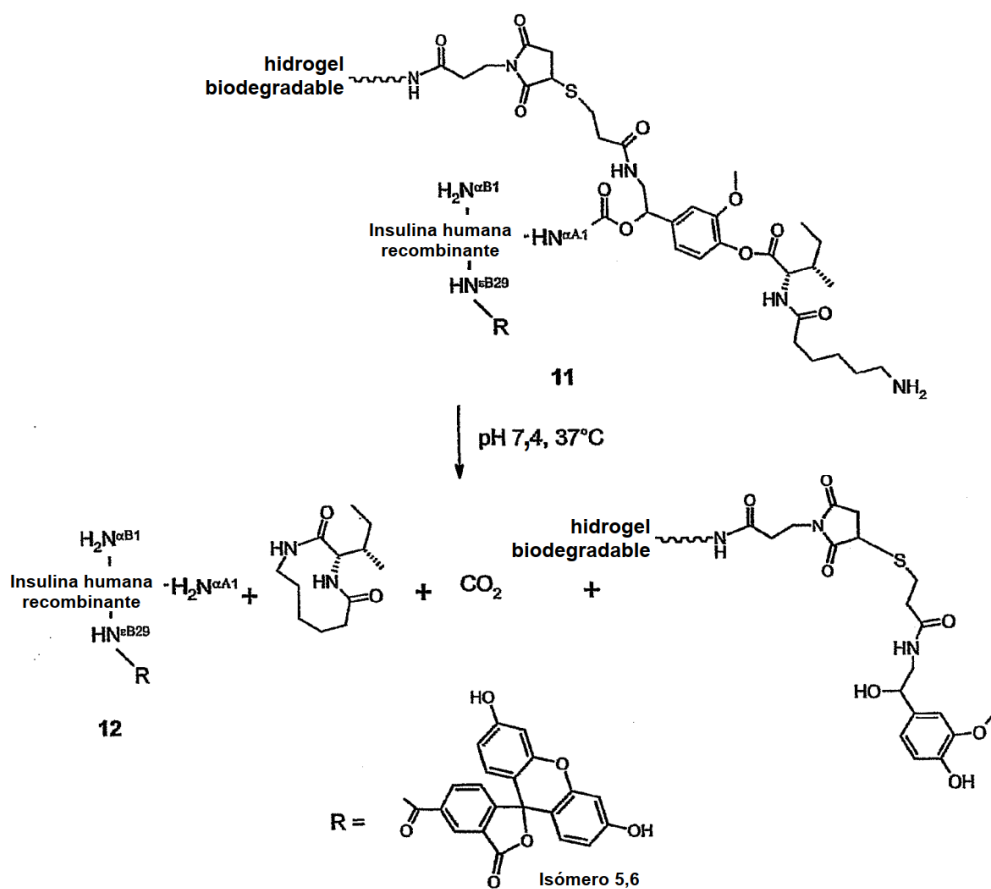
Se pesaron 100 mg del hidrogel 8 biodegradable triturado en una jeringa equipada con una frita de polipropileno. La derivatización de maleimida se logró mediante acilación con 101 mg (0,6 mmol) de ácido maleimidopropiónico y 94  $\mu\text{l}$  (0,6 mmol) de DIC en 2 ml de DMF durante 30 min para dar el hidrogel 9 derivatizado de maleimida. El hidrogel se lavó 10 veces con DMF y DCM.

#### Síntesis de profármaco 11 de hidrogel mesoporoso basado en poli(acrilamida) biodegradable cargado con fluoresceína-carboxamido-Lys(B29)-insulina humana recombinante



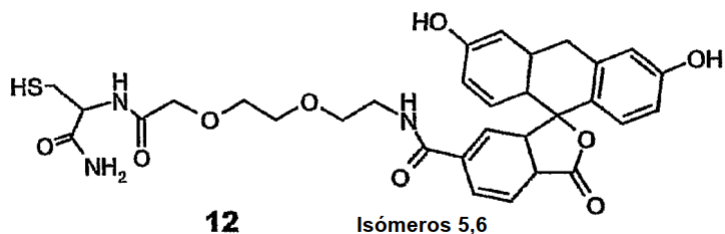
5 El compuesto 10 se sintetizó tal como se describe en la solicitud de patente de Reino Unido en trámite junto con la presente n.º 0415043.9, cuya divulgación se incorpora a modo de referencia. Se disolvieron 0,25 mg del compuesto **10** (35 nmol) en 100  $\mu$ l de acetonitrilo/agua/tampón de fosfato 0,5 M a 40/40/20 (v/v/v) a pH 7,0. La solución se incubó durante 3 min con 5,6 mg del hidrogel **9** biodegradable derivatizado de maleimida para dar el hidrogel **11** cargado con fluoresceína-carboxamido-Lys(B29)-insulina humana recombinante. El hidrogel **11** se lavó cinco veces con acetonitrilo/agua a 50/50 (v/v) y tres veces con acetonitrilo y se secó al vacío.

Experimentos de liberación de fluoresceína-carboxamido-Lys(B29)-insulina humana recombinante *in vitro* a partir del profármaco **11** de hidrogel mesoporoso basado en poliacrilamida biodegradable



El hidrogel **11** biodegradable cargado con fluoresceína-carboxamido-Lys(B29)-insulina humana recombinante se incubó en 100  $\mu\text{l}$  de tampón de HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y Tween al 0,005 % a 37  $^\circ\text{C}$ . Se tomaron muestras de 80  $\mu\text{l}$  a intervalos regulares y se analizaron cuantitativamente para determinar la fluoresceína-carboxamido-Lys(B29)-insulina humana recombinante mediante un análisis de RP-HPLC. Se ajustó la cinética de liberación de primer orden a los puntos de datos para dar la semivida del conector de profármaco y la concentración máxima de fluoresceína-carboxamido-Lys(B29)-insulina humana recombinante en  $t = \infty$  (Figura 8). La integridad de la fluoresceína-carboxamido-Lys(B29)-insulina humana recombinante **12** liberada se confirmó mediante RP-LCMS y SEC (datos no mostrados).

10 Síntesis del compuesto 12 marcado con fluoresceína



Se pesaron 0,3 g de resina de amida Sieber (carga de 0,5 mmol/g) en una jeringa equipada con una frita de polipropileno. La retirada de Fmoc se logró mediante la incubación en piperidina/DBU/DMF a 2/2/96 (v/v/v) durante 10 min y la resina se lavó 5 veces con DMF. La resina se incubó durante 1 h con 264 mg (0,45 mmol) de Fmoc-Cys(Trt)-OH, 144 mg (0,45 mmol) de TBTU y 157  $\mu\text{l}$  de DIEA (0,9 mmol) en 3 ml de DMF y se lavó 5 veces con DMF. Después de la retirada de Fmoc, se acopló Fmoc-Ado-OH mediante la incubación de 156 mg (0,45 mmol) de Fmoc-Ado-OH, 173 mg (0,45 mmol) de TBTU y 157  $\mu\text{l}$  de DIEA (0,9 mmol) en 3 ml de DMF de acuerdo con el procedimiento anterior. Se retiró Fmoc y la resina se hizo reaccionar con 338 mg (0,9 mmol) de 5,6-carboxifluoresceína (mezcla



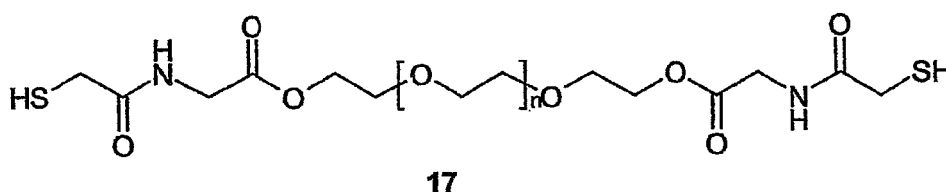
**Síntesis de profármaco 16 de hidrogel mesoporoso basado en carbohidrato cargado con insulina humana recombinante y liberación *in vitro***

Se adquirieron perlas de hidrogel "Sepharose 4 Fast Flow" activadas con NHS (agarosa reticulada químicamente y epíclorhidrina de reticulante) a través de Amersham.

- 5 Se pesaron 1,5 g de hidrogel Sepharose humedecido con etanol (150 mg de hidrogel seco) en una jeringa equipada con una frita de polipropileno y se hicieron reaccionar con 4,7,10-trioxatridecano-1,13-diamina 1 M en DMF durante 30 min. Después de 5 etapas de lavado con DMF, el hidrogel se hizo reaccionar con 8,5 mg (0,05 mmol) de ácido 3-maleimidopropiónico, 57  $\mu$ l (0,95 mmol) de ácido acético, 151 mg (1 mmol) de HOBt y 158  $\mu$ l (1 mmol) de DIC en 4 ml de DMF durante 30 min para dar el hidrogel 15 derivatizado de maleimida. El hidrogel 15 se lavó 10 veces con DMF y, finalmente, con acetonitrilo.

Se disolvieron 1.5 mg del 3 en acetonitrilo/tampón de fosfato 50 mM a 25/75 (v/v) a pH 7,4 y se hicieron reaccionar con 10,8 mg del hidrogel 15 derivatizado de maleimida durante 10 min. El hidrogel **16** cargado con insulina humana recombinante se lavó cinco veces con acetonitrilo/agua a 50/50 (v/v) y tres veces con acetonitrilo y se secó al vacío.

- 15 Se suspendieron 2 mg del hidrogel **16** cargado con insulina humana recombinante en 1.000  $\mu$ l de tampón de HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y Tween al 0,005 % y se incubaron a 37 °C. Se tomaron muestras de 60  $\mu$ l a intervalos regulares y se analizaron cuantitativamente para determinar la insulina humana recombinante mediante un análisis de RP-HPLC. Se ajustó la cinética de liberación de primer orden a los puntos de datos para dar la semivida del conector de profármaco y la liberación máxima de insulina humana recombinante en  $t = \infty$  (Figura 6). La integridad de la insulina humana recombinante liberada se confirmó mediante CL-EM (datos no mostrados).

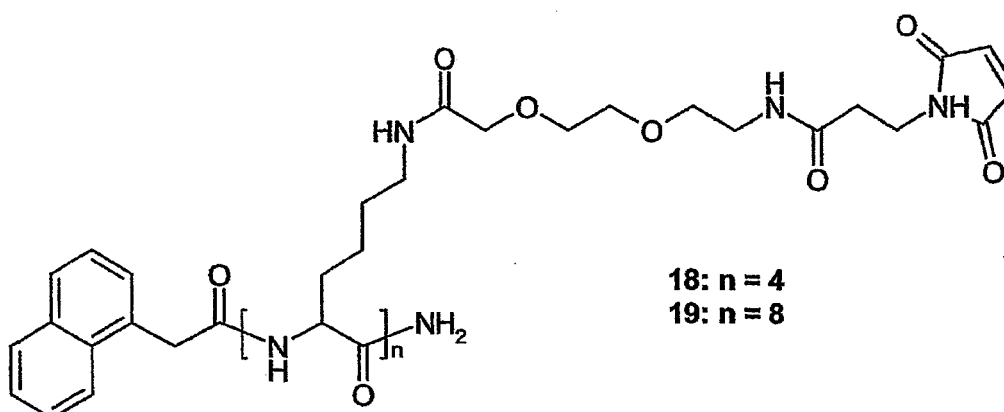
**20 Síntesis de hidrogel 20 y 21 mesoporoso biodegradable**Síntesis de bis-mercaptoacetil-glicil-PEG900 (17)

- 25 Se disolvió 1 g (0,92 mmol) de bis-glicil-PEG900 x 2HCl en 7 ml de DMF y se añadieron 600 mg (2 mmol) de éster de SAMA-OPfp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 min. SE añadieron 200  $\mu$ l de hidrato de hidrazina y la mezcla se agitó durante 5 min a temperatura ambiente para retirar el grupo acetilo. Después de la adición de 400  $\mu$ l de ácido acético, el producto 17 se purificó mediante RP-HPLC y se liofilizó (rendimiento de 740 mg).

CL/EM:

$[M+H]^+ = 1.030,2; 1.074,2; 11.183; 1.162,2; 1.206,3; 1.250,3; 1.294,4; 1.338,4$

(PM de +H calculado = 1.161,4 +/- x\*44,05 g/mol)

**30 Síntesis de 1-naftilacetil-tetra-Lys(Ado-mp)-amida (18) y 1-naftilacetil-octa-Lys(Ado-mp)-amida (19)**

Se sintetizó la **18** mediante síntesis orgánica en fase sólida convencional usando la activación de TBTU/DIEA, tal como se describe para el compuesto **12**.

A 1 g de resina de amida TentaGel Sieber (carga de 0,17 mmol/g) se le acopló cuatro veces Fmoc-Lys(ivDde)-OH y ácido 1-naftil acético mediante la activación de TBTU/DIEA usando 3 equivalentes de aminoácido en relación con los grupos amino libres en el resina. A fin de retirar el grupo protector ivDde, la resina se incubó tres veces con hidrazina al 4 % en DMF durante 7 min. Después del lavado de la resina con DMF, se acopló Fmoc-Ado-OH a los grupos amino mediante la activación de TBTU/DIEA. El ácido 3-maleimidopropiónico se acopló mediante la activación de DIC usando 3 equivalentes de ácido 3-maleimidopropiónico en relación con los grupos amino libres en la resina. El compuesto **18** se escindió a partir de la resina mediante la incubación con DCM/trietilsilano/TFA a 94/3/3 (v/v/v) durante 60 min. Después de la evaporación del disolvente, se purificó la **18** mediante RP-HPLC y se liofilizó.

La **19** se sintetizó tal como se ha descrito anteriormente mediante el acoplamiento de ocho residuos de Fmoc-Lys(ivDde)-OH en lugar de cuatro residuos.

CL/EM:

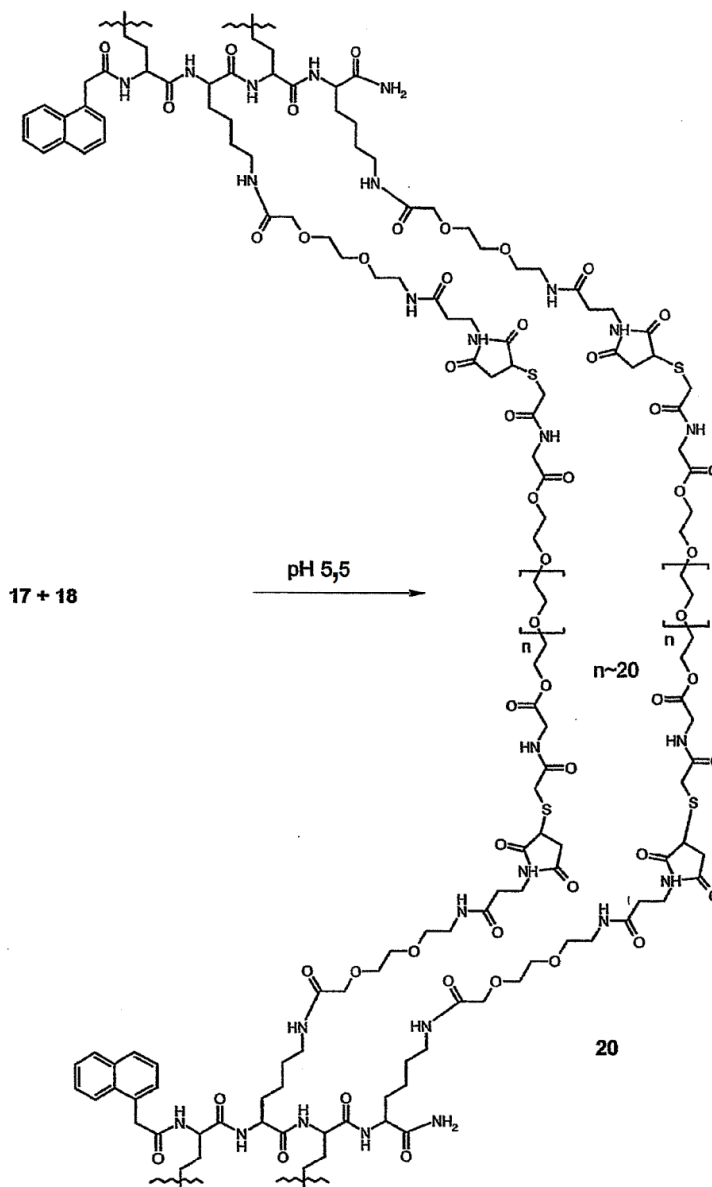
n = 4:

15  $[M+H]^+ = 1.883,9$ ;  $[M+Na]^+ = 1.905,2$  (PM calculado = 1.879,1 g/mol)

n = 8:

$[M+2Na]^{2+} = 1.812$ ;  $[M+H-Na]^+ = 1.800$ ;  $[M+2H]^{2+} = 1.790$  (PM calculado = 3.573,0 g/mol)

Formación de hidrogel **20** y **21** biodegradables

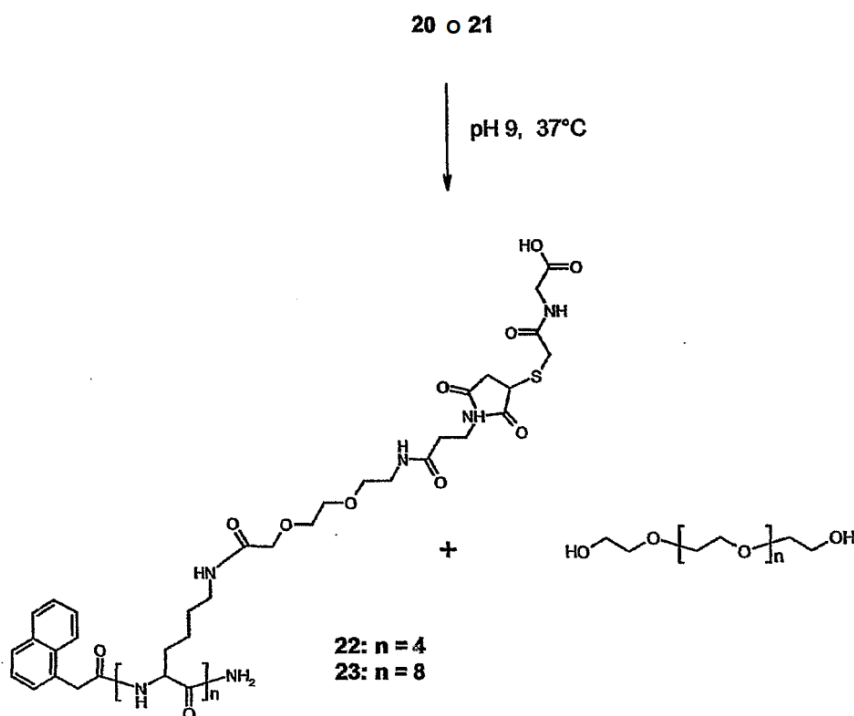


Se disolvieron 23,2 mg (20  $\mu$ mol) del **17** y 18,8 mg (10  $\mu$ mol) de la **18** en 150  $\mu$ l de agua y se añadieron 50  $\mu$ l de tampón de acetato de sodio 0,5 M a pH 5,5. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 60 min.

5 El hidrogel **20** resultante se trituró en partículas de <1 mm y se transfirió a una jeringa equipada con una frita de polipropileno. Las partículas de hidrogel se lavaron cinco veces cada una con acetonitrilo/agua a 1/1, agua y metanol y, a continuación, se secaron al vacío.

El hidrogel **21** se sintetizó tal como se ha descrito anteriormente usando 23,3 mg (20  $\mu$ mol) del **17** y 17,9 mg (5  $\mu$ mol) de la **19**.

Estudio de degradación



10 Se realizaron experimentos de degradación de hidrogel a pH 9 para reducir el tiempo de degradación. El tiempo de degradación a un pH fisiológico de 7,4 se estimó mediante un factor de escala 40 que significa que la concentración de iones de hidróxido a un pH 9 es ~40 veces mayor en comparación con el pH 7,4.

15 Se suspendieron 50 mg de hidrogel **20** o **21** en 1 ml de tampón de borato de sodio 50 mM (pH 9,0), NaCl 150 mM y Tween al 0,005 % y se incubaron a 37 °C. Se tomaron muestras de 30  $\mu$ l a intervalos regulares y se analizaron cuantitativamente para determinar el naftilo **22** o **23** acoplado a la cadena principal de polímero mediante fotometría a 280 nm (Figura 10). La cinética de degradación muestra una curva sigmoidea.

Abreviaturas:

Ado	8-amino-3,6-dioxa-octanoílo
Boc	t-butiloxicarbonilo
DBU	13-diazabicyclo[5.4.0]undeceno
DCM	diclorometano
(iv)Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohexiliden)3-metil-butilo
DIC	diisopropilcarbodiimida
DIEA	diisopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformamida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Fmoc-Ado-OH	ácido fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico
HEPES	ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
CL-EM	cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas

mp	3-maleimidopropionilo
EM	espectro de masas
PM	masa molecular
PEG	poli(etilen glicol)
RP-HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa
TA	temperatura ambiente
SAMA-OPfp	éster de pentafluorofenilo de ácido S-acetil-mercaptoacético
SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
TES	triethylsilano
TFA	ácido trifluoroacético



## REIVINDICACIONES

1. Método para la fabricación de un profármaco polimérico en forma de un conjugado de hidrogel-fármaco que comprende el hidrogel, el fármaco y un conector de profármaco reversible, en donde el hidrogel está reticulado, con un tamaño de poro de una fracción sustancial de poros mayor de 1 nm y menor de 100 nm en estado hidratado, en donde el tamaño promedio del poro del hidrogel es mayor que el diámetro del fármaco, en donde el hidrogel es un artículo conformado en forma de perlas blandas de material microparticulado que tienen un diámetro de entre 1 y 500  $\mu\text{m}$  y en donde el hidrogel comprende enlaces biodegradables seleccionados del grupo de enlaces escindibles químicamente que consisten en enlaces de fosfato, fosfonato, carbonato, carbamato, disulfuro y éster, en donde la conexión entre el conector de profármaco y el fármaco es reversible y en donde, después de la escisión del conector, el fármaco se libera en forma no modificada y en donde el fármaco es un pequeño agente bioactivo orgánico, comprendiendo el método

- una primera etapa de sintetización del hidrogel; seguida de
- una etapa de relación covalente del conector de profármaco reversible con el hidrogel; y
- una etapa de conjugación covalente del fármaco con el conector de profármaco reversible;

en donde las últimas etapas se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el conector de profármaco reversible tiene dos grupos funcionales, siendo el primero de los dos grupos funcionales para la unión del conector de profármaco reversible al hidrogel y siendo el segundo de los dos grupos funcionales para la conjugación con el fármaco.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el primero de los dos grupos funcionales se selecciona del grupo de grupos funcionales que consiste en ácido carboxílico, amino, maleimida, tiol, ácido sulfónico, carbonato, carbamato, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico, ácido fosfónico, haloacetilo, haluros de alquilo, acrilóilo y otros aceptores de Michael alfa-beta insaturados, agentes de arilación, hidroxilamina, disulfuros, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, epóxido, oxirano y aziridina.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el primero de los dos grupos funcionales se selecciona del grupo de grupos funcionales que consiste en tiol, maleimida, amino, ácido carboxílico, carbonato, carbamato, aldehído y haloacetilo.

5. El método de la reivindicación 2, en donde el segundo de los dos grupos funcionales se selecciona del grupo de grupos funcionales que consiste en grupos ácido carboxílico, carbonato, hidroxilo, hidrazina, hidroxilamina, ácido maleámico, cetona, amino, aldehído, tiol y disulfuro.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el fármaco tiene un grupo funcional seleccionado del grupo de grupos funcionales que consiste en tiol, ácido carboxílico, amino, hidroxilo, cetona e imidazol.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el hidrogel se sintetiza a partir del grupo de polímeros que consiste en polímeros basados en polialquilo, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, alginato, xilano, manano, carragenano, agarosa, celulosa, almidón, almidón de hidroxietilo (HES en inglés) y otros polímeros basados en carbohidrato, poli(alcoholes vinílicos), poli(oxazolininas), poli(anhídridos), poli(orto ésteres), poli(carbonatos), poli(uretanos), poli(ácidos acrílicos), poli(acrilamidas), poli(acrilatos), poli(metacrilatos), poli(siloxanos), poli(vinilpirrolidona), poli(cianoacrilatos), poli(ésteres), poli(iminocarbonatos), poli(aminoácidos), colágeno y gelatina.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el hidrogel se funcionaliza con un grupo funcional seleccionado del grupo de grupos funcionales reactivos que consiste en ácido carboxílico, amino, maleimida, tiol, ácido sulfónico, carbonato, carbamato, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico, ácido fosfónico, haloacetilo, haluros de alquilo, acrilóilo y otros aceptores de Michael alfa-beta insaturados, agentes de arilación, hidroxilamina, disulfuros, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, epóxido, oxirano y aziridina.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el hidrogel se funcionaliza con un grupo funcional seleccionado del grupo de grupos funcionales que consiste en tiol, maleimida, amino, ácido carboxílico, carbonato, carbamato, aldehído y haloacetilo.

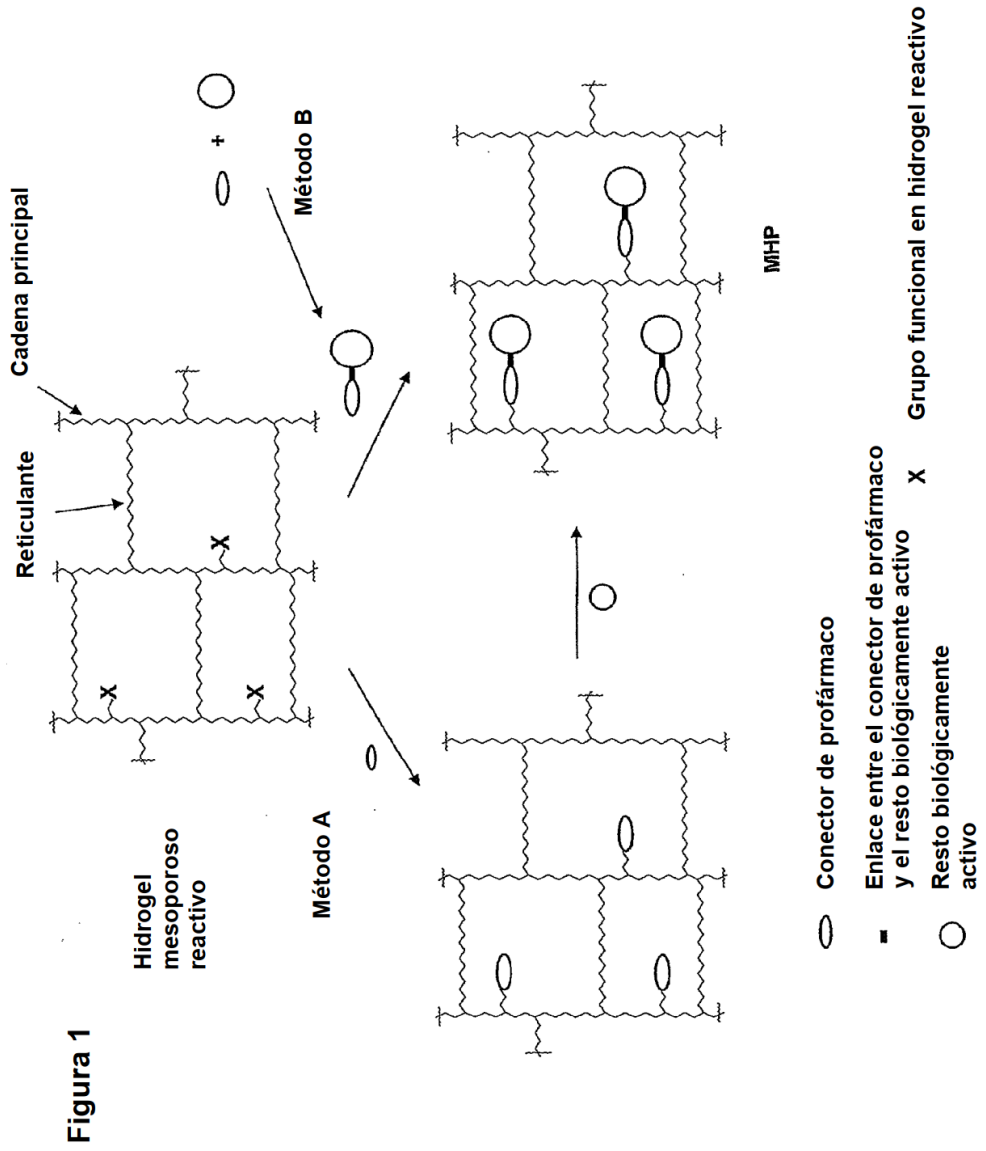


Figura 2

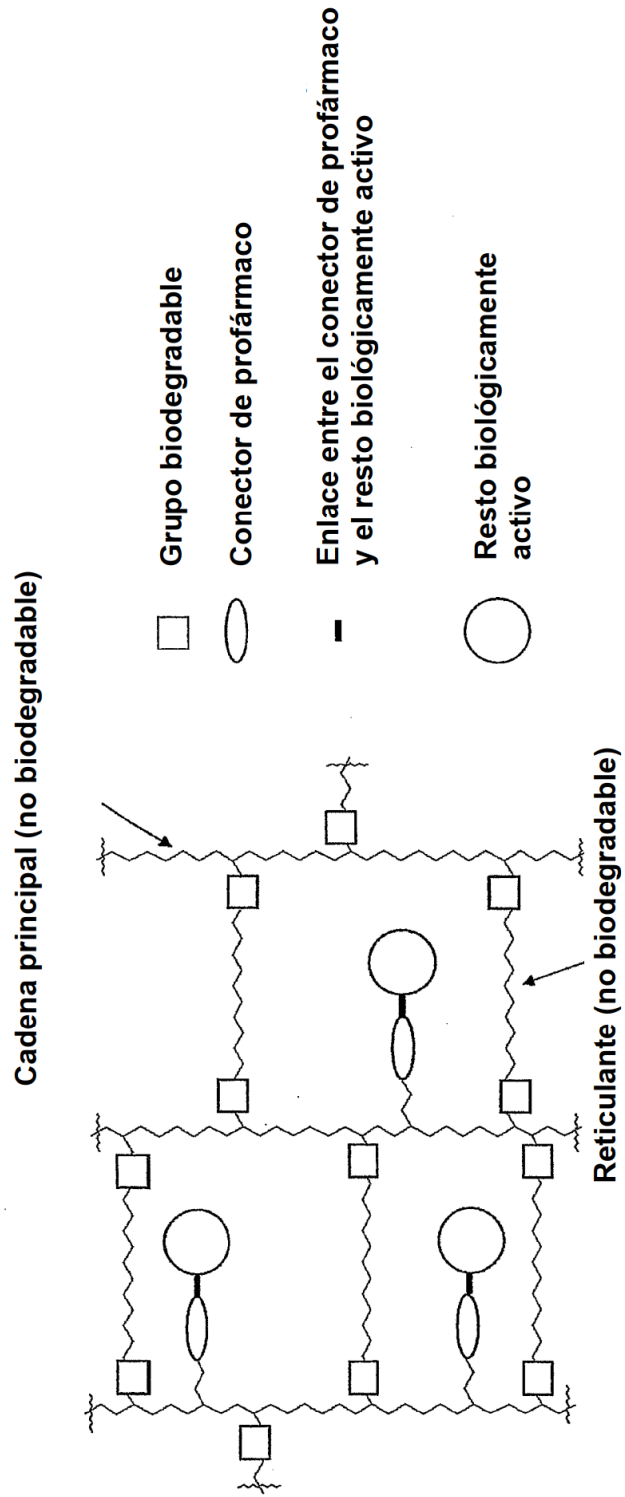
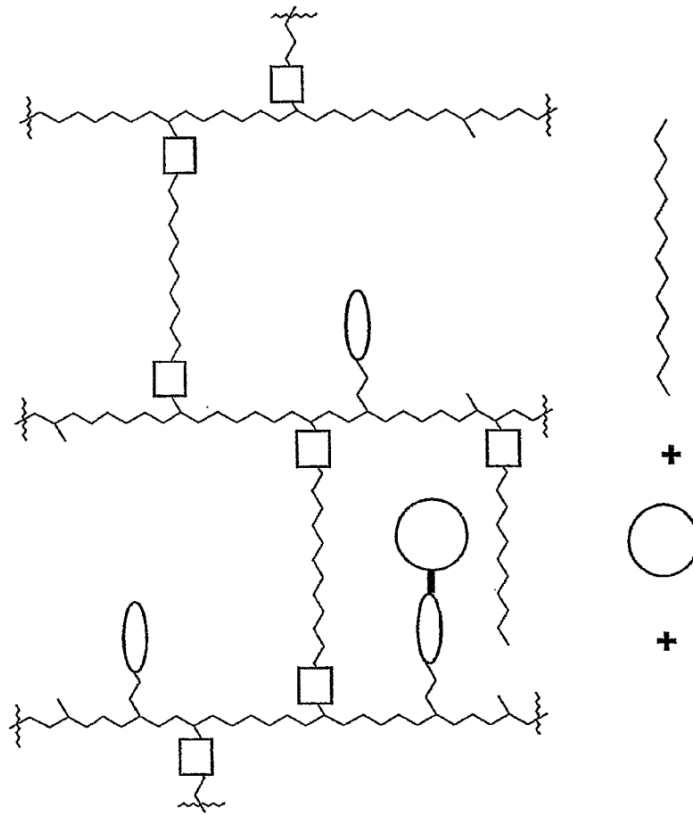
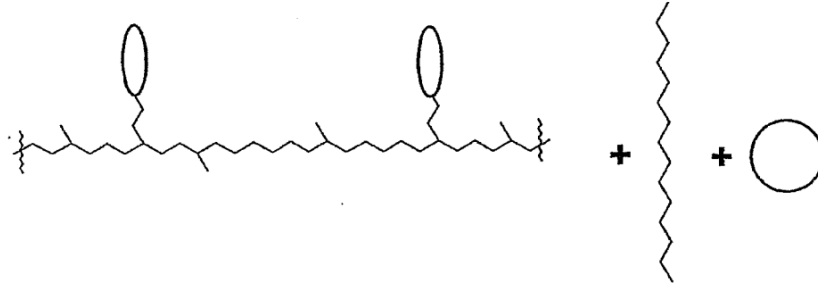


Figura 3

a) MHP parcialmente degradado

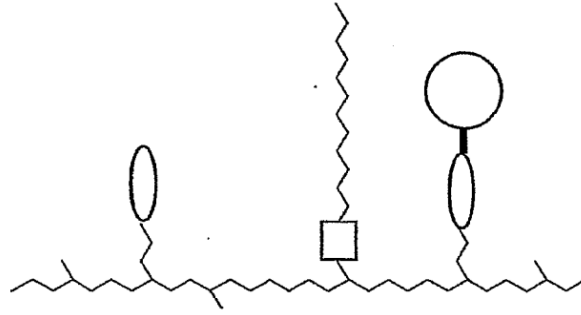


b) MHP completamente degradado



(se usan los mismos símbolos que en la Figura 2)

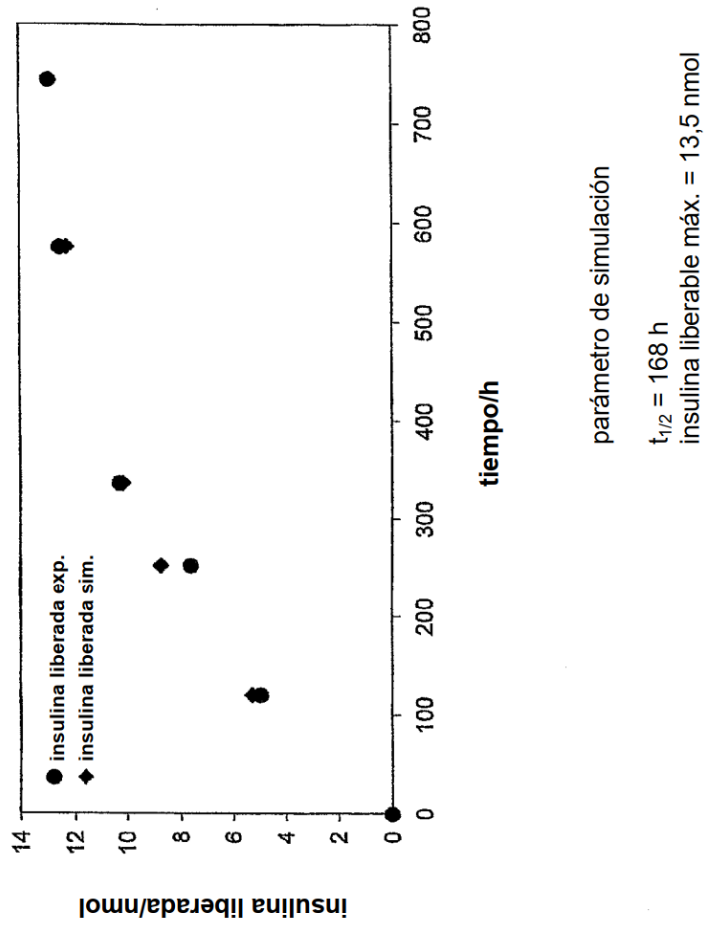
**Figura 4**



**(se usan los mismos símbolos que en la Figura 2)**

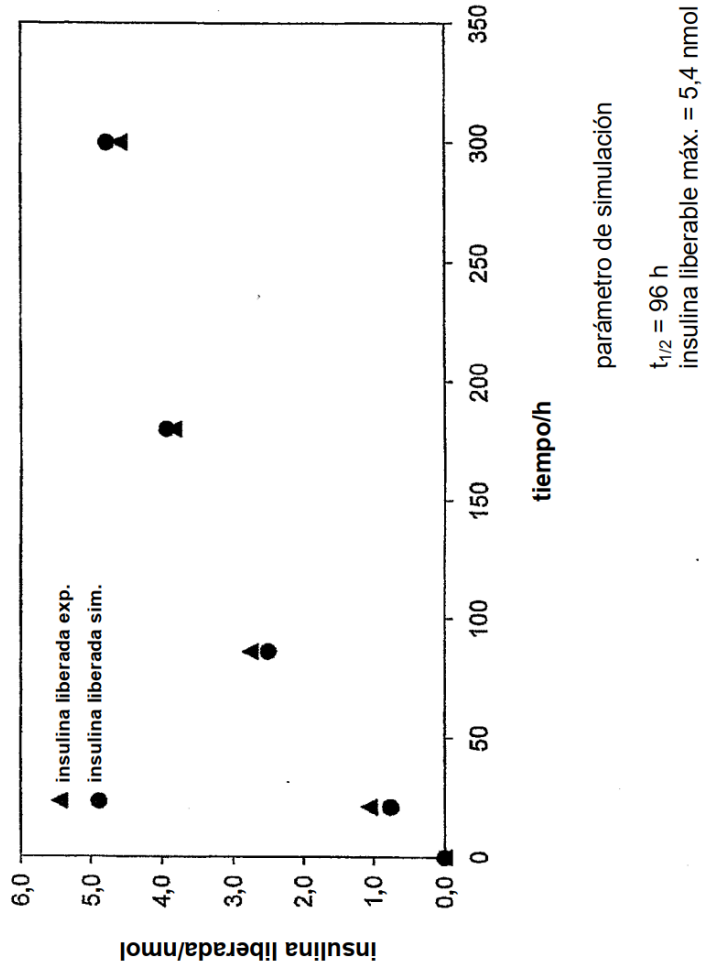
**Figura 5**

Liberación de insulina a partir de profármaco **4** de hidrogel mesoporoso basado en poliacrilamida



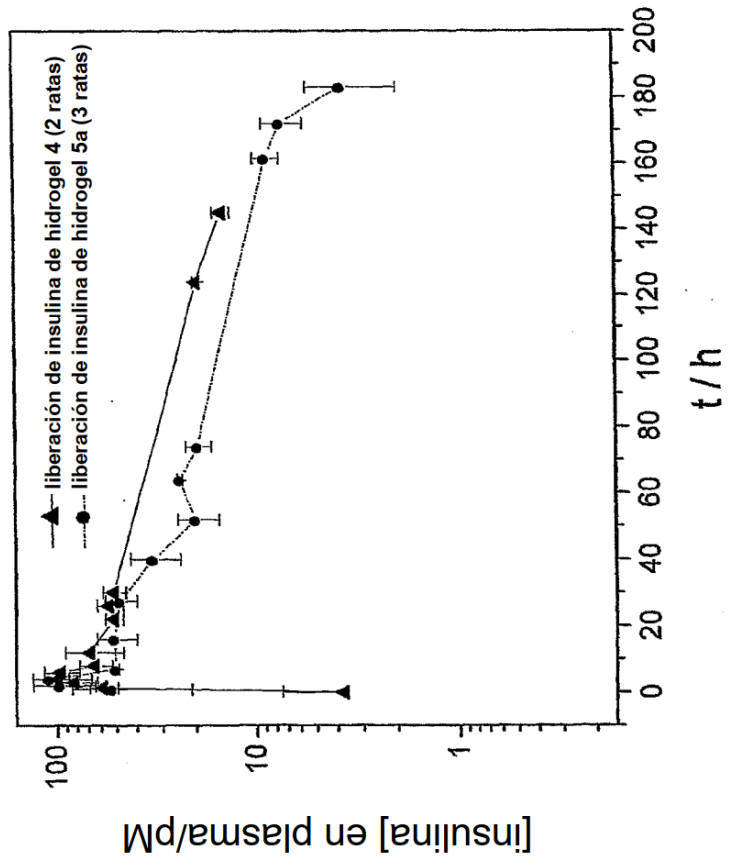
**Figura 6**

Liberación de insulina a partir de profármaco **16** de hidrogel mesoporoso basado en carbohidrato



**Figura 7**

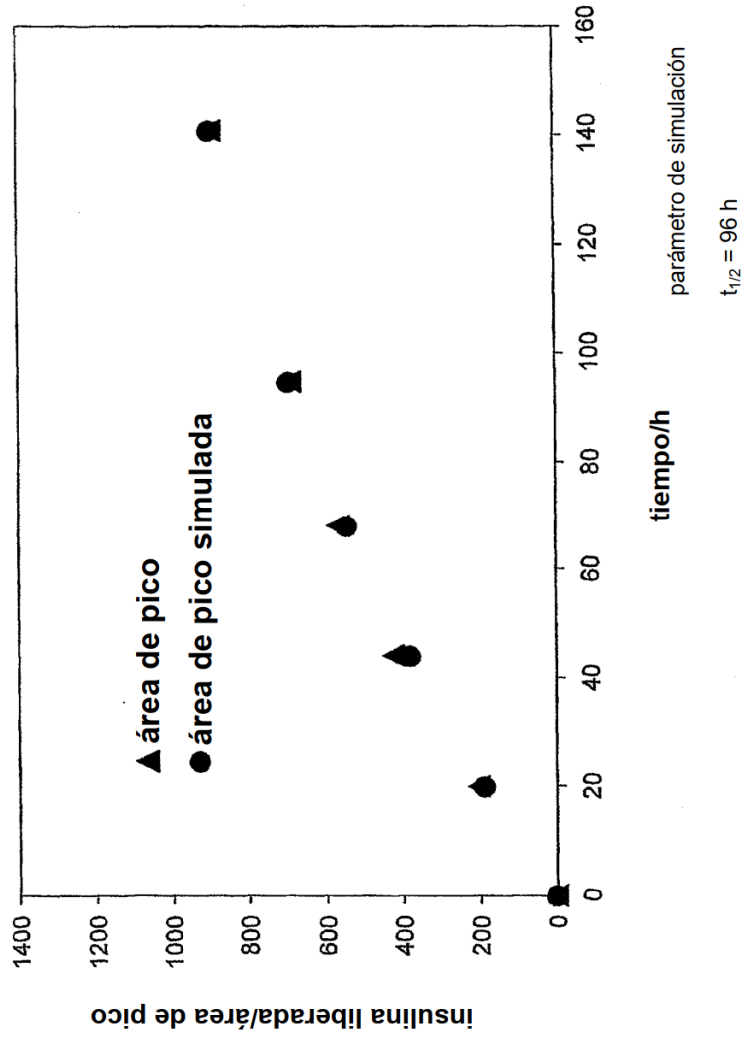
Lib liberación de insulina humana recombinante *in vivo* a partir de profármaco **4** y **5a** de hidrogel mesoporoso basado en poliacrilamida





**Figura 8**

Liberación de insulina a partir de profármaco **11** de hidrogel mesoporoso basado en poli(acrilamida biodegradable)



**Figura 9**

Caracterización de CL-EM de la integridad de la insulina humana recombinante enlazada a hidrogel tras la incubación *in vivo* durante 6 días

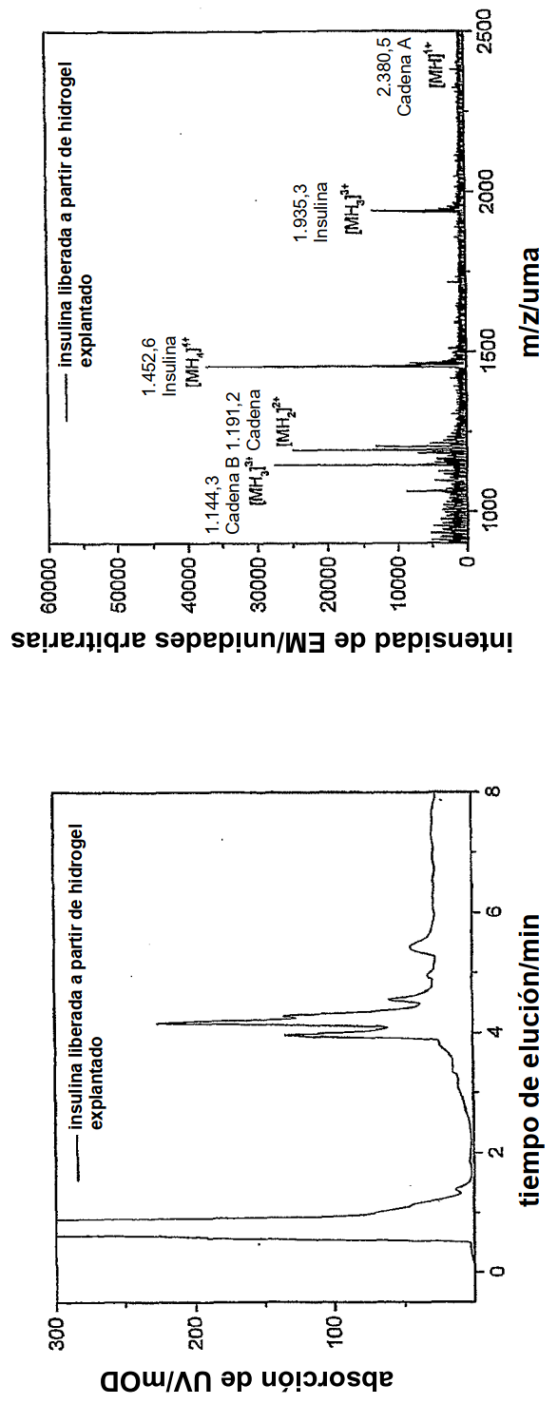


Figura 10

Degradación de hidrogel **20** (4 reticulaciones) y **21** (8 reticulaciones) biodegradables

