

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 416**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08G 73/02 (2006.01)

C08G 73/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.1999 E 06024721 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 1764112**

54 Título: **Métodos para preparar copolímeros de ciclodextrina lineales**

30 Prioridad:

01.07.1998 US 91550 P

02.12.1998 US 203556

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

17.05.2013

73 Titular/es:

**CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
1200 EAST CALIFORNIA BOULEVARD, MAIL
CODE 201-85
PASADENA, CA 91125, US**

72 Inventor/es:

**DAVIS, MARK E.;
GONZALES, HECTOR y
HWANG, SUSIE (SUE JEAN)**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 403 416 T3

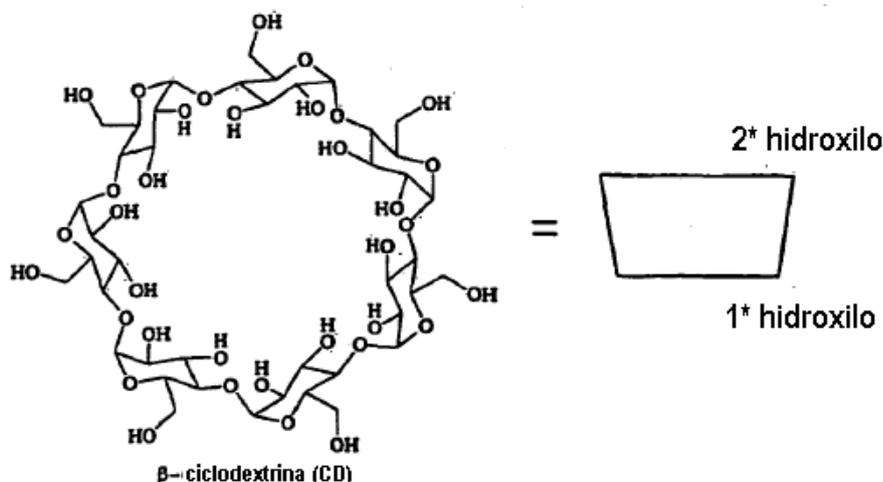
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Métodos para preparar copolímeros de ciclodextrina lineales

La invención se refiere métodos de preparación de copolímeros de ciclodextrina lineales hidrosolubles y copolímeros de ciclodextrina hidrosolubles lineales oxidados.

- 5 Las ciclodextrinas son polisacáridos cíclicos que contienen unidades de D(+)-glucopiranososa de origen natural con ligamiento α -(1,4). Las ciclodextrinas más comunes son las alfa (α)-ciclodextrinas, beta (β)-ciclodextrinas y gamma (γ)-ciclodextrinas que contienen, respectivamente, 6, 7 u 8 unidades de glucopiranososa. Estructuralmente, la naturaleza cíclica de la ciclodextrina forma un toro o forma de tipo rosquilla que tiene una cavidad interna apolar o hidrofóbica, estando situados los grupos hidroxilo secundarios en un lado del toro de ciclodextrina y estando situados los grupos hidroxilo primarios en el otro. Por tanto, usando (β)-ciclodextrina como ejemplo, a menudo se representa la ciclodextrina esquemáticamente como sigue:



- 15 El lado en el que están localizados los grupos hidroxilo secundarios tiene un diámetro mayor que el lado en el que están localizados los grupos hidroxilo primarios. La naturaleza hidrofóbica de la cavidad interna de la ciclodextrina permite la inclusión de una variedad de compuestos (Comprehensive Supramolecular Chemistry, volumen 3, J.L. Atwood *et al.*, ed., Pergamon Press (1996); T. Cserhati, Analytical Biochemistry, 225: 328-332 (1995); Husain *et al.*, Applied Spectroscopy, 46: 652-658 (1992); documento FR 2665169).

- 20 Las ciclodextrinas se han usado como vehículo de suministro de diversos compuestos terapéuticos mediante la formación de complejos de inclusión con diversos fármacos que pueden ajustarse a la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina o mediante la formación de complejos de asociación no covalentes con otras moléculas biológicamente activas tales como oligonucleótidos y derivados de los mismos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.727.064 describe preparaciones farmacéuticas consistentes en un fármaco con hidrosolubilidad sustancialmente baja y una mezcla basada en ciclodextrina amorfa hidrosoluble. El fármaco forma un complejo de inclusión con las ciclodextrinas de la mezcla. En la patente de EE.UU. 5.691.316, se describe un sistema de suministro celular de ciclodextrina para oligonucleótidos. En dicho sistema, se compleja no covalentemente un oligonucleótido con una ciclodextrina o, como alternativa, el oligonucleótido puede unirse covalentemente con adamantina que, a su vez, está asociada no covalentemente con una ciclodextrina.

- 30 Son también conocidos en la materia diversos polímeros que contienen ciclodextrina y métodos para su preparación (Comprehensive Supramolecular Chemistry, volumen 3, J.L. Atwood *et al.*, ed., Pergamon Press (1996)). Se describe un proceso para producir un polímero que contiene ciclodextrina inmovilizada en la patente de EE.UU. 5.608.015. Según el proceso, se hace reaccionar un derivado de ciclodextrina con un monómero de haluro de ácido de un ácido α,β -insaturado o derivado del mismo que tiene un grupo isocianato terminal o un derivado del mismo. El derivado de ciclodextrina se obtiene haciendo reaccionar ciclodextrina con compuestos tales como haluros de carbonilo y anhídridos de ácido. El polímero resultante contiene unidades de ciclodextrina como cadenas laterales que parten de una cadena principal polimérica lineal.

- 40 La patente de EE.UU. 5.276.088 describe un método de síntesis de polímeros de ciclodextrina haciendo reaccionar poli(alcohol vinílico) o celulosa o derivados de los mismos con derivados de ciclodextrina o mediante copolimerización de un derivado de ciclodextrina con acetato de etilo o metacrilato de metilo. De nuevo, el polímero de ciclodextrina resultante contiene un resto ciclodextrina como resto pendiente que parte de la cadena principal del polímero.

Se describe en el documento WO 96/09073 A1 un ensamblaje polimérico medicinal biodegradable con estructura supramolecular. El ensamblaje comprende una serie de compuestos cíclicos portadores de fármaco preparados

uniendo un fármaco a una α , β o γ -ciclodextrina y eslabonando entonces los compuestos de fármaco/ciclodextrina a lo largo de un polímero lineal con los restos biodegradables unidos a ambos extremos del polímero. Dicho ensamblaje es capaz, según los informes, de liberar un fármaco en respuesta a una biodegradación específica que ocurre en una enfermedad. Estos ensamblajes se designan comúnmente como polímeros de ciclodextrina "de tipo collar".

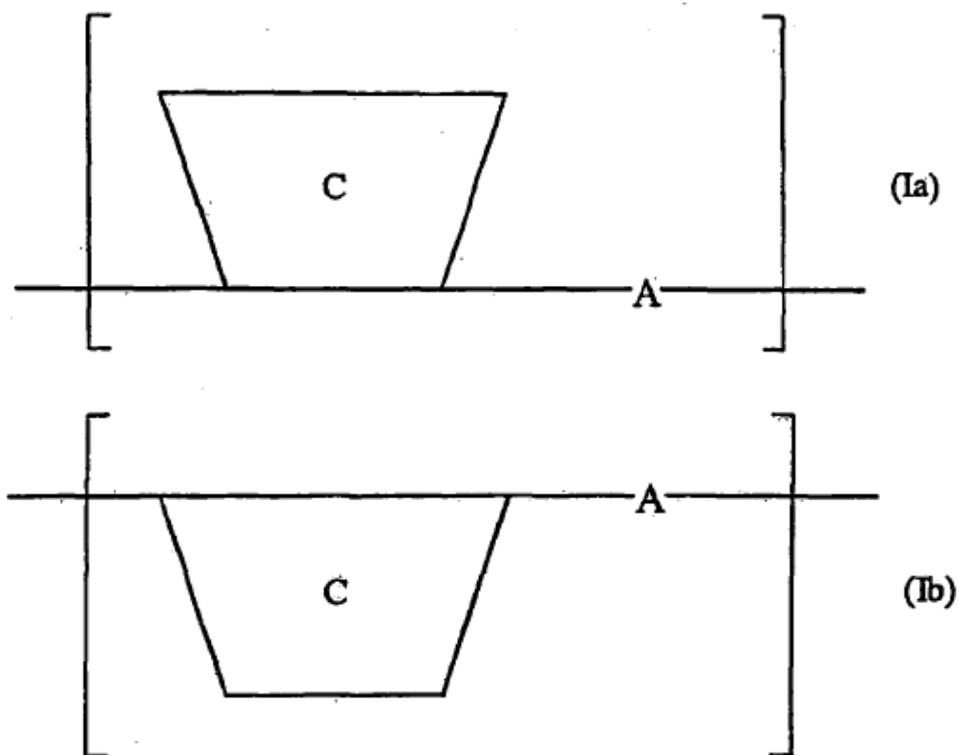
5 Se describen en el documento JP 58167613 polímeros de ciclodextrina en que el resto ciclodextrina es parte de la cadena principal y no un resto pendiente a partir de la cadena principal y un método para su preparación, y se obtienen haciendo reaccionar una ciclodextrina con un compuesto diepoxídico de manera aleatoria. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de polímeros que contienen ciclodextrina lineales.

10 Esta invención responde a esta necesidad al proporcionar un método para preparar un copolímero de ciclodextrina lineal hidrosoluble que comprende:

proporcionar un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado y

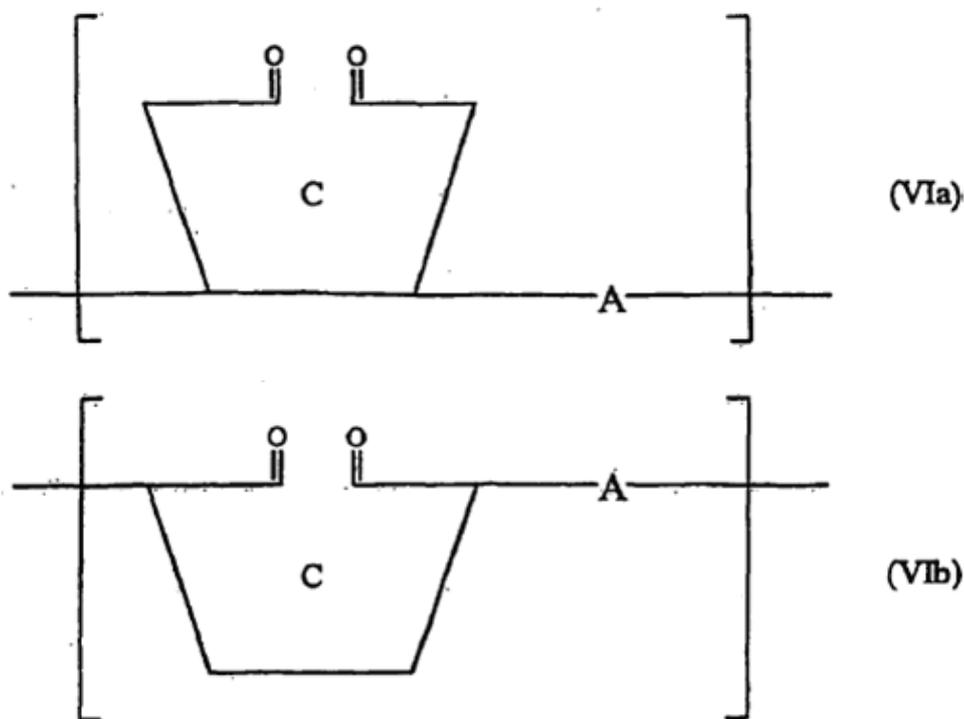
15 copolimerizar el precursor monomérico de ciclodextrina diaminado con un precursor de ligador que contiene al menos dos grupos funcionales mediante los cuales puede conseguirse un ligamiento con el precursor monomérico de ciclodextrina, en el que los restos ligadores comprenden un grupo polietilenglicol o un grupo que tiene la siguiente estructura: $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH}_2^+)(\text{CH}_2)_x\text{C}(\text{NH}_2^+)\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$, en el que $x = 1$ a 50.

El copolímero de ciclodextrina lineal puede tener una unidad repetida de fórmula Ia, Ib o una combinación de las mismas:



20 Un método posible implica yodar un precursor monomérico de ciclodextrina formando un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado, aminorar el precursor monomérico de ciclodextrina diyodado formando un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado y copolimerizar entonces el precursor monomérico de ciclodextrina diaminado con dicho precursor de ligador, produciendo el copolímero de ciclodextrina lineal.

25 El copolímero de ciclodextrina lineal oxidado como se define anteriormente puede ser un copolímero de ciclodextrina lineal que contiene al menos un resto de ciclodextrina oxidado de fórmula VIa o VIb:

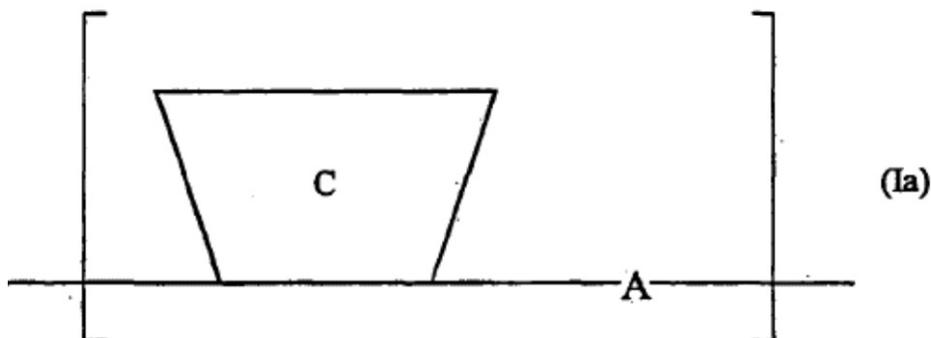


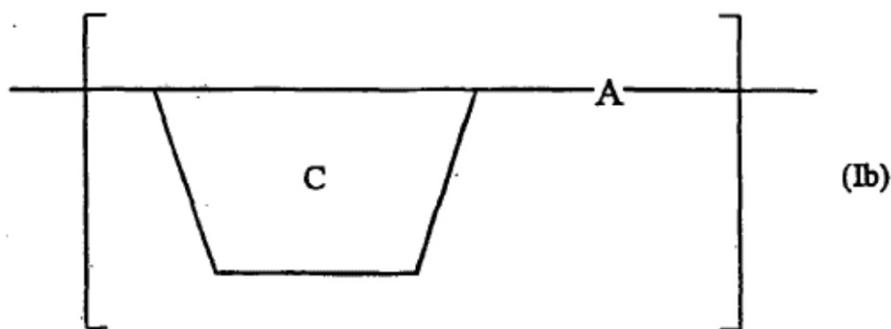
5 Cada resto de ciclodextrina de un copolímero de ciclodextrina lineal puede oxidarse de modo que forme un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado que tiene una unidad repetida de fórmula VIa, VIb o una combinación de las mismas.

Se describe también un método para la preparación de un copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado reticulado con otro polímero que implica hacer reaccionar un copolímero de ciclodextrina lineal o lineal oxidado con un polímero en presencia de un agente de reticulación.

10 La invención proporciona adicionalmente un método para unir un copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado que tiene al menos un ligando unido al copolímero de ciclodextrina. El ligando puede estar unido al resto monomérico de ciclodextrina o al resto comonomérico del copolímero.

15 Un copolímero de ciclodextrina lineal es un polímero que contiene restos monoméricos de ciclodextrina como parte integral de su esqueleto polimérico. Anteriormente, los restos de ciclodextrina no eran parte de la cadena principal polimérica, si no que estaban unidos partiendo del esqueleto polimérico como restos pendientes. Según la invención, un copolímero de ciclodextrina lineal puede tener una unidad repetida de fórmula Ia, Ib o una combinación de las mismas:

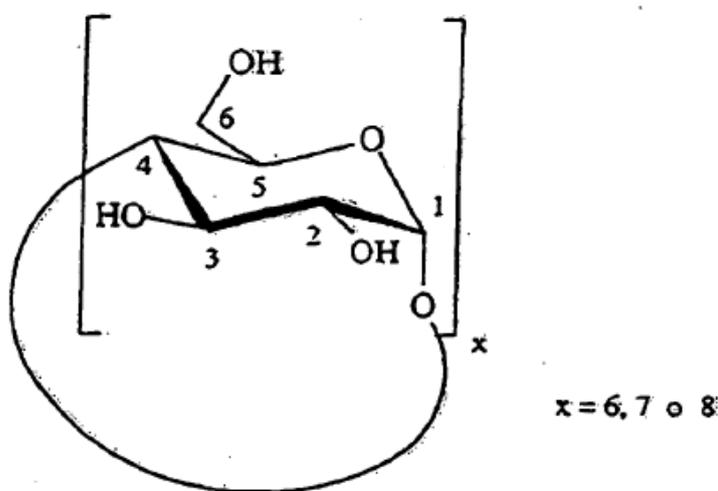




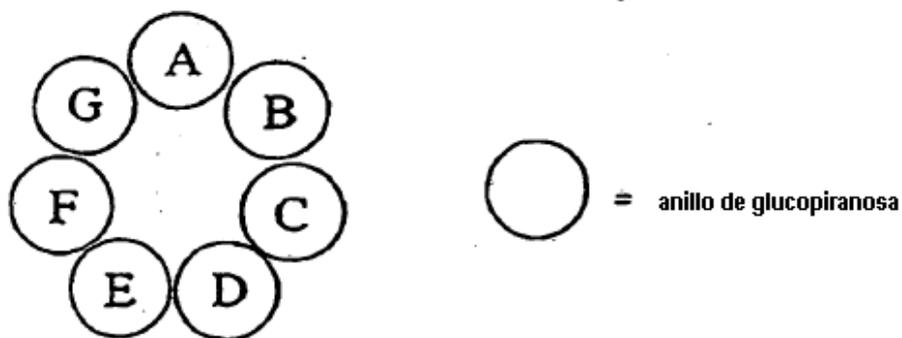
En la fórmula Ia y Ib, C es un resto monomérico de ciclodextrina sustituido o no sustituido y A es un resto ligador unido, concretamente unido covalentemente, al resto monomérico de ciclodextrina C. La polimerización de un precursor monomérico de ciclodextrina con un precursor de ligador da como resultado un copolímero de ciclodextrina lineal de la invención. En un copolímero de ciclodextrina lineal individual de la invención, el resto monomérico de ciclodextrina puede ser el mismo o diferente e, igualmente, el resto ligador puede ser el mismo o diferente.

El precursor monomérico de ciclodextrina puede ser cualquier ciclodextrina o derivado de la misma conocida en la materia. Como se discute anteriormente, una ciclodextrina se define como un polisacárido cíclico que contiene lo más comúnmente de 6 a 8 unidades de D(+)-glucopiranosas con un ligamiento α -(1,4). Preferiblemente, el precursor monomérico de ciclodextrina es una ciclodextrina que tiene 6, 7 y 8 unidades de de glucosa, concretamente, respectivamente una alfa (α)-ciclodextrina, una beta (β)-ciclodextrina y una gamma (γ)-ciclodextrina. Un derivado de ciclodextrina puede ser cualquier ciclodextrina sustituida conocida en la materia en que el sustituyente no interfiera con la copolimerización con el precursor de ligador como se describe a continuación. Con los fines de la invención, un derivado de ciclodextrina puede ser neutro, catiónico o aniónico. Los ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos hidroxialquilo tales como, por ejemplo, hidroxipropilo, hidroxietilo; grupos éter tales como, por ejemplo, dihidroxipropiléteres, metilhidroxietiléteres, etilhidroxietiléteres y etilhidroxipropiléteres; grupos alquilo tales como, por ejemplo, metilo; sacáridos tales como, por ejemplo, grupos glucosilo y maltosilo; grupos ácidos tales como, por ejemplo, ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfónicos, ácido tiofosfónico y ácidos sulfónicos; grupos imidazol y grupos sulfato.

Un precursor monomérico de ciclodextrina puede modificarse químicamente adicionalmente (por ejemplo, halogenarse o aminarse) para facilitar o afectar a la copolimerización del precursor monomérico de ciclodextrina con un precursor de ligador, como se describe a continuación. La modificación química del precursor monomérico de ciclodextrina permite la polimerización en solo dos posiciones de cada precursor monomérico de ciclodextrina, concretamente, la creación de un resto monomérico de ciclodextrina bifuncional. El esquema de numeración para las posiciones C1-C6 de cada anillo de glucopiranosas es el siguiente:

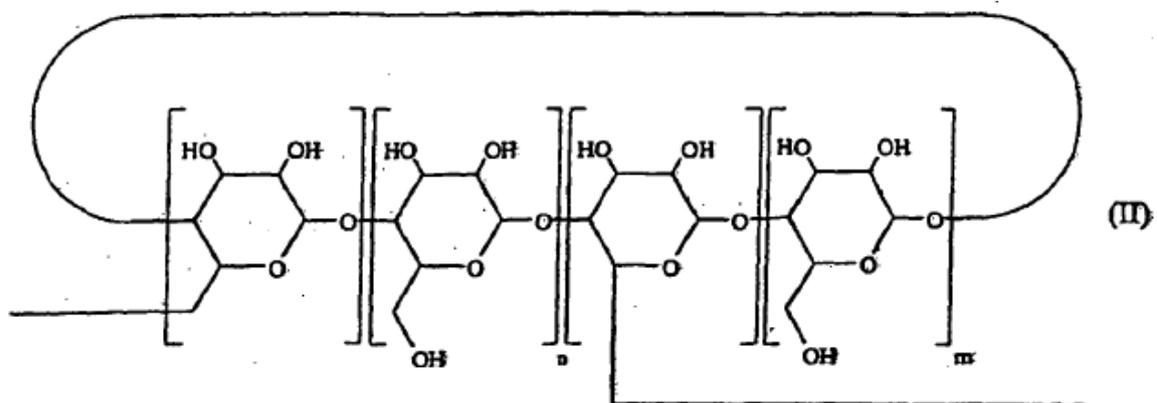


En una realización preferida, ocurre la polimerización en dos de cualquiera de las posiciones C2, C3 y C6, incluyendo combinaciones de las mismas, del precursor monomérico de ciclodextrina. Por ejemplo, un precursor monomérico de ciclodextrina puede polimerizarse en la posición C6, mientras que otro precursor monomérico de ciclodextrina puede polimerizarse en la posición C2 y C6 del precursor monomérico de ciclodextrina. Usando -ciclodextrina como ejemplo, el esquema de caracterización para la posición relativa de cada anillo de glucopiranosas en una ciclodextrina es el siguiente:



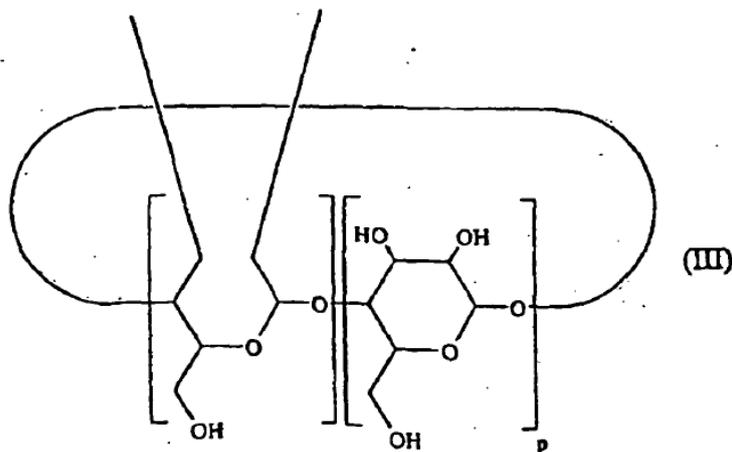
β -ciclodextrina

En una realización preferida de un copolímero de ciclodextrina lineal de la invención, el resto monomérico de ciclodextrina tiene la siguiente fórmula general (II)



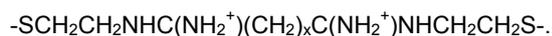
5 En la fórmula (II), n y m representan enteros que, junto con los otros dos anillos de glucopiranososa, definen el número total de unidades de glucopiranososa en el resto monomérico de ciclodextrina. La fórmula (III) representa un resto monomérico de ciclodextrina que puede polimerizarse en dos posiciones C6 del resto monomérico de ciclodextrina.

10 Los ejemplos de restos monoméricos de ciclodextrina de fórmula (II) incluyen, pero sin limitación: 6^A,6^B-desoxi- α -ciclodextrina (n=0, m=4), 6^A,6^C-desoxi- α -ciclodextrina (n=1, m=3), 6^A,6^D-desoxi- α -ciclodextrina (n=2, m=2), 6^A,6^B-desoxi- β -ciclodextrina (n=0, m=5), 6^A,6^C-desoxi- β -ciclodextrina (n=1, m=4), 6^A,6^D-desoxi- β -ciclodextrina (n=2, m=3), 6^A,6^B-desoxi- γ -ciclodextrina (n=0, m=6), 6^A,6^C-desoxi- γ -ciclodextrina (n=1, m=5), 6^A,6^D-desoxi- γ -ciclodextrina (n=2, m=4) y 6^A,6^E-desoxi- γ -ciclodextrina (n=3, m=3). En otra realización preferida del copolímero de ciclodextrina lineal de la invención, el resto monomérico de ciclodextrina tiene la siguiente fórmula general (III):



en que $p = 5-7$. En la fórmula (III), una de las unidades de D(+)-glucopiranososa del resto monomérico de ciclodextrina ha experimentado apertura de anillo para permitir la polimerización en la posición C2 y C3 del resto monomérico de ciclodextrina. Los restos monoméricos de ciclodextrina de fórmula (III) están comercialmente disponibles en Carbomer de Westborough, MA. Los ejemplos de restos monoméricos de ciclodextrina de fórmula (III) incluyen, pero sin limitación, 2^A,3^A-desoxi-2^A,3^A-dihidro- α -ciclodextrina, 2^A,3^A-desoxi-2^A,3^A-dihidro- β -ciclodextrina, 2^A,3^A-desoxi-2^A,3^A-dihidro- γ -ciclodextrina, designadas comúnmente respectivamente como 2,3-desoxi- α -ciclodextrina, 2,3-desoxi- β -ciclodextrina y 2,3-desoxi- γ -ciclodextrina.

Un precursor de ligador puede ser cualquier compuesto de cadena lineal o ramificada, simétrico o asimétrico que, tras reacción con un precursor monomérico de ciclodextrina como se describe anteriormente, ligue conjuntamente dos restos monoméricos de ciclodextrina. Preferiblemente, un precursor de ligador es un compuesto que contiene al menos dos grupos funcionales a través de los cuales puede conseguirse la reacción y por tanto ligamiento de los precursores monoméricos de ciclodextrina. Los ejemplos de posibles grupos funcionales, que pueden ser iguales o diferentes, terminales o internos, de cada precursor de ligador incluyen, pero sin limitación, grupos amino, ácido, éster, imidazol y haluro de acilo y derivados de los mismos. En una realización preferida, los dos grupos funcionales son iguales y terminales. Tras la copolimerización del precursor de ligador con un precursor monomérico de ciclodextrina, pueden ligarse conjuntamente dos restos monoméricos de ciclodextrina uniendo el lado de hidroxilo primario de un resto monomérico de ciclodextrina con el lado de hidroxilo primario de otro resto monomérico de ciclodextrina y uniendo el lado de hidroxilo secundario de un resto monomérico de ciclodextrina con el lado de hidroxilo secundario de otro resto monomérico de ciclodextrina. Por consiguiente, pueden existir combinaciones de dichos ligamientos en el copolímero final. Tanto el precursor de ligador como el resto ligador del copolímero final pueden ser neutros, catiónicos (por ejemplo, que contienen grupos protonados tales como, por ejemplo, grupos amonio cuaternario) o aniónicos (por ejemplo, que contienen grupos desprotonados tales como, por ejemplo, grupos aniónicos sulfato, fosfato o carboxilato). La carga del resto ligador del copolímero puede ajustarse ajustando las condiciones de pH. Los ejemplos de precursores de ligador adecuados incluyen la cistamina. La copolimerización de un precursor de ligador con un precursor monomérico de ciclodextrina conduce a la formación de un copolímero de ciclodextrina lineal de la invención que contiene un resto ligador de la siguiente fórmula general:

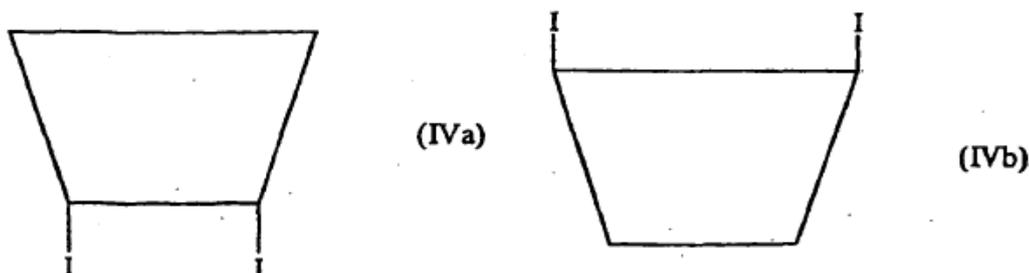


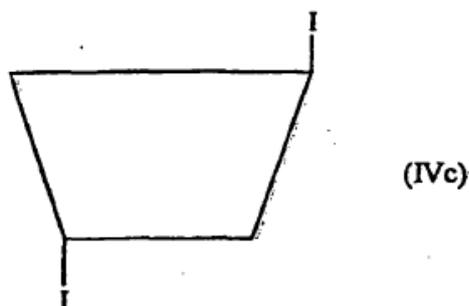
En la fórmula anterior, $x = 1$ a 5. Preferiblemente, $x = 1$ a 30. Más preferiblemente, $x = 1$ a 20. En una realización preferida, el resto ligador es biodegradable o lábil frente a ácidos. También en una realización preferida, el precursor de ligador, y por tanto el resto ligador, pueden elegirse selectivamente para conseguir una aplicación deseada. Por ejemplo, para suministrar agentes terapéuticos de molécula pequeña, puede no ser necesario un polímero cargado y el resto ligador puede ser un grupo polietilenglicol.

Un copolímero de ciclodextrina lineal puede estar modificado con al menos un ligando unido al copolímero de ciclodextrina. El ligando puede estar unido al copolímero de ciclodextrina a través del resto monomérico de ciclodextrina o el resto ligador. Preferiblemente, el ligando está unido al menos a un resto monomérico de ciclodextrina del copolímero de ciclodextrina lineal. Preferiblemente, el ligando permite que un copolímero de ciclodextrina lineal se oriente y una a una célula. Si está unido más de un ligando, que puede ser igual o diferente, a un copolímero de ciclodextrina lineal de la invención, el ligando o ligandos adicionales pueden estar unidos al mismo o diferente resto monomérico de ciclodextrina o al mismo o diferente resto ligador del copolímero.

Los ejemplos de ligandos adecuados incluyen, pero sin limitación, vitaminas (por ejemplo, ácido fólico), proteínas (por ejemplo, transferrina y anticuerpos monoclonales) y polisacáridos. El ligando variará dependiendo del tipo de suministro deseado. Por ejemplo, el suministro mediado por receptor puede conseguirse, pero sin limitación, por el uso de un ligando ácido fólico, mientras que el suministro de oligonucleótido anticodificante puede conseguirse, pero sin limitación, por el uso de un ligando transferrina. El ligando puede estar unido a un copolímero de la invención mediante medios conocidos en la materia.

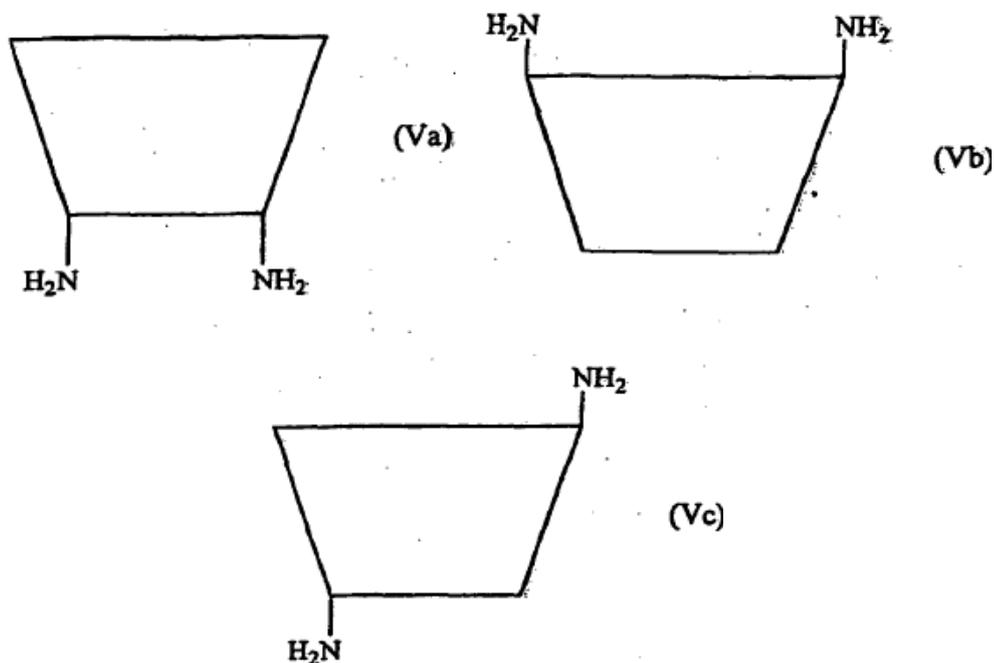
Un método de preparación de una ciclodextrina lineal yoda un precursor monomérico de ciclodextrina como se describe anteriormente, formando un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado de fórmula IVa, IVb, IVc o una mezcla de los mismos:



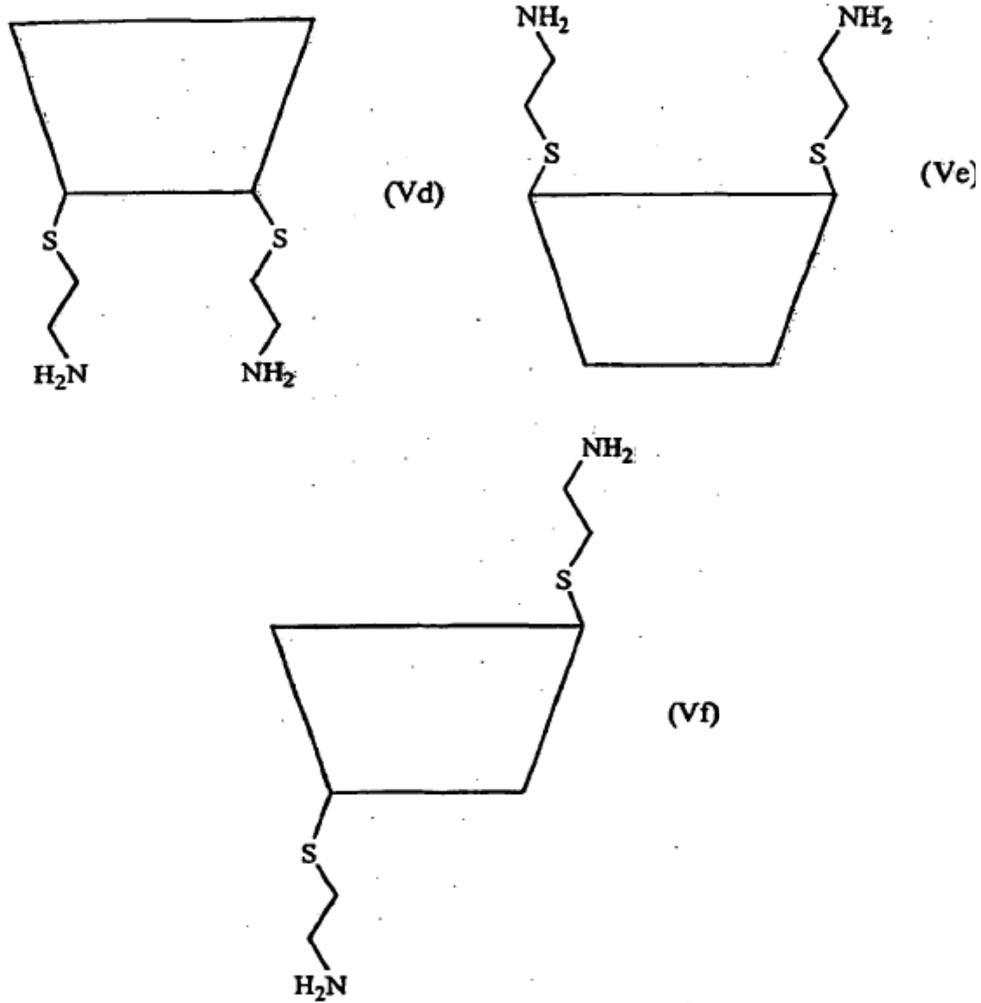


El precursor monomérico de ciclodextrina diyodado puede prepararse mediante cualquier medio conocido en la materia (Tabushi *et al.* J. Am. Chem. 106, 5267-5270 (1984); Tabushi *et al.* J. Am. Chem., 106, 4580-4584 (1984)). Por ejemplo, la β -ciclodextrina puede reaccionar con cloruro de bifenil-4,4'-disulfonilo en presencia de una piridina anhidra formando una β -ciclodextrina bloqueada con cloruro de bifenil-4,4'-disulfonilo, que puede hacerse reaccionar entonces con yoduro de potasio, produciendo diyodo- β -ciclodextrina. El precursor monomérico de ciclodextrina está yodado en solo dos posiciones. Al copolimerizar el precursor monomérico de ciclodextrina diyodado con un precursor de ligador, como se describe anteriormente, puede prepararse un polímero de ciclodextrina lineal que tiene una unidad repetida de fórmula Ia, Ib o una combinación de las mismas, también como se describe anteriormente. Si es apropiado, los grupos yodo pueden reemplazarse por otros grupos salientes conocidos.

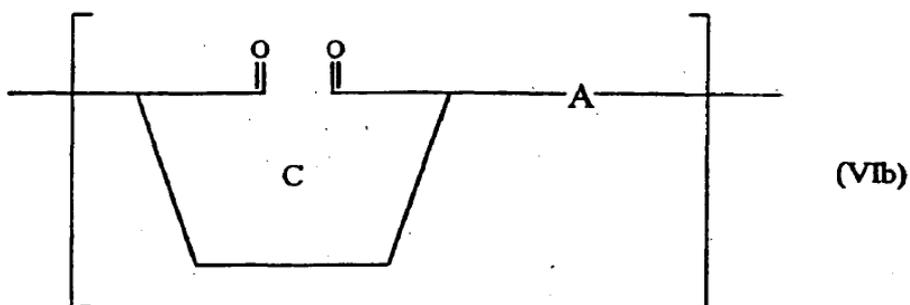
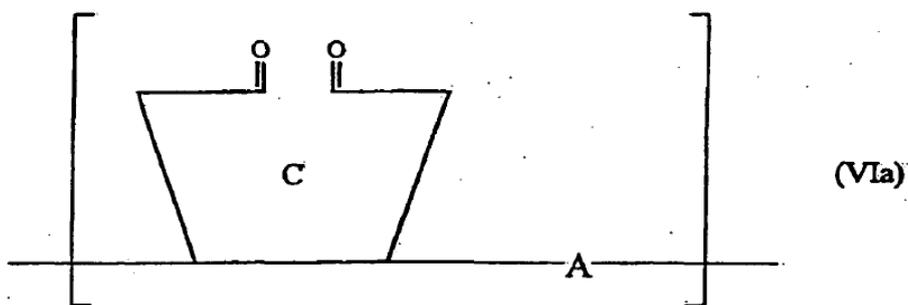
Los grupos yodo u otro grupo saliente apropiado pueden desplazarse por un grupo que permita la reacción con un precursor de ligador, como se describe anteriormente. Por ejemplo, puede aminarse un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado de fórmula IVa, IVb, IVc o una mezcla de los mismos, formando un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado de fórmula Va, Vb, Vc o una mezcla de los mismos:



El precursor monomérico de ciclodextrina diaminado puede prepararse mediante cualquier medio conocido en la materia (Tabushi *et al.* Tetrahedron Lett. 18: 1527-1530 (1977); Mungall *et al.*, J. Org. Chem. 1659-1662 (1975)). Por ejemplo, una diyodo- β -ciclodextrina puede hacerse reaccionar con azida de sodio y reducirse entonces, formando una diamino- β -ciclodextrina. El precursor monomérico de ciclodextrina se amina solo en dos posiciones. El precursor monomérico de ciclodextrina diaminado puede copolimerizarse entonces con un precursor de ligador, como se describe anteriormente, produciendo un copolímero de ciclodextrina lineal que tiene una unidad repetida de fórmula Ia, Ib o una combinación de las mismas, también como se describe anteriormente. Sin embargo, la funcionalidad amino de un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado no tiene que estar unida directamente al resto de ciclodextrina. Como alternativa, la funcionalidad amino puede introducirse mediante desplazamiento del yodo u otro grupo saliente adecuado de un precursor monomérico de ciclodextrina por restos que contienen un grupo amino tales como, por ejemplo, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, formando un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado de fórmula Vd, Ve, Vf o una mezcla de las mismas:



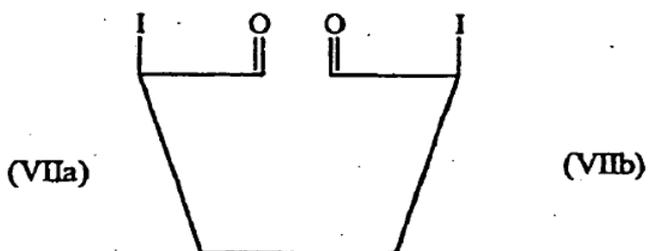
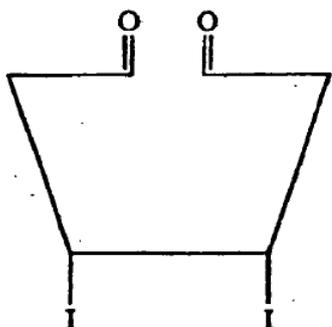
5 El copolímero de ciclodextrina lineal puede oxidarse para introducir al menos un monómero de ciclodextrina oxidado en el copolímero, de modo que el monómero de ciclodextrina oxidado sea una parte integral del esqueleto polimérico. Un copolímero de ciclodextrina lineal que contiene al menos un monómero de ciclodextrina oxidado se define como un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado. El monómero de ciclodextrina puede estar oxidado por el lado de hidroxilo secundario o primario del resto de ciclodextrina. Si está presente más de un monómero de ciclodextrina oxidado en un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado, pueden estar presentes el mismo o diferentes monómeros de ciclodextrina en el lado de hidroxilo primario, el lado de hidroxilo secundario o ambos. Con fines de
 10 ilustración, un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado con grupos hidroxilo secundarios oxidados tiene, por ejemplo, al menos una unidad de fórmula VIa o VIb:

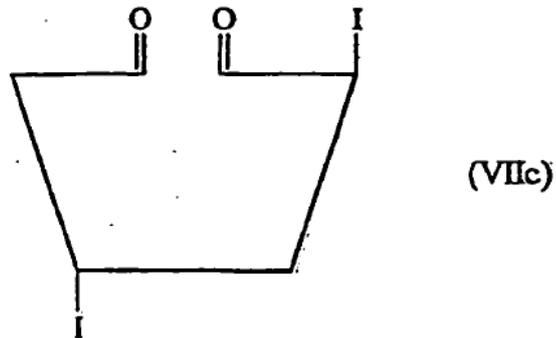


5 En las fórmulas VIa y VIb, C es un resto monomérico de ciclodextrina oxidado sustituido o no sustituido y A es un resto ligador (unido, concretamente unido covalentemente, con el resto monomérico de ciclodextrina oxidado C. También en las fórmulas VIa y VIb, la oxidación de los grupos hidroxilo secundarios conduce a la apertura de anillo del resto monomérico de ciclodextrina y a la formación de grupos aldehído.

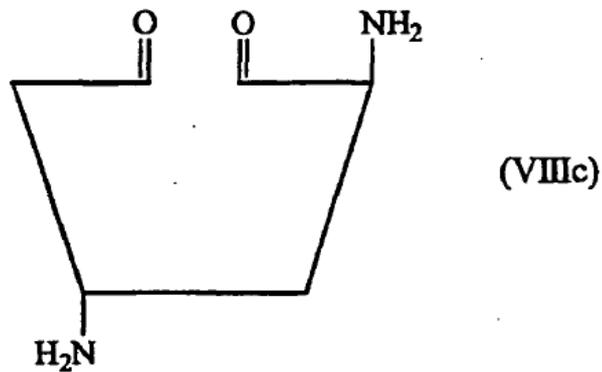
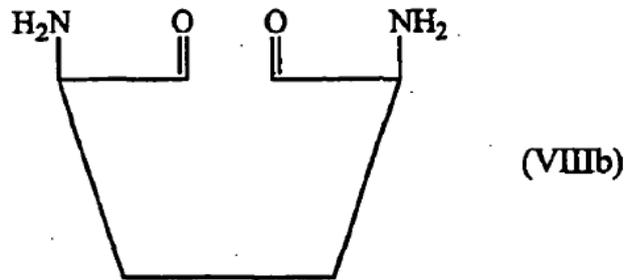
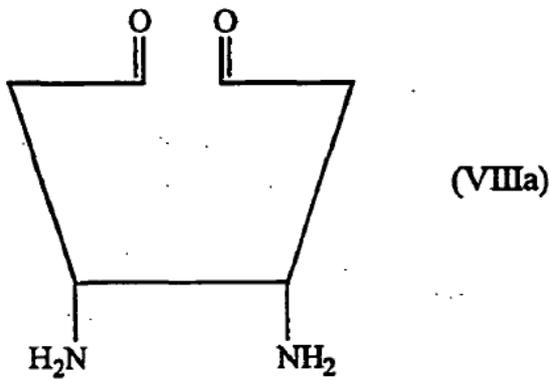
10 Puede prepararse un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado mediante la oxidación de un copolímero de ciclodextrina lineal como se discute anteriormente. La oxidación de un copolímero de ciclodextrina lineal puede lograrse mediante técnicas de oxidación conocidas en la materia (Hisamatsu *et al.*, *Starch* 44: 188-191 (1992)). Preferiblemente, se usa un oxidante tal como, por ejemplo, peryodato de sodio. Se entenderá por un especialista en la materia que, en las condiciones de oxidación estándares, el grado de oxidación puede variar o ser variado por el copolímero. Por tanto, en una realización de la invención, un copolímero lineal oxidado puede contener un monómero de ciclodextrina oxidado. En otra realización, se oxidarían sustancialmente todos los monómeros de ciclodextrina del copolímero.

15 Otro método de preparación de un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado implica la oxidación de un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado o diaminado, como se describe anteriormente, formando un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado o diaminado oxidado y la copolimerización del precursor monomérico de ciclodextrina diaminado oxidado con un precursor de ligador. En una realización preferida, es un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado oxidado de fórmula VIIa, VIIb, VIIc o una mezcla de las mismas:



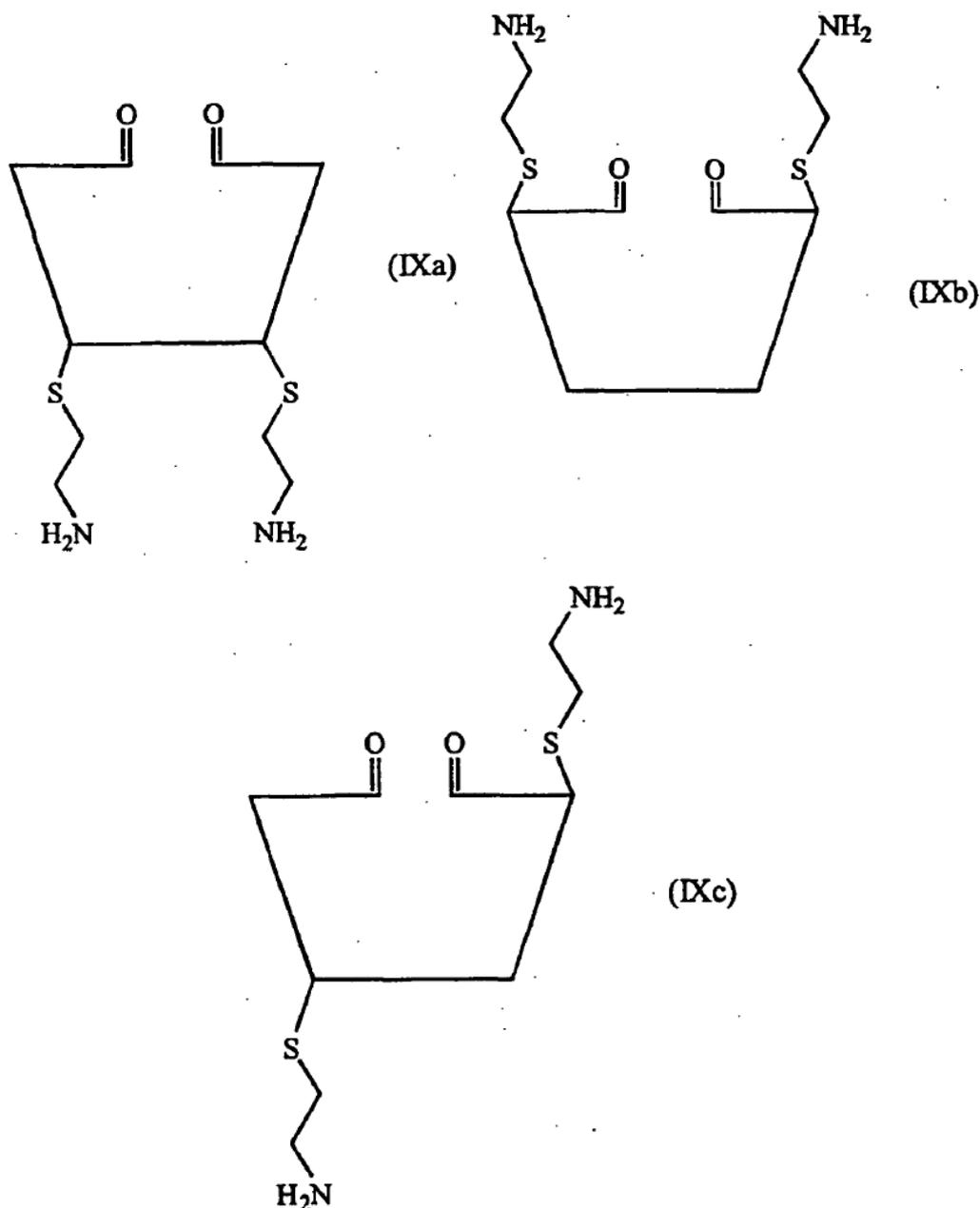


Un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado oxidado de fórmulas VIIIa, VIIIb, VIIIc o una mezcla de las mismas



5

puede prepararse mediante la aminación de un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado oxidado de fórmulas VIIa, VIIb, VIIc o una mezcla de las mismas como se describe anteriormente. En aún otra realización preferida, puede prepararse un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado oxidado de fórmulas IXa, IXb, IXc o una mezcla de las mismas:



5 mediante el desplazamiento del yodo u otro grupo saliente apropiado de un precursor monomérico de ciclodextrina oxidado disustituido con un yodo u otro grupo saliente adecuado por el resto que contiene el grupo amino $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

10 Como alternativa, un precursor monomérico de ciclodextrina diyodado o diaminado oxidado, como se describe anteriormente, puede prepararse oxidando un precursor monomérico de ciclodextrina y formando un precursor monomérico de ciclodextrina oxidado y diyodando y/o diaminando entonces el precursor monomérico de ciclodextrina oxidado como se describe anteriormente. El precursor monomérico de ciclodextrina diaminado oxidado puede copolimerizarse entonces con dicho precursor de ligador, como se describe anteriormente, formando un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado.

Un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado puede modificarse adicionalmente también mediante la unión de al menos un ligando al copolímero. El ligando es como se describe anteriormente.

15 En una realización preferida de la invención, el copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado termina en al menos un precursor de ligador o el producto hidrolizado del precursor de ligador, cada uno como se describe anteriormente. Como resultado de la terminación del copolímero de ciclodextrina en al menos un precursor de ligador, existe al menos un grupo funcional, como se describe anteriormente, por copolímero de

ciclodextrina lineal o por copolímero de ciclodextrina lineal oxidado. Por ejemplo, el grupo funcional puede ser un grupo ácido o un grupo funcional que pueda hidrolizarse hasta un grupo ácido. El grupo funcional puede modificarse químicamente adicionalmente según se desee para potenciar las propiedades del copolímero de ciclodextrina tales como, por ejemplo, la estabilidad coloidal y la eficacia de transfección. Por ejemplo, el grupo funcional puede modificarse mediante reacción con PEG, formando un copolímero de ciclodextrina terminado en PEG, para potenciar la estabilidad coloidal o con histidina, formando un copolímero de ciclodextrina terminado en imidazolilo, para potenciar la eficacia de transfección intracelular.

Puede efectuarse una química adicional en el copolímero de ciclodextrina mediante el grupo funcional modificado. Por ejemplo, el grupo funcional modificado puede usarse para alargar la cadena polimérica ligando un copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado, como se describe en la presente memoria, con el mismo o diferente copolímero de ciclodextrina o con un polímero no de ciclodextrina. En una realización preferida de la invención, el polímero a añadir es el mismo o diferente copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado que puede terminar también en al menos un precursor de ligador para modificación adicional, como se describe cada uno en la presente memoria.

Como alternativa, pueden hacerse reaccionar y ligarse conjuntamente al menos dos copolímeros de ciclodextrina lineales o copolímeros de ciclodextrina oxidados lineales iguales o diferentes que contienen un grupo funcional terminal o un grupo funcional terminal modificado, como se describe anteriormente, a través del grupo funcional o grupo funcional modificado. Preferiblemente, tras la reacción del grupo funcional o grupo funcional modificado, se forma un resto degradable tal como, por ejemplo, un ligamiento disulfuro. Por ejemplo, la modificación del grupo funcional terminal con cisteína puede usarse para producir un copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado que tiene al menos un grupo tiol libre. La reacción con un copolímero de ciclodextrina que contiene también al menos un grupo tiol libre igual o diferente formará un ligamiento disulfuro entre los dos copolímeros. En una realización preferida de la invención, el grupo funcional o funcional modificado puede seleccionarse para ofrecer ligamientos que exhiban diferentes tasas de degradación (por ejemplo, mediante degradación enzimática) y proporcionen así, si se desea, un sistema de liberación temporizado para un agente terapéutico. El polímero resultante puede estar reticulado, como se describe en la presente memoria. Puede añadirse un agente terapéutico, como se describe en la presente memoria, antes o después de la reticulación del polímero. Puede unirse también un ligando, como se describe en la presente memoria, a través del grupo funcional modificado.

Un copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado puede unirse a o injertarse en un sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato reconocido por los especialistas en la materia. En otra realización preferida de la invención, puede reticularse un copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado con un polímero formando, respectivamente, un copolímero de ciclodextrina reticulado o un copolímero de ciclodextrina oxidado reticulado. El polímero puede ser cualquier polímero capaz de reticular con un copolímero de ciclodextrina lineal o lineal oxidado de la invención (por ejemplo, polímero de polietilenglicol (PEG), polímero de polietileno). El polímero puede ser también un copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina lineal oxidado igual o diferente. Por tanto, por ejemplo, puede reticularse un copolímero de ciclodextrina lineal con cualquier polímero incluyendo, pero sin limitación: consigo mismo, con otro copolímero de ciclodextrina lineal y con un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado. Un copolímero de ciclodextrina lineal reticulado puede prepararse haciendo reaccionar un copolímero de ciclodextrina lineal con un polímero en presencia de un agente de reticulación. Un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado reticulado puede prepararse haciendo reaccionar un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado con un polímero en presencia de un agente de reticulación apropiado. El agente de reticulación puede ser cualquier agente de reticulación conocido en la materia. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen dihidrazidas y disulfuros. En una realización preferida, el agente de reticulación es un grupo lábil tal que el copolímero reticulado pueda desreticularse si se desea.

Un copolímero de ciclodextrina lineal y un copolímero de ciclodextrina lineal oxidado pueden caracterizarse mediante cualquier medio conocido en la materia. Dichos métodos o técnicas de caracterización incluyen, pero sin limitación, cromatografía de permeación en gel (GPC), espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (espec. de masas MALDI-TOF). RMN-¹H y -¹³C, dispersión de luz y valoración.

Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar la invención. Sin embargo, debe entenderse que la invención no ha de limitarse a las condiciones o detalles específicos descritos en estos ejemplos.

Ejemplos

Materiales. Se secó β-ciclodextrina **1** (Cerestar USA, Inc. de Hammond, IN) a vacío (<0,1 Pa) a 120°C durante 12 h antes del uso. Se recristalizó cloruro de bifenil-4,4'-disulfonilo (Aldrich Chemical Company, Inc. de Milwaukee, WI) con cloroformo/hexanos. Se pulverizó yoduro de potasio con mortero y se secó en una estufa a 200°C. Todos los demás reactivos se obtuvieron de suministradores comerciales y se usaron como se recibieron, sin purificación adicional. Las muestras poliméricas se analizaron en un sistema de HPLC Hitachi equipado con un detector Anspec RI y una columna Progel-TSK G3000_{PWXL} usando agua como eluyente a un caudal de 1,0 ml/min.

Ejemplo de preparación 1: β -Ciclodextrina bloqueada en A,D con bifenil-4,4'-disulfonilo **1** (Tabushi *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 106, 5267-5270 (1984))

- 5 Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una barra agitadora magnética, un adaptador Schlenk y un tapón de goma con 7,92 g (6,98 mmol) de β -ciclodextrina seca y 250 ml de piridina anhidra (Aldrich Chemical Company, Inc.). Se agitó la disolución resultante a 50°C bajo atmósfera de nitrógeno añadiendo 2,204 g (6,28 mmol) de cloruro de bifenil-4,4'-disulfonilo en cuatro porciones iguales a intervalos de 15 min. Después de agitar a 50°C durante 3 h adicionales, se retiró el disolvente a vacío y se sometió el residuo a cromatografía en columna en fase inversa usando un gradiente de elución de 0-40% de acetonitrilo en agua. Se analizaron las fracciones mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se combinaron las fracciones apropiadas.
- 10 Después de retirar el grueso del acetonitrilo en rotavapor, se liofilizó la suspensión acuosa resultante hasta sequedad. Esto proporcionó 3,39 g (38%) de **1** en forma de un sólido incoloro.

Ejemplo de preparación 2: 6^A,6^B-Diyodo-6^A,6^B-desoxi- β -ciclodextrina **2** (Tabushi *et al.* J. Am. Chem. Soc., 106; 4580-4584 (1984))

- 15 Se cargó un tubo de centrifuga de 40 ml equipado con una barra agitadora magnética, un adaptador Schlenk y un tapón de goma con 1,02 g (7,2 mmol) de **1**, 3,54 g (21,3 mmol) de yoduro de potasio en polvo seco (Aldrich) y 15 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF) (Aldrich). Se agitó la suspensión resultante a 80°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se separaron los sólidos mediante centrifugación y se decantó el sobrenadante. Se lavó el precipitado sólido con una segunda porción de DMF anhidra, se combinaron los sobrenadantes y se concentraron a vacío. Se disolvió entonces el residuo en 14 ml de agua y se enfriaron en un baño de hielo antes de añadir 0,75 ml (7,3 mmol) de tetracloroetileno (Aldrich) con agitación rápida. Se filtró el complejo de inclusión precipitado en una frita de vidrio de poro medio y se lavó con una pequeña porción de acetona antes de secar a vacío sobre P₂O₅ durante 14 h. Esto proporcionó 0,90 g (92%) de **2** en forma de un sólido blanco.
- 20

Ejemplo de preparación 3: 6^A,6^B-Diazido-6^A,6^B-desoxi- β -ciclodextrina **3** (Tabushi *et al.* Tetrahedron Lett., 18; 1527-1530 (1977))

- 25 Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra agitadora magnética, un adaptador Schlenk y un tapón de goma con 1,704 g (1,25 mmol) de diyoduro de β -ciclodextrina, 0,49 g (7,53 mmol) de azida de sodio (EM Science de Gibbstown, NJ) y 10 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra. Se agitó la suspensión resultante a 60°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 14 h. Se retiró entonces el disolvente a vacío. Se disolvió el residuo resultante en suficiente agua para dar una disolución de sal 0,2 M y se pasó entonces a través de 11,3 g de resina Biorad AG501-X8(D) para retirar las sales residuales. Se liofilizó entonces el eluido hasta sequedad, proporcionando 1,232 g (83%) de **3** en forma de un sólido amorfo blanco que se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 30

Ejemplo de preparación 4: 6^A,6^D-Diamino-6^A,6^D-desoxi- β -ciclodextrina **4** (Mungall *et al.*, J. Org. Chem. 1659-1662 (1975))

- 35 Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con una barra agitadora magnética y un tapón de goma con 1,232 g (1,04 mmol) de bisazida de β -ciclodextrina y 50 ml de piridina anhidra (Aldrich). Se añadieron a esta suspensión agitada 0,898 g (3,42 mmol) de trifenilfosfina. Se agitó la suspensión resultante durante 1 h a temperatura ambiente antes de añadir 10 ml de amoniaco acuoso concentrado. La adición de amoniaco estuvo acompañada de un rápido desprendimiento de gas y la disolución se volvió homogénea. Después de 14 h, se retiró el disolvente a vacío y se trituró el residuo con 50 ml de agua. Se separaron los sólidos por filtración y se acidificó el filtrado (pH < 4) con HCl al 10% antes de aplicarlo a una columna de intercambio iónico que contenía resina Toyopearl SP-650M (en forma de NH₄⁺). Se eluyó el producto **4** con un gradiente de bicarbonato de amonio 0-0,5 M. Se combinaron las fracciones apropiadas y se liofilizaron, proporcionando 0,832 g (71%) del producto **4** en forma de la sal bis(hidrogenocarbonato).
- 40

- 45 Ejemplo comparativo 5: Copolímero de β -ciclodextrina-DSP **5**

- Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con una disolución de 92,6 mg (7,65 x 10⁻⁵ mol) de la sal bis(hidrogenocarbonato) de **4** en 1 ml de agua. Se ajustó el pH de la disolución a 10 con NaOH 1 M antes de añadir una disolución de 30,9 mg (7,65 x 10⁻⁵ mol) de ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP, Pierce Chemical Co. de Rockford, IL) en 1 ml de cloroformo. Se agitó la mezcla bifásica resultante con un mezclador Vortex durante 0,5 h.
- 50 Se decantó entonces la fase acuosa y se extrajo con 3 x 1 ml de cloroformo reciente. Se sometió entonces la disolución acuosa de polímero a cromatografía de permeación en gel (GPC) en resina Toyopearl HW-40F usando agua como eluyente. Se analizaron las fracciones por GPC y se liofilizaron las fracciones apropiadas, proporcionando 85 mg (85%) en forma de un polvo amorfo incoloro.

Ejemplo comparativo 6: Copolímero de β -ciclodextrina-DSS **6**

- 55 Se sintetizó el copolímero de β -ciclodextrina-DSS **6** de manera análoga al polímero de DSP **5**, excepto porque el reactivo DSP se sustituyó por suberato de disuccinimidilo (DSS, Pierce Chemical Co. de Rockford, IL). El compuesto **6** se obtuvo con un 67% de rendimiento.

Ejemplo comparativo 7: Copolímero de β -ciclodextrina-DTBP **7**

Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con una disolución de 91,2 mg ($7,26 \times 10^{-5}$ mol) de la sal bis(hidrogenocarbonato) de **4** en 1 ml de agua. Se ajustó el pH de la disolución a 10 con NaOH 1 M antes añadir 22,4 mg ($7,26 \times 10^{-5}$ mol) de 3,3'-ditiobis(propionimidato) de dimetilo-2 HCl (DTBP, Pierce Chemical Co. de Rockford, IL). Se agitó la disolución homogénea resultante con un mezclador Vortex durante 0,5 horas. Se sometió entonces la disolución polimérica acuosa a cromatografía de permeación en gel (GPC) en resina Toyopearl HW-40F. Se analizaron las fracciones por GPC y se liofilizaron las fracciones apropiadas, proporcionando 61 mg (67%) de un polvo amorfo incoloro.

Ejemplo comparativo 8: Copolímero de β -ciclodextrina-cistamina **8**

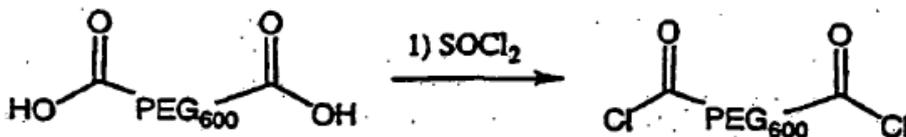
Se añadieron 100 mg ($7,38 \times 10^{-5}$ mol) de **2** y 5 ml de acetonitrilo a una disolución de 166,2 mg ($7,38 \times 10^{-5}$ mol) de diclorhidrato de cistamina en 15 ml de NaOH 0,1 N. Se calentó a 80°C la disolución homogénea resultante durante 2 h antes de someterla a cromatografía de permeación en gel (GPC) en resina Toyopearl HW40F. Se analizaron las fracciones por GPC y se liofilizaron las fracciones apropiadas, proporcionando 17,2 mg (19%) de un polvo amorfo incoloro.

Ejemplo de preparación 9: Dihidrazida de polietilenglicol 600 **9**

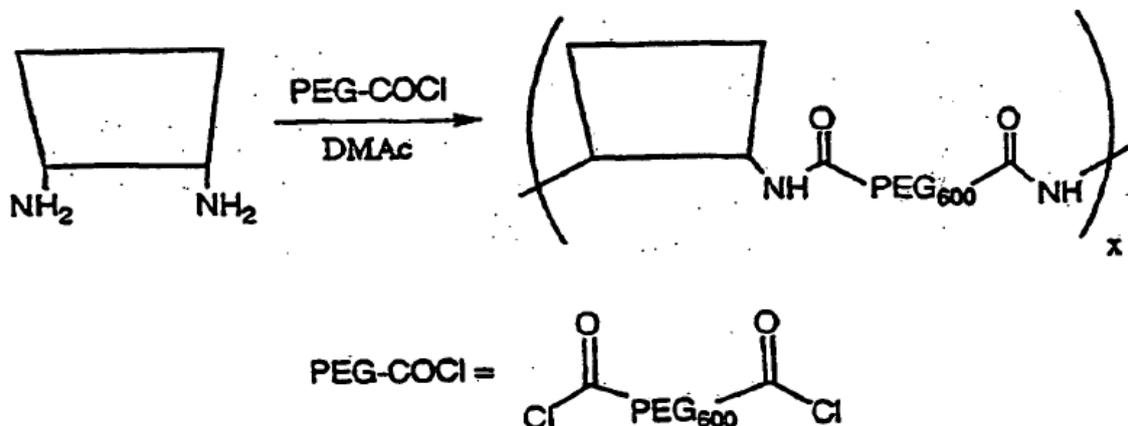
Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra agitadora magnética y un condensador de reflujo con 1,82 g (3,0 mmol) de polietilenglicol 600 (Fluka Chemical Corp de Milwaukee, WI), 40 ml de etanol absoluto (Quantum Chemicals Pty Ltd. de Tuscola, IL) y unas pocas gotas de ácido sulfúrico. Se calentó a reflujo la disolución resultante durante 14 h. Se añadió carbonato de sodio sólido para inactivar la reacción y se transfirió la disolución del diéster de PEG bajo atmósfera de nitrógeno a un embudo de adición. Se añadió entonces gota a gota esta disolución a una disolución de 0,6 ml (9,0 mmol) de hidrato de hidrazina (Aldrich) en 10 ml de etanol absoluto. Se formó una pequeña cantidad de precipitado turbio. Se calentó a reflujo la disolución resultante durante 1 h antes de filtrar y concentrar. El análisis de GPC reveló una impureza de alto peso molecular que contaminaba el producto. La cromatografía de permeación en gel en resina Toyopearl HW-40 posibilitó una purificación parcial de este material hasta aproximadamente un 85% de pureza.

Ejemplo comparativo 10: Oxidación del copolímero de β -ciclodextrina-DSS **6** para obtener **10** (Hisamatsu *et al.*, Starch 44, 188-191 (1992))

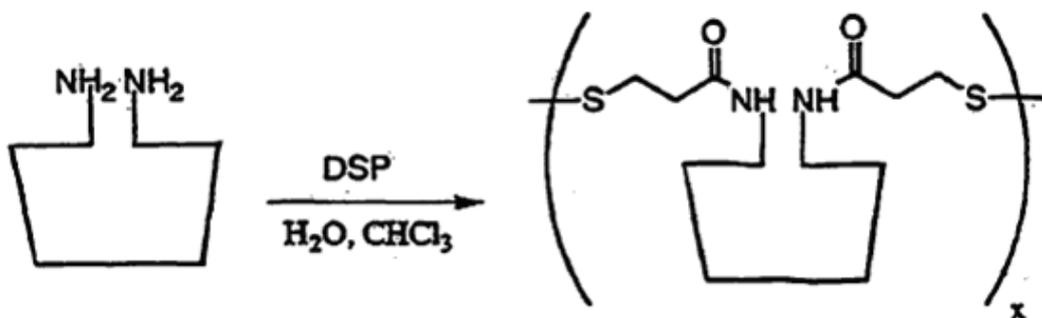
Se disolvió el copolímero de β -ciclodextrina-DSS **6** (92,8 mg, $7,3 \times 10^{-5}$ mol) en 1,0 ml de agua y se enfrió en baño de hielo antes de añadir 14,8 mg ($7,3 \times 10^{-5}$ mol) de peryodato de sodio. La disolución se volvió inmediatamente amarilla brillante y se dejó agitar en la oscuridad a 0°C durante 14 h. Se sometió entonces la disolución a cromatografía de permeación en gel (GPC) en resina Toyopearl HW-40 usando agua como eluyente. Se analizaron las fracciones por GPC. Se combinaron las fracciones apropiadas y se liofilizaron hasta sequedad, proporcionando 84,2 mg (91%) de un sólido amorfo marrón claro.

Ejemplo de preparación 11: Cloruro de diácido de polietilenglicol (PEG) 600 **11**

Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml equipado con una barra agitadora magnética y un condensador de reflujo con 5,07g (aprox. 8,4 mmol) de diácido de polietilenglicol 600 (Fluka Chemical Corp. de Milwaukee, WI) y 10 ml de cloroformo anhidro (Aldrich). Se añadieron a esta disolución agitada 3,9 ml (53,4 mmol) de cloruro de tionilo (Aldrich) y se calentó la disolución resultante a reflujo durante 1 h, siendo evidente el desprendimiento de gas durante dicho tiempo. Se dejó enfriar la disolución resultante a temperatura ambiente antes de retirar el disolvente y el cloruro de tionilo en exceso a vacío. Se almacenó el aceite resultante en una cubeta seca y se usó sin purificación.

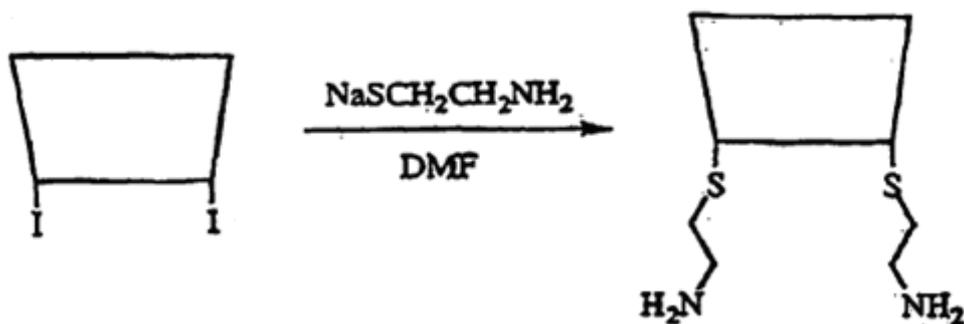
Ejemplo 12: Copolímero de β -ciclodextrina-PEG 600 12

5 Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con una disolución de 112,5 mg ($8,95 \times 10^{-5}$ mmol) de la sal bis(hidrogenocarbonato) de 6^A,6^D-diamino-6^A,6^D-desoxi- β -ciclodextrina, 50 μl ($3,6 \times 10^{-4}$ mol) de trietilamina (Aldrich) y 5 ml de *N,N*-dimetilacetamida (DMAc, Aldrich) anhidra. Se trató entonces la suspensión resultante con 58 mg ($9,1 \times 10^{-5}$ mol) del cloruro de diácido de polietilenglicol 600 11. Se agitó la disolución resultante con un mezclador Vortex durante 5 minutos y se dejó reposar entonces a 25°C durante 1 h, volviéndose homogénea durante dicho tiempo. Se retiró el disolvente a vacío y se sometió el residuo a cromatografía de permeación en gel en resina Toyopearl HW-40F usando agua como eluyente. Se analizaron las fracciones por GPC y se liofilizaron las fracciones apropiadas, proporcionando 115 mg (75%) de un polvo incoloro amorfo.

Ejemplo comparativo 13: Copolímero de β -ciclodextrina-DSP 13

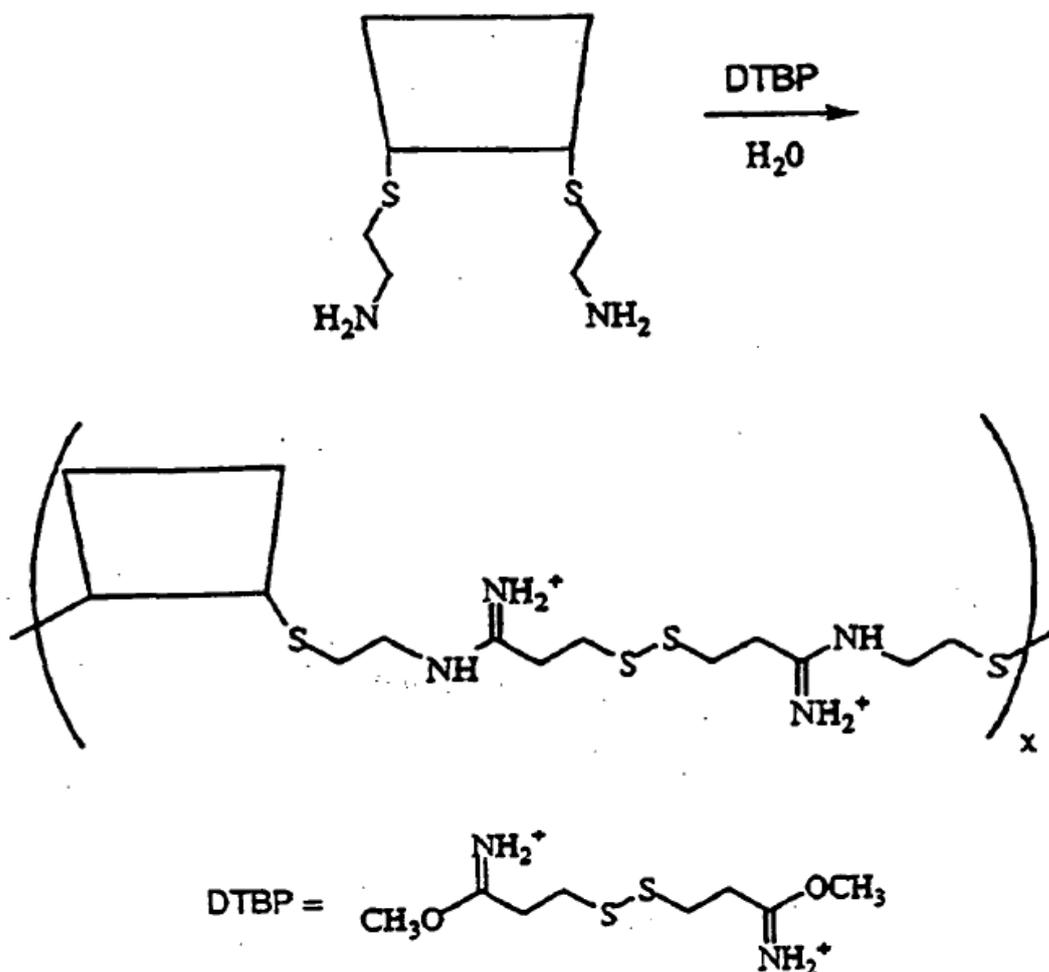
15 Se cargó un vial de 8 ml con una disolución de 102,3 mg ($8,80 \times 10^{-5}$ mol) de 2^A,3^A-diamino-2^A,3^A-desoxi- β -ciclodextrina en 1 ml de agua. Se ajustó el pH de la disolución a 10 con NaOH 1 M antes de añadir una disolución de 36,4 mg ($8,80 \times 10^{-5}$ mol) de ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP, Pierce Chemical Co. de Rockford, IL) en 1 ml de cloroformo. Se agitó la mezcla de reacción bifásica resultante con un mezclador Vortex durante 0,5 h. Se decantó entonces la fase acuosa y se extrajo con 3 x 1 ml de cloroformo reciente. Se sometió entonces la disolución polimérica acuosa a cromatografía de permeación en gel.

20 Ejemplo de preparación 14: 6^A,6^D-Bis-(2-aminoetiltilio)-6^A,6^D-desoxi- β -ciclodextrina 14 (Tabushi, I.; Shimokawa, K.; Fugita, K.; Tetrahedron Lett. 1977, 1527-1530)



5 Se cargó un matraz Schlenk de 25 ml equipado con una barra agitadora magnética y un tapón de caucho con 0,91 ml (7,37 mmol) de una disolución de 2-aminoetiltiolato de sodio 0,81 M en etanol (Fieser, L.F.; Fieser, M. "Reagents for Organic Synthesis"; Wiley: Nueva York, 1967; vol. 3, pág. 265-266). Se evaporó la disolución hasta sequedad y se redisolvió el sólido en 5 ml de DMF anhidra (Aldrich). Se añadió 6^A,6^D-diyodo-6^A,6^D-desoxi-β-ciclodextrina (100 mg, 7,38 x 10⁻⁵ mol) y se agitó la suspensión resultante a 60°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se concentró la disolución a vacío y se redisolvió el residuo en agua. Después de acidificar con HCl 0,1 M, se aplicó la disolución a una columna de intercambio iónico Toyopearl SP-650M (en forma de NH₄⁺) y se eluyó el producto con un gradiente de bicarbonato de amonio de 0 a 0,4 M. Se combinaron las fracciones apropiadas y se liofilizaron hasta sequedad. Esto proporcionó 80 mg (79%) de **14** en forma de un polvo blanco.

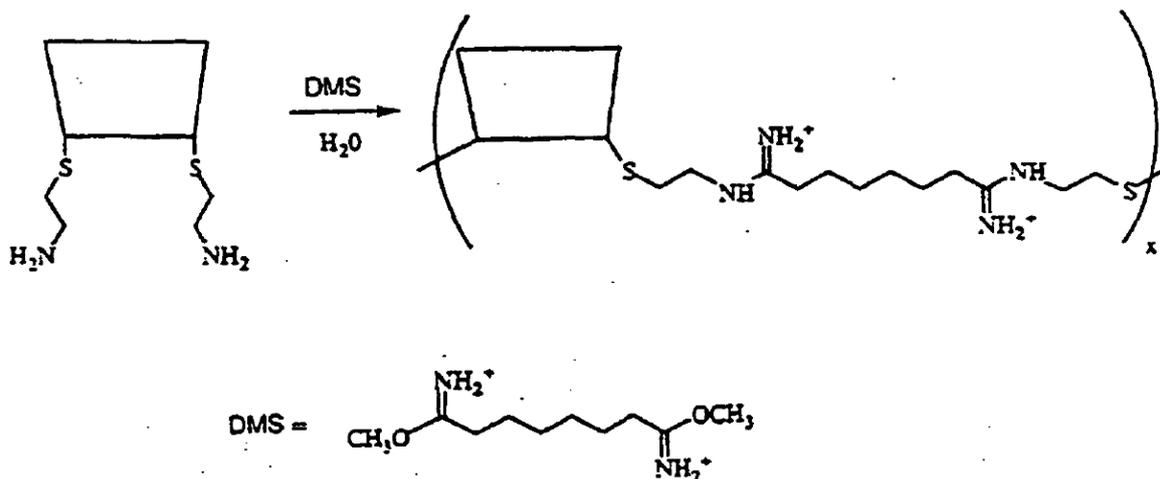
10 Ejemplo comparativo 15: Copolímero de β-ciclodextrina(cistamina)-DTBP **15**



15 Se cargó un vial de 4 ml con una disolución de 19,6 mg (1,42 x 10⁻⁵ mol) de la sal bis(hidrogenocarbonato) de **14** en 0,5 ml de NaHCO₃ 0,1 M. Se enfrió la disolución en baño de hielo antes de añadir 4,4 mg (1,4 x 10⁻⁵ mol) de 3,3'-

5 ditiobispropionimidato de dimetilo·2 HCl (DTBP, Pierce). Se agitó entonces la disolución resultante con un mezclador Vortex y se dejó reposar a 0°C durante 1 h. Se inactivó la reacción con Tris-HCl 1 M antes de acidificar a pH 4 con HCl 0,1 N. Se sometió entonces la disolución polimérica acuosa a cromatografía de permeación en gel en resina Toyopearl HW-40F. Se analizaron las fracciones por GPC y se liofilizaron las fracciones apropiadas hasta sequedad. Esto proporcionó 21,3 mg (100%) de **15** en forma de un polvo blanco.

Ejemplo 16: Copolímero de β-ciclodextrina(cistamina)-DMS **16**



10 Se cargó un matraz Schlenk de 10 ml equipado con una barra agitadora magnética y un tapón de goma con 200 mg (1,60 x 10⁻⁴ mol) de **14**, 44 μl (3,2 x 10⁻⁴ mol) de trietilamina (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI), 43,6 mg (1,60 x 10⁻⁴ mol) de suberimidato de dimetilo·2HCl (DMS, Pierce) y 3 ml de DMF anhidra (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI). Se calentó la suspensión densa resultante a 80°C durante 18 horas bajo corriente continua de nitrógeno, evaporándose durante dicho tiempo la mayoría del disolvente. Se redisolvió el residuo que quedó en 10 ml de agua y se acidificó entonces la disolución resultante con HCl al 10% hasta pH 4. Se pasó entonces esta disolución a través de un filtro de centrifuga Amicon Centricon Plus-20 5.000 NMWL. Después de lavar con 2 porciones de 10 ml de agua, se liofilizó la disolución polimérica hasta sequedad, proporcionando 41,4 mg (18%) de un sólido amorfo blanquecino.

Ejemplo comparativo 17: Unión del ligando folato a polímero de ciclodextrina

1. Acoplamiento de resina:

20 Se disuelven 50 mg de Fmoc-PEG₃₄₀₀-NHS (Shearwater Polymers, Inc. de Huntsville, AL) en 1 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra y se añaden a 10 equivalentes de resina de 2-clorotritilhidrazida (Novabiochem USA de La Jolla, CA) hinchada con DMF. Se agita la mezcla a 60°C hasta que se acopla todo el polímero a la resina, como se determina mediante un sistema GPC equipado con un detector de UV. Se transfiere entonces la resina-polímero a una columna de vidrio sinterizado para todas las reacciones adicionales.

2. Bloqueo de resina:

25 Se bloquean los grupos hidrazida no reaccionados en las resinas con anhídrido acético y se neutralizan los productos de ácido acético con diisopropiletilamina.

3. Retirada del grupo protector:

Se retira el grupo protector Fmoc mediante dos lavados con piperidina al 20% en DMF (1 ml de volumen total). Se lava entonces la resina 10 veces con 1 ml de DMF y 5 veces con 1 ml de H₂O.

30 4. Acoplamiento de ácido fólico:

35 Se añaden 10 equivalentes de ácido fólico y 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) a la resina junto con 1,5 ml de H₂O. Se añade NaOH 1 N a la mezcla de reacción hasta que se disuelve el ácido fólico (aproximadamente pH 10). Se dispone entonces la columna de vidrio en un rotor y se mezcla durante una noche. Se lava entonces la resina 10 veces con 1 ml de NaOH (1 N), 10 veces con 1 ml de bicarbonato de sodio 50 mM y entonces 5 veces cada una con agua, THF y diclorometano.

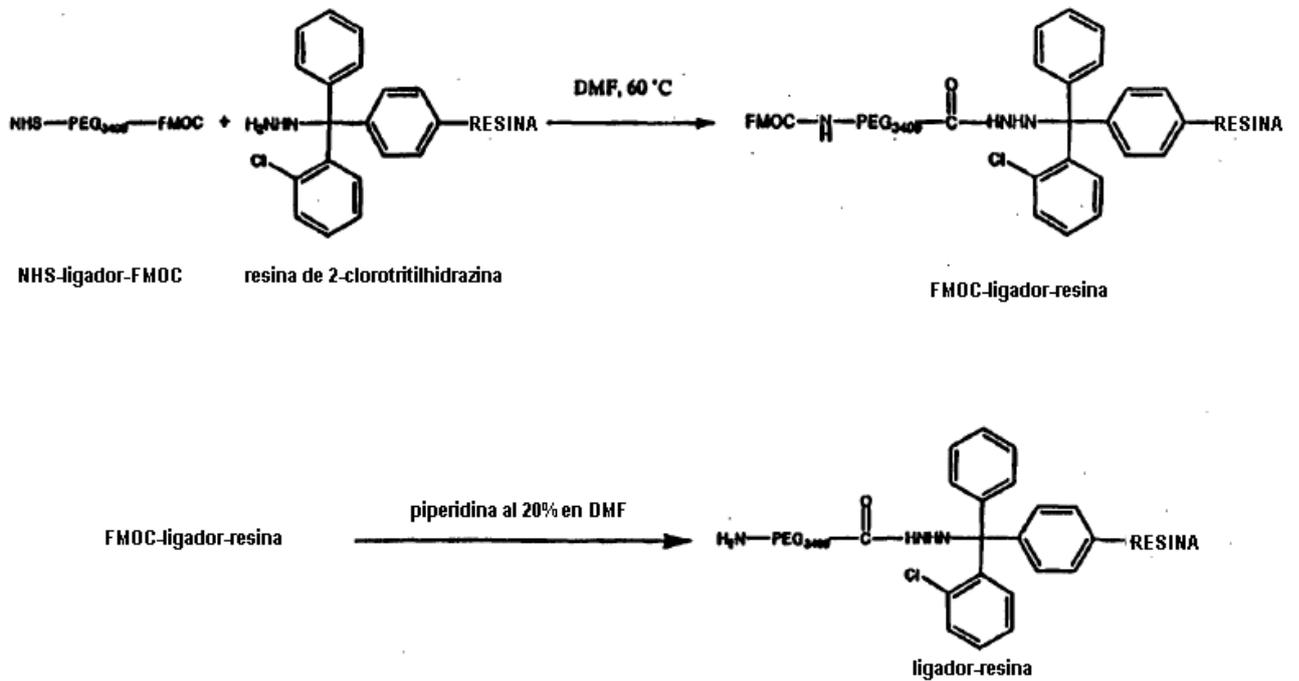
5. Escisión de resina:

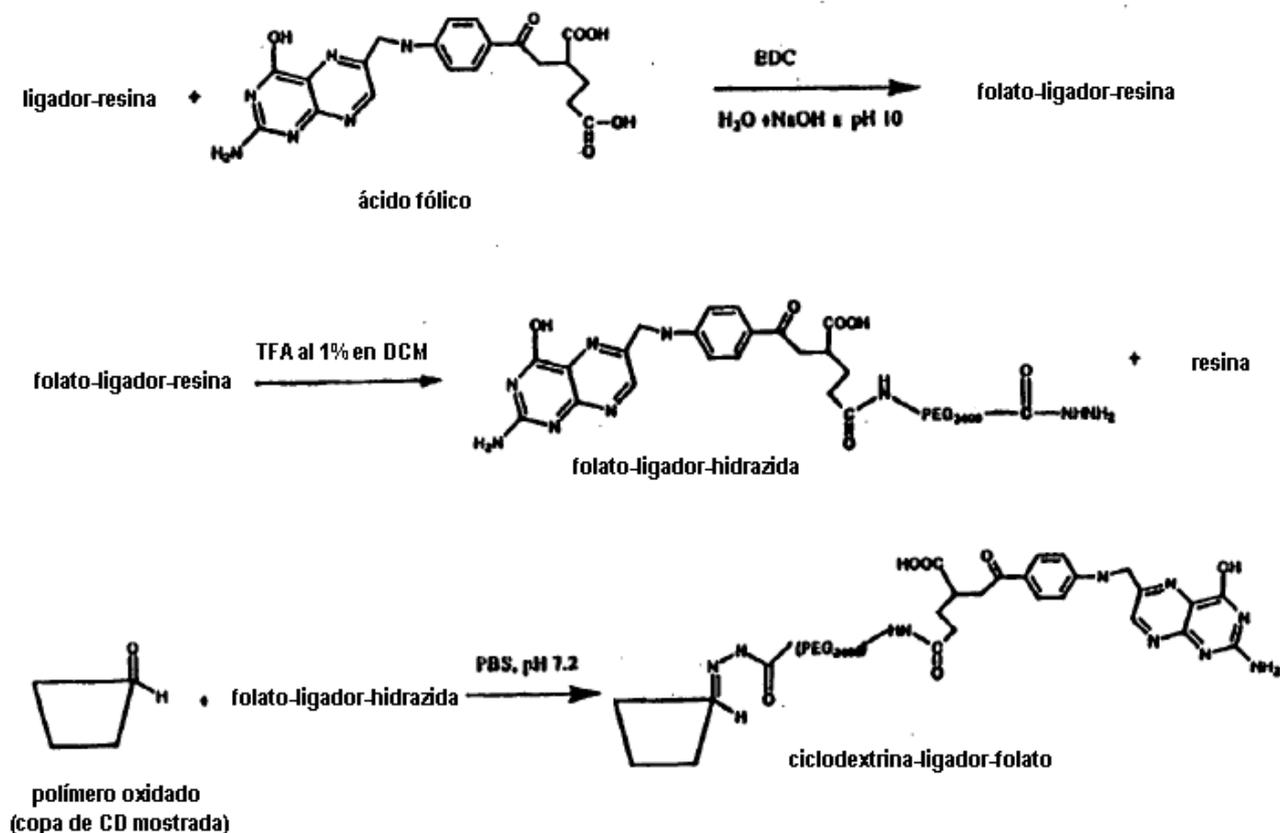
Se añade ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en 1 ml de DCM a la resina dos veces durante 1 minuto cada vez. Se recoge el sobrenadante y se evapora el DCM. Se rehidrata la película aceitosa resultante con H₂O y se liofiliza, dando como resultado un polvo amarillo claro. Se toma una RMN para confirmar la presencia del polímero de PEG.

5 6. Acoplamiento con polímero:

Se hace reaccionar el ácido fólico-ligador con 6 equivalentes de copolímero de ciclodextrina (oxidado como en el ejemplo 10) mezclando en borato 50 mM (pH 8,5). Se analiza la mezcla de reacción y se confirma el polímero de conjugación mediante un sistema de GPC con detección UV a 285 nm.

UNIÓN DEL LIGANDO FOLATO AL POLÍMERO DE CICLODEXTRINA





Ejemplo comparativo 18: Unión del ligando folato al polímero de ciclodextrina

1. Acoplamiento:

- 5 Se añadieron 36 mg de carbazato de *tert*-butilo disueltos en 240 μl de DCM/acetato de etilo (1:1) a 260 mg de Fmoc-PEG₃₄₀₀-NHS (Shearwater Polymers) y se mezclaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se precipitó el producto dos veces con acetato de etilo/éter (1:1).

2. Retirada del grupo protector:

Se retiró el grupo protector Fmoc con piperidina al 20% en DMF. Se retiró el disolvente a vacío y se redisolvió el producto en 1,3 ml de DMSO.

10 3. Acoplamiento de ácido fólico:

Se añadieron entonces 1,2 equivalentes de ácido fólico y DCC y una gota de piridina y se agitó la disolución resultante en la oscuridad a temperatura ambiente durante 6 horas. Se retiró el DMSO a vacío y se confirmó la conjugación de ácido fólico mediante GPC con monitorización UV a 285 nm.

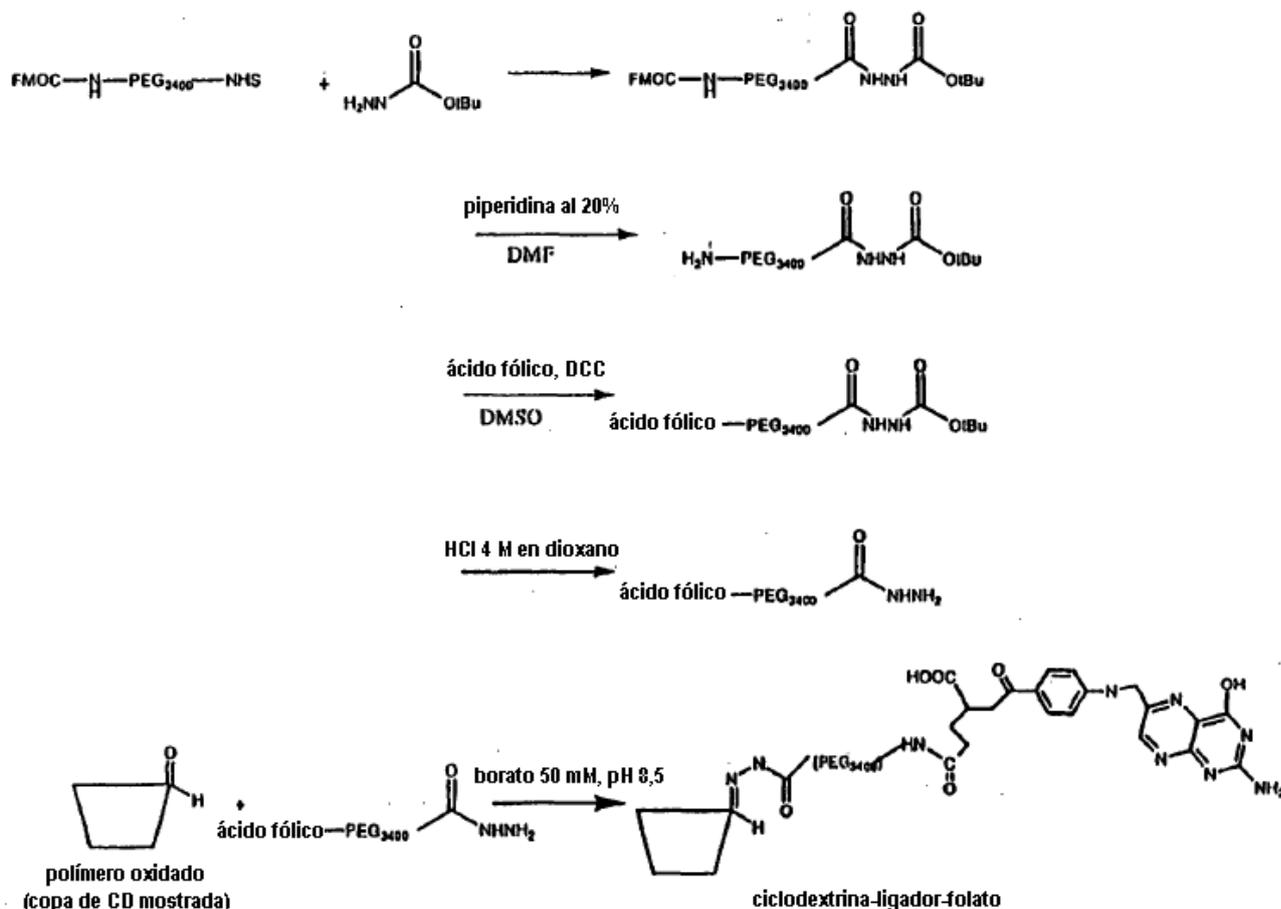
4. Retirada del grupo protector de hidrazida:

15 Finalmente, se desprotegió la hidrazida agitando en HCl 4 M en dioxano durante 1 hora antes de retirar el disolvente a vacío. Se purificó el producto final mediante cromatografía en columna Toyopearl HW-40F.

5. Acoplamiento con polímero:

20 Se hace reaccionar el ácido fólico-ligador con 6 equivalentes de copolímero de ciclodextrina (oxidado como en el ejemplo 10) mezclando en borato 50 mM (pH 8,5). Se analiza la mezcla de reacción y se confirma el polímero de conjugación mediante un sistema GPC con detección UV a 285 nm.

SÍNTESIS DE ÁCIDO FÓLICO-PEG-HIDRAZIDA



Ejemplo comparativo 19: Unión del ligando transferrina al polímero de ciclodextrina

1. Oxidación de transferrina:

- 5 Se disuelven 500 mg de transferrina humana exenta de hierro (Sigma de St. Louis, MI) en tampón acetato de sodio 30 mM y se enfrían a 0°C. Se añaden a esta disolución 20 mg de peryodato de sodio disueltos en 4 µl de acetato de sodio 30 mM. Se agita la mezcla a 0°C durante una noche. A continuación, se añade gota a gota 1 g de resina AG501-X8 (Biorad) para retirar las sales antes de liofilizar la disolución.

2. Acoplamiento de resina:

- 10 Se disolvieron 20 mg de Fmoc-PEG₃₄₀₀-NHS (Shearwater Polymers; Inc. de Huntsville, AL) en 0,5 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF) y se añadieron a 10 equivalentes de resina de 2-clorotritilhidrazida (Novabiochem USA de LaJolla, CA) hinchada con DMF. Se agitó la mezcla a 60°C hasta que se acopló todo el polímero con la resina, determinado mediante un sistema de GPC equipado con un detector ultravioleta (UV). Se transfirió entonces la resina-polímero a una columna de vidrio sinterizado para todas las reacciones adicionales.

- 15 3. Bloqueo de resina:

Se bloquearon los grupos hidrazida no reaccionados en las resinas con anhídrido acético y se neutralizaron los productos de ácido acético mediante diisopropiletilamina.

4. Retirada del grupo protector:

- 20 Se retiró el grupo protector Fmoc mediante dos lavados con piperidina al 20% en DMF (1 ml de volumen final). Se lavó entonces la resina 10 veces con 1 ml de DMF y 5 veces con 1 ml de H₂O.

5. Acoplamiento de transferrina:

Se añaden a la resina 1,2 equivalentes de transferrina disueltos en carbonato de sodio 0,05 M y tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 9,5. Se añade entonces cianoborohidruro 5 M en NaOH 1 N a la disolución. Se dispone la columna

de vidrio en un rotor y se mezcla durante 2 horas. Se lava entonces la resina 15 veces con agua y 5 veces con tetrahidrofurano (THF) y DCM cada vez.

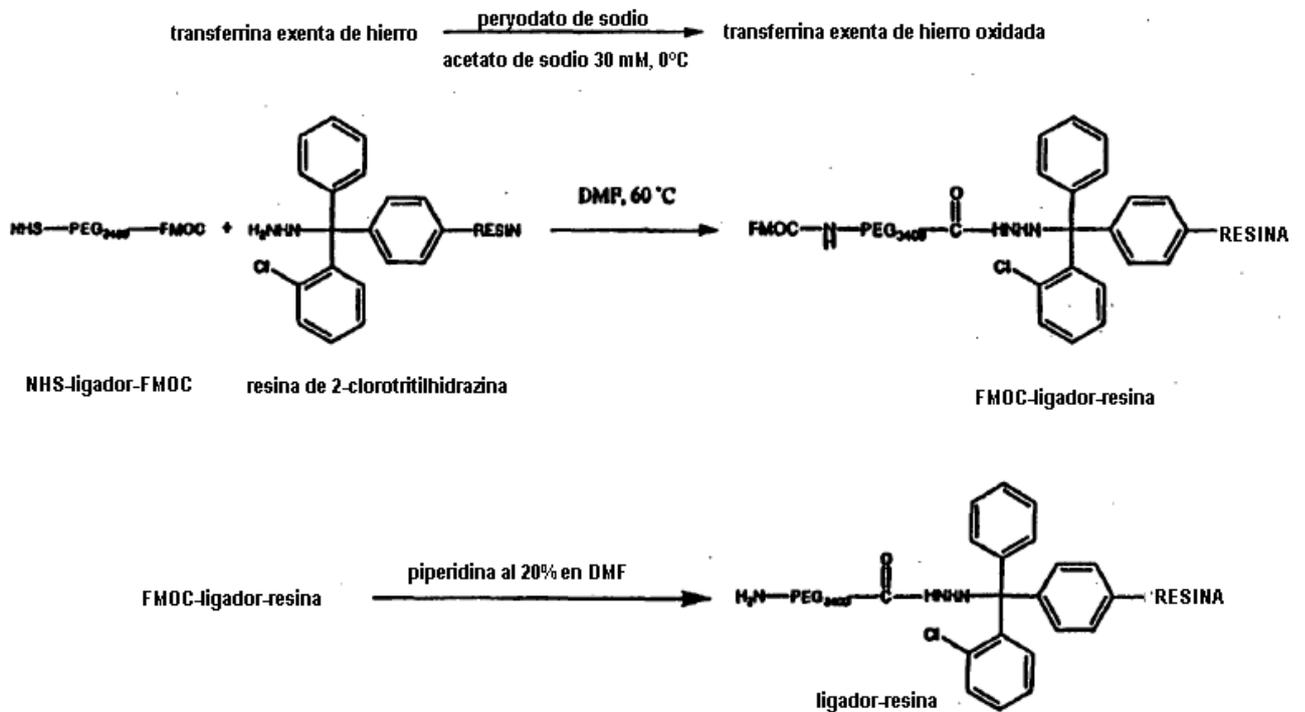
6. Escisión de resina:

5 Se añaden ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en 1 ml de DCM a la resina dos veces durante 1 minuto cada vez. Se recoge entonces el sobrenadante y se evapora el DCM. Se rehidrata la película oleosa resultante con H₂O y se liofiliza.

7. Acoplamiento con polímero:

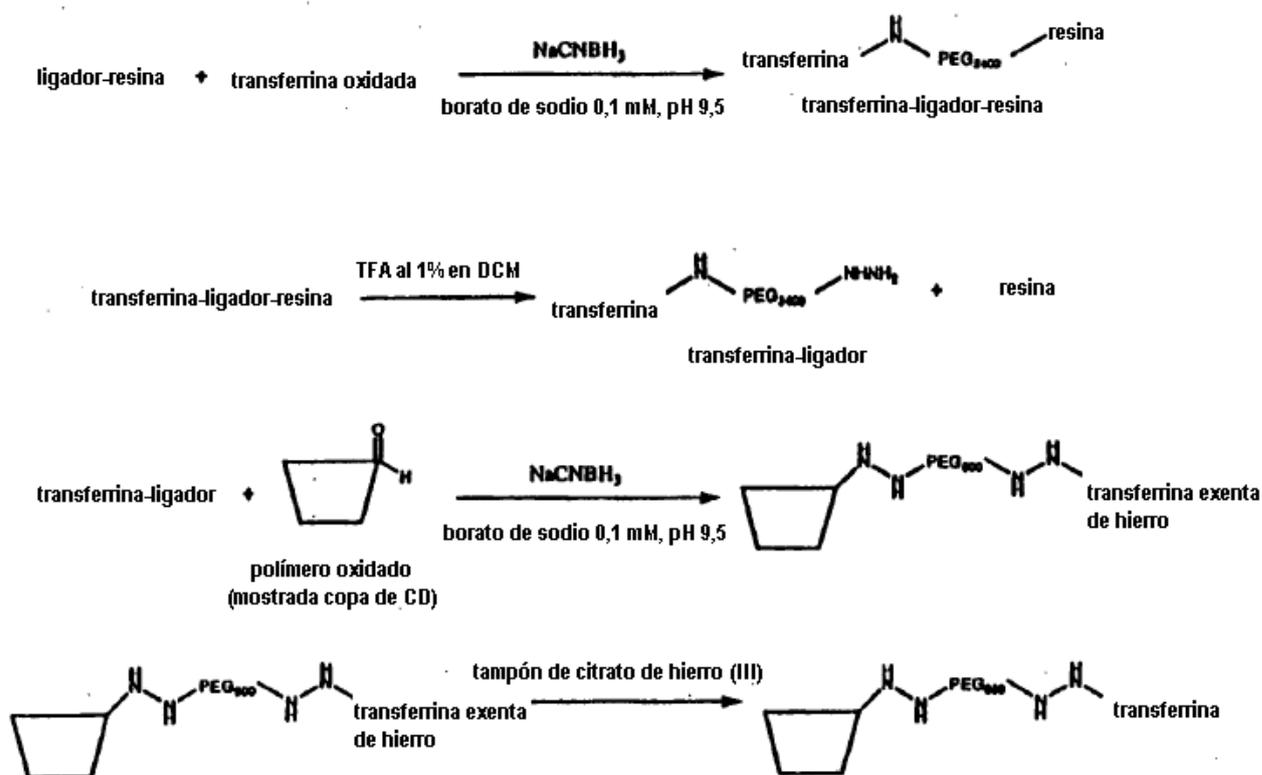
10 Se hace reaccionar el ligador transferrina con 6 equivalentes de copolímero de ciclodextrina mediante aminación reductiva con cianoborohidruro de sodio: en primer lugar, se añade el copolímero al ligador transferrina disuelto en carbonato de sodio 0,05 M y tampón citrato de sodio 0,1 M. Se añade cianoborohidruro 5 M en NaOH 1 N y se agita la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. Se bloquean los sitios de aldehído no reaccionados añadiendo etanolamina y se hacen reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se purifica el conjugado resultante mediante diálisis.

UNIÓN DE TRANSFERRINA AL POLÍMERO DE CICLODEXTRINA



15

UNIÓN DE TRANSFERRINA AL POLÍMERO DE CICLODEXTRINA



Ejemplo comparativo 20: Procedimiento general para la complejación de copolímero de ciclodextrina con moléculas pequeñas

- 5 Se disuelve un copolímero basado en ciclodextrina (polímero de CD) en agua, tampón o disolvente orgánico a la concentración apropiada. Se disuelve la molécula pequeña en un disolvente miscible con el disolvente de la disolución del polímero de CD y se añade entonces a la disolución del polímero de CD. Se agita entonces la mezcla durante 0,5 horas y se permite entonces llegar al equilibrio durante una noche.

Ejemplo comparativo 21: Complejación del copolímero de ciclodextrina con doxorubicina

- 10 Se disolvieron doxorubicina y polímero de CD a diversas concentraciones en PBS (disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,2). Se determinó la constante de asociación entre la CD y la doxorubicina midiendo el grado de aumento de la fluorescencia de doxorubicina tras la complejación con la CD (la interacción hidrofóbica entre la CD y la doxorubicina potencia la intensidad de fluorescencia). La constante de asociación era de aproximadamente 200 M^{-1} a pH 7,1. La adición de β -CD potenció consistentemente la fluorescencia de doxorubicina, indicando complejación
- 15 entre el polímero de CD y la doxorubicina. Husain *et al.*, *Applied Spectroscopy* vol. 46, n° 4, 652-658 (1992) encontraron que la constante de asociación entre β -CD y doxorubicina es de 210 M^{-1} a pH 7,1.

Ejemplo 22: Suministro de moléculas pequeñas a células cultivadas

- 20 Se aplicaron medios que contenían doxorubicina y complejos de doxorubicina/polímero de CD a diversas concentraciones a estirpes celulares cultivadas. Después de 5 horas, se retiraron los medios y se reemplazaron por medios recientes. Se determinó el efecto de la doxorubicina sobre la supervivencia celular mediante el ensayo de toxicidad con MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio] (R. Ian Feshney, "Culture of Animal Cells", 3ª ed., Wiley-Liss: Nueva York (1994)). Se ilustran los resultados en la tabla siguiente. Los copolímeros **15** o **16** ($138 \mu\text{M}$ de equivalentes de monómero de CD) no eran tóxicos para las estirpes celulares KB ni KB-VI (un derivado resistente a múltiples fármacos de KB) en ausencia de doxorubicina. Para el suministro mediado por receptor, se liga
- 25 covalentemente un ligando tal como folato con el polímero de CD usado para la complejación de doxorubicina.

Estirpe celular	Polímero de CD	Cl ₅₀ (μM de doxorubicina)
KB	Ninguno	-0,1
KB-VI (resistencia a múltiples fármacos)	Ninguno	-10
KB-VI	Copolímero 15 o 16 (138 μM de equivalentes de monómero de CD)	~2-3

Ejemplo comparativo 23: Complejación de copolímero cargado permanentemente fijado con plásmido

En general, se mezclan volúmenes iguales de disoluciones de polímero de CD cargado fijado y plásmido de ADN a las relaciones de carga de polímero:plásmido apropiadas. Se deja equilibrar entonces la mezcla y autoensamblar a temperatura ambiente durante una noche. Se monitoriza el éxito de la complejación transfiriendo una pequeña alícuota de la mezcla a gel de agarosa al 0,6% y comprobando la movilidad del ADN. El ADN se desplaza bajo el voltaje aplicado, mientras que el ADN complejado queda retrasado en el pocillo.

Se mezcló 1 μg de ADN a una concentración de 0,2 μg/μl en agua destilada con 10 μl de copolímero **15** a relaciones de carga de amina polimérica:fosfato de ADN de 2, 4, 6, 12, 24, 36, 60 y 120. Se mezcló manualmente la disolución mediante una micropipeta y se mezcló suavemente entonces en un rotor de laboratorio. Se añadieron tampón de carga 1 μg/μl (sacarosa al 40%, azul de bromofenol al 0,25% y tampón Tris-acetato 200 mM que contenía EDTA 5 mM) (Gao *et al.*, *Biochemistry* 35: 1027-1036 (1996)) a cada disolución la mañana siguiente. Se cargó cada muestra de ADN/polímero en un gel de electroforesis de agarosa al 0,6% que contenía 6 μg de EtBr/100 ml en tampón 1 x TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y se aplicaron 40 V al gel durante 1 hora. Se indicó la extensión de la complejación de ADN/polímero mediante el retraso del ADN en el patrón de migración del gel. El polímero (15) retardó el ADN a relaciones de carga de 6 y superiores, indicando complejación en esas condiciones.

Ejemplo 24: Complejación de copolímero reticulado con plásmido

Se oxida copolímero **15** o copolímero **16** como en el ejemplo 10. Se compleja entonces el copolímero **15** o **16** oxidado con un plásmido de ADN como en los ejemplos 23 y 26. Se añade entonces un agente de reticulación (por ejemplo, dihidrazida de PEG₆₀₀) para encapsular el ADN. Se determina el éxito de la encapsulación mediante dispersión de luz y se visualiza mediante microscopía electrónica.

Ejemplo comparativo 25: Complejación de copolímero cargado variablemente (sensible al pH) con plásmido

Se mezclan volúmenes iguales de disoluciones de polímero de CD y plásmido de ADN en agua a relaciones de carga de polímero/plásmido apropiadas. Se ajusta el pH de la mezcla formando un polímero de CD cargado. Se deja equilibrar y autoensamblar entonces la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añade entonces un agente de reticulación (por ejemplo, dihidrazida de PEG₆₀₀) para encapsular el ADN. Se añade entonces una disolución tampón concentrada para neutralizar el pH y por tanto el polímero de CD. Se determina el éxito de la encapsulación mediante dispersión de luz y se visualiza mediante microscopía electrónica.

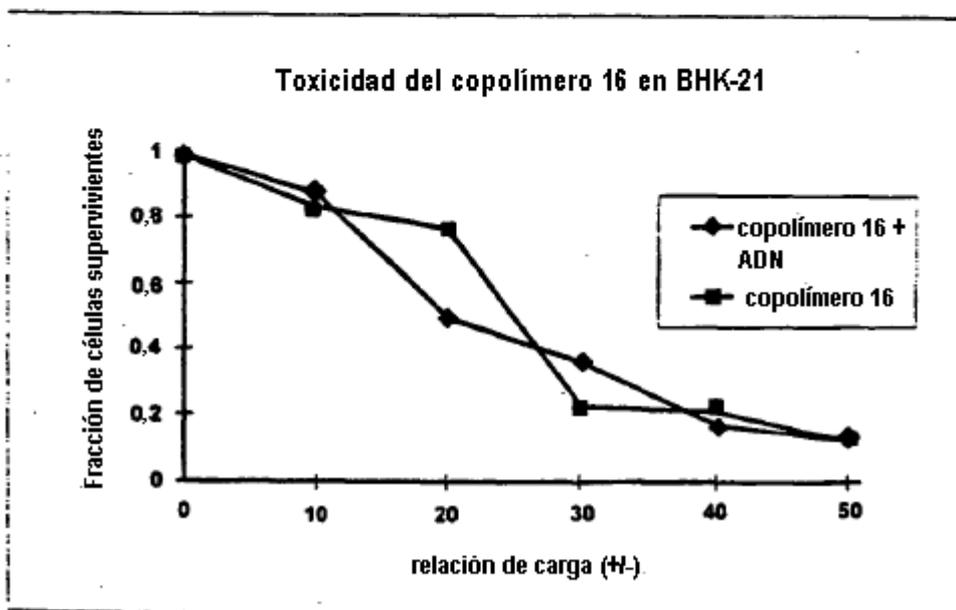
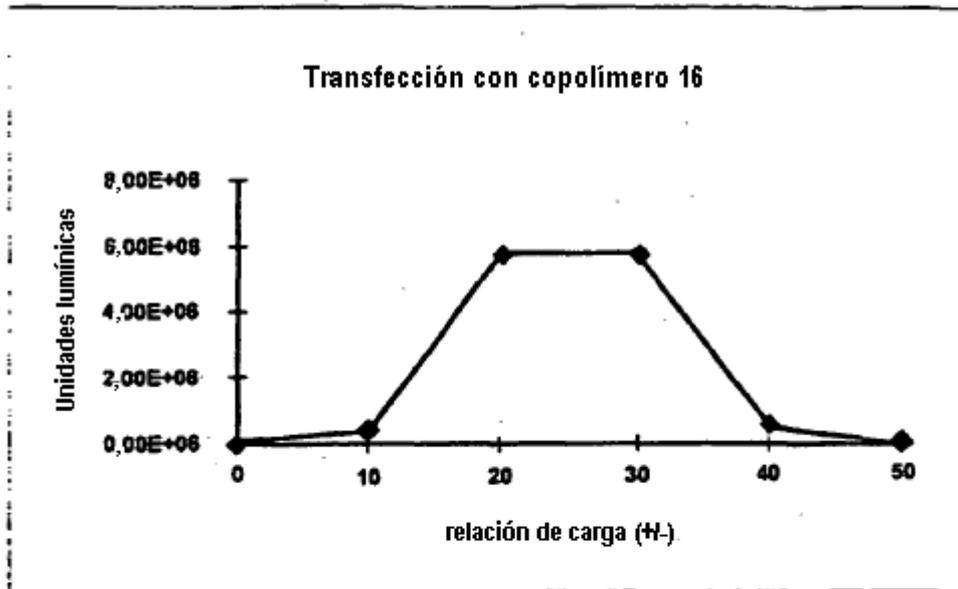
Ejemplo comparativo 26: Estudios de transfección con plásmidos que codifican el gen informador de luciferasa

Se sembraron células BHK-21 en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 60.000 células/pocillo 24 horas antes de la transfección. Se encapsularon los plásmidos que codifican el gen de luciferasa por el polímero de CD como en los ejemplos 23 o 25, de tal modo que los complejos de ADN/polímero se ensamblaron a relaciones de carga de amina polimérica:fosfato de ADN de 6, 12, 24, 36 y 60 como se describe en los estudios de unión de ADN del Ejemplo 23. Se añadió una disolución de medio que contenía complejos de ADN/polímero a las células cultivadas y se reemplazó por medio reciente después de 5 horas de incubación a 37°C. Se lisaron las células 48 horas después de la transfección. Se añadieron sustratos apropiados para el ensayo lumínico de luciferasa al lisado celular. Se cuantificó la actividad luciferasa, medida en términos de unidades luminosas producidas, mediante un luminómetro. Los complejos de ADN/polímero transfectaron exitosamente células BHK-21 a relaciones de carga de 6, 12 y 24. Se usó también lisado celular para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de proteína de Lowry (Lowry *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, 265-275 (1951)). Se observó una toxicidad máxima a relaciones de carga de amina polimérica:fosfato de ADN de 36 y 60, con un 91% de supervivencia celular.

Ejemplo 27: Estudios de transfección con plásmidos que codifican el gen informador de luciferasa

Se sembraron células BHK-21 en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 60.000 células/pocillo 24 h antes de la transfección. Se encapsularon los plásmidos que codificaban el gen de luciferasa por el polímero de CD del Ejemplo 23, excepto porque se reemplazó el copolímero **15** por el copolímero **16** y porque los complejos de ADN/polímero transfectaron exitosamente las células BHK-21 a relaciones de carga de 10, 20, 30 y 40, con transfección máxima a una relación de carga de amina polimérica:fosfato de ADN de 20. Se añadió disolución de

5 medio que contenía complejos de ADN/polímero a las células cultivadas y se reemplazó por medio reciente después de 24 horas de incubación a 37°C. Se lisaron las células 48 horas después de la transfección. Se añadieron sustratos apropiados para el ensayo lumínico de luciferasa al lisado celular. Se cuantificó la actividad luciferasa, medida en términos de unidades luminosas producidas, mediante un luminómetro. Se ilustran los resultados a continuación. Los complejos de ADN/polímero transfectaron exitosamente células BHK-21 a relaciones de carga de 6, 12 y 24. Se usó también lisado celular para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de proteína de Lowry (Lowry *et al.*, Journal of Biological Chemistry, vol. 193, 265-275 (1951)). Los resultados se ilustran a continuación. Se observó la toxicidad máxima a una relación de carga de amina polimérica:fosfato de ADN de 40 y 50, con un 33% de supervivencia celular.



10

Ejemplo 28: Estudios de transfección con plásmidos que codifican el gen informador *GFP*

5 Se encapsulan plásmidos que codifican la proteína fluorescente verde mediante el copolímero de CD como en los Ejemplos 23 o 25. Se añade disolución de medio que contiene los complejos de ADN/polímero a las células cultivadas y se reemplaza por medio reciente después de 5 horas de incubación a 37°C. Se desprenden las células de la superficie con tripsina, se lavan y se resuspenden en disolución salina equilibrada de Hanks con yoduro de propidio. Se analizan entonces las células mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se determina la viabilidad celular mediante el tamaño de la célula y la exclusión con yoduro de propidio, y el éxito de transfección mediante la fluorescencia de la proteína GFP.

Ejemplo comparativo 29: Complejación de polímero con oligonucleótidos

10 Se logra la complejación con oligonucleótidos anticodificantes siguiendo los procedimientos para la complejación de plásmido de los Ejemplos 23 o 25.

Ejemplo comparativo 30: Estudios de transfección con oligonucleótidos

15 Se encapsulan oligonucleótidos anticodificantes dirigidos hacia el gen de luciferasa mediante el polímero de CD descrito en el Ejemplo 29. Se añade disolución de medio que contiene los complejos de oligonucleótido/polímero a células HeLa X1/5 (células HeLa que expresan constitutivamente el gen de luciferasa, donadas por CLONTECH) y se reemplaza por medios recientes después de 5 horas de incubación a 37°C. Se lisan las células 48 horas después de la transfección y se añaden sustratos apropiados para el ensayo de luciferasa a los lisados. Se cuantifica la actividad luciferasa, medida en términos de unidades lumínicas producidas, mediante un luminómetro. Se determina el éxito de la transfección mediante la inactivación génica de la actividad luciferasa.

Ejemplo comparativo 31: Toxicidad del copolímero de β-ciclodextrina(cistamina)-DTBP **15**

20 Se investigó la toxicidad aguda del copolímero **15** usando "ratones blancos" Swiss-Webster. Se usaron un total de 48 ratones como se describe en la tabla siguiente. Se administraron a los ratones inyecciones individuales intravenosas (iv) o intraperitoneales (ip) de disoluciones salinas estériles o de copolímero **15**. Se siguió a los animales durante 5 días, después de lo cual se sacrificaron y se efectuó una necropsia macroscópica. No se observó mortalidad ni toxicidad.

Nº de grupo	Nº/sexo (M/H)	Copolímero	Concentración (mg/ml)	Volumen de dosis (ml)	Dosis (mg)	Régimen de tratamiento
1	3/3	Copolímero 15	0,5275	0,1	0,05	iv, una vez
2	3/3	Copolímero 15	5,275	0,1	0,53	iv, una vez
3	3/3	Copolímero 15	52,75	0,1	5,28	iv, una vez
4	3/3	Copolímero 15	0,5275	0,1	0,05	ip, una vez
5	3/3	Copolímero 15	5,275	0,1	0,53	ip, una vez
6	3/3	Copolímero 15	52,75	0,1	5,28	ip, una vez
7	3/3	Disolución salina al 0,9%	0,000	0,1	0,0	iv, una vez
8	3/3	Disolución salina al 0,9%	0,000	0,1	0,0	ip, una vez

25 Ejemplo 32: Estudios de transfección con plásmidos que codifican el gen informador de luciferasa

30 Se encapsularon plásmidos que codificaban el gen de luciferasa por el polímero de CD del Ejemplo 23, excepto porque se reemplazó el copolímero **15** por el copolímero **16**. Se usaron complejos de ADN/polímero para transfectar exitosamente células BHK-21 o CHO-K1, sembradas cada una en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 60.000 células/pocillo 24 horas antes de la transfección, a diversas relaciones de carga en condiciones de suero al 10% y exentas de suero, siguiendo el procedimiento expuesto en el Ejemplo 27. Se lisaron las células 48 horas después de la transfección. Se añadieron sustratos apropiados para el ensayo lumínico de luciferasa al lisado celular. Se cuantificó la actividad luciferasa, medida en términos de unidades lumínicas producidas (concretamente, unidades lumínicas relativas (ULR)) mediante un luminómetro. Se usó también lisado celular para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de proteína de Lowry (Lowry *et al.*, Journal of Biological Chemistry, vol. 193, 265-275 (1951)). Se midió la toxicidad determinando la proteína celular total en los pocillos 48 horas después de la transfección. Los resultados de transfección y supervivencia celular en medios con suero al 10% y exentos de suero se ilustran a continuación.

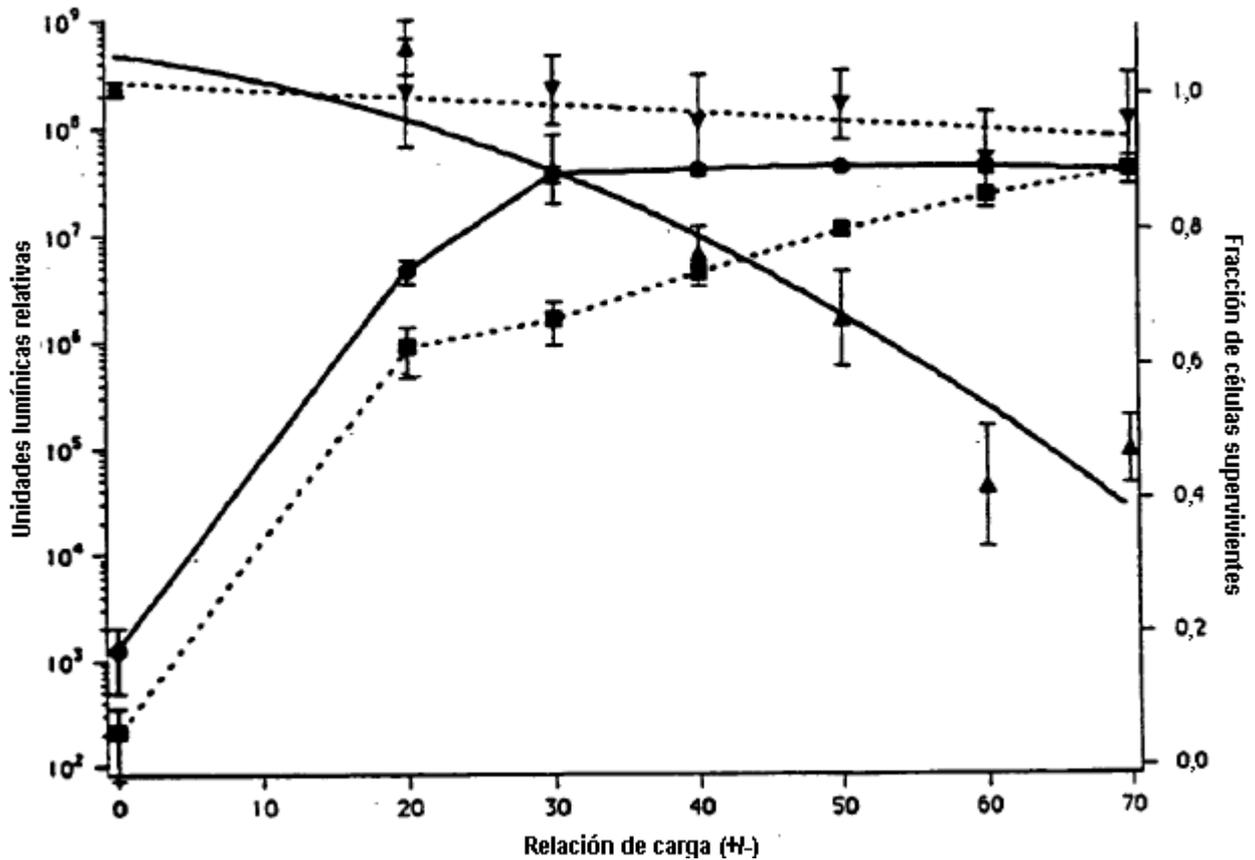
40 La actividad de la proteína luciferasa en células BHK-21 transfectadas en condiciones exentas de suero alcanzó un máximo estable aproximadamente a 30 con $\sim 5 \times 10^7$ ULR. La presencia de suero al 10% en los medios de transfección redujo la actividad luciferasa a todas las relaciones de carga excepto a aproximadamente 70. Con las

células CHO-K1, aumentar la relación de carga potenció también la transfección para todas las condiciones ensayadas. Adicionalmente, la transfección en suero redujo las unidades lumínicas en un orden de magnitud.

El copolímero **16** mostró toxicidad solo en células BHK-21 para transfecciones en ausencia de suero. La toxicidad se minimizó con la presencia de suero al 10% durante la transfección. No se observó toxicidad notable por transfecciones a células CHO-K1.

5

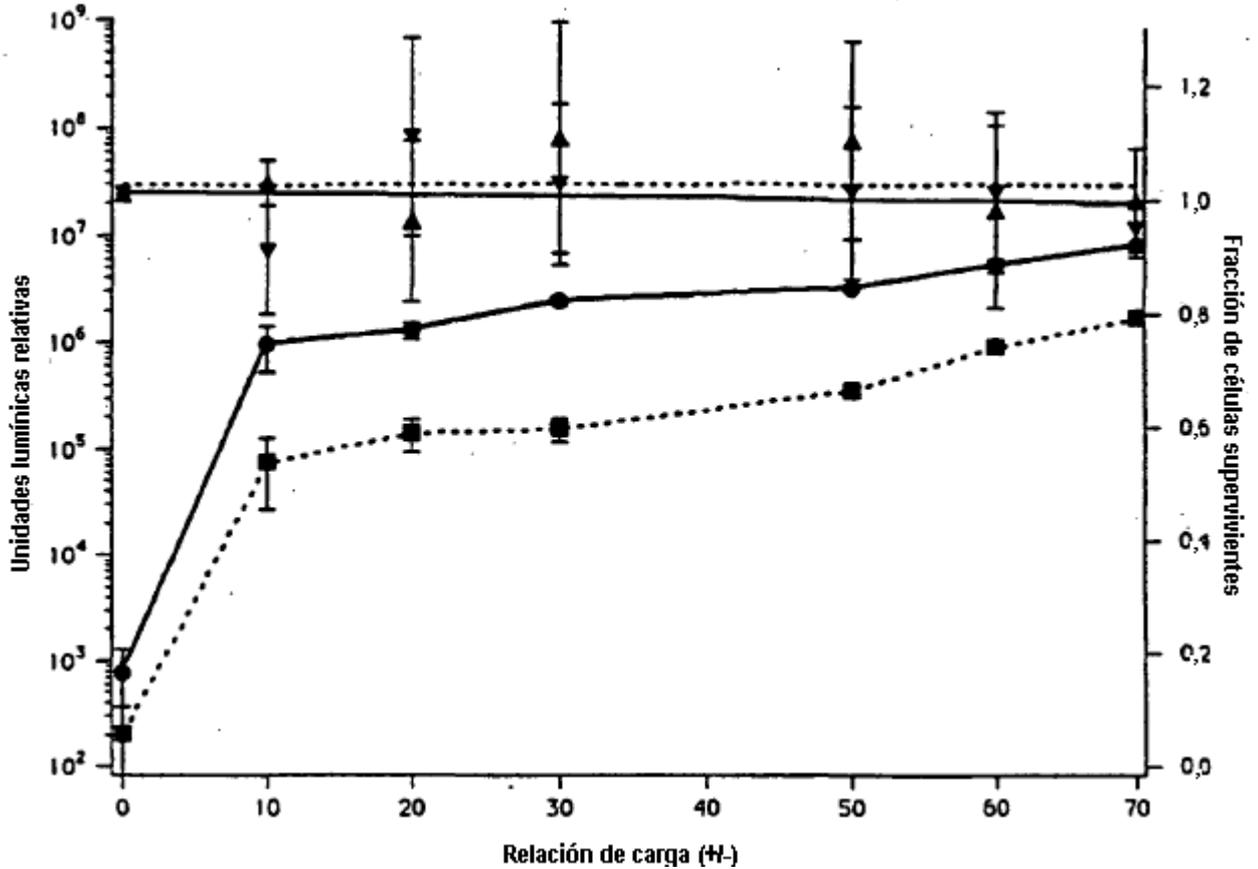
Transfección y toxicidad del copolímero 16 en BHK-21



Efecto de la relación de carga de copolímero **16**/ADN y las condiciones del suero sobre la eficacia de transfección (● y ■) y supervivencia celular (▼ y ▲) en células BHK-21. Los resultados de la transfección en medios con suero al 10% y exentos de suero se muestran, respectivamente, como líneas de puntos y continuas. Los datos se reseñan como media ± DE de tres muestras. Los datos de toxicidad se presentan como líneas de ajuste óptimo.

10

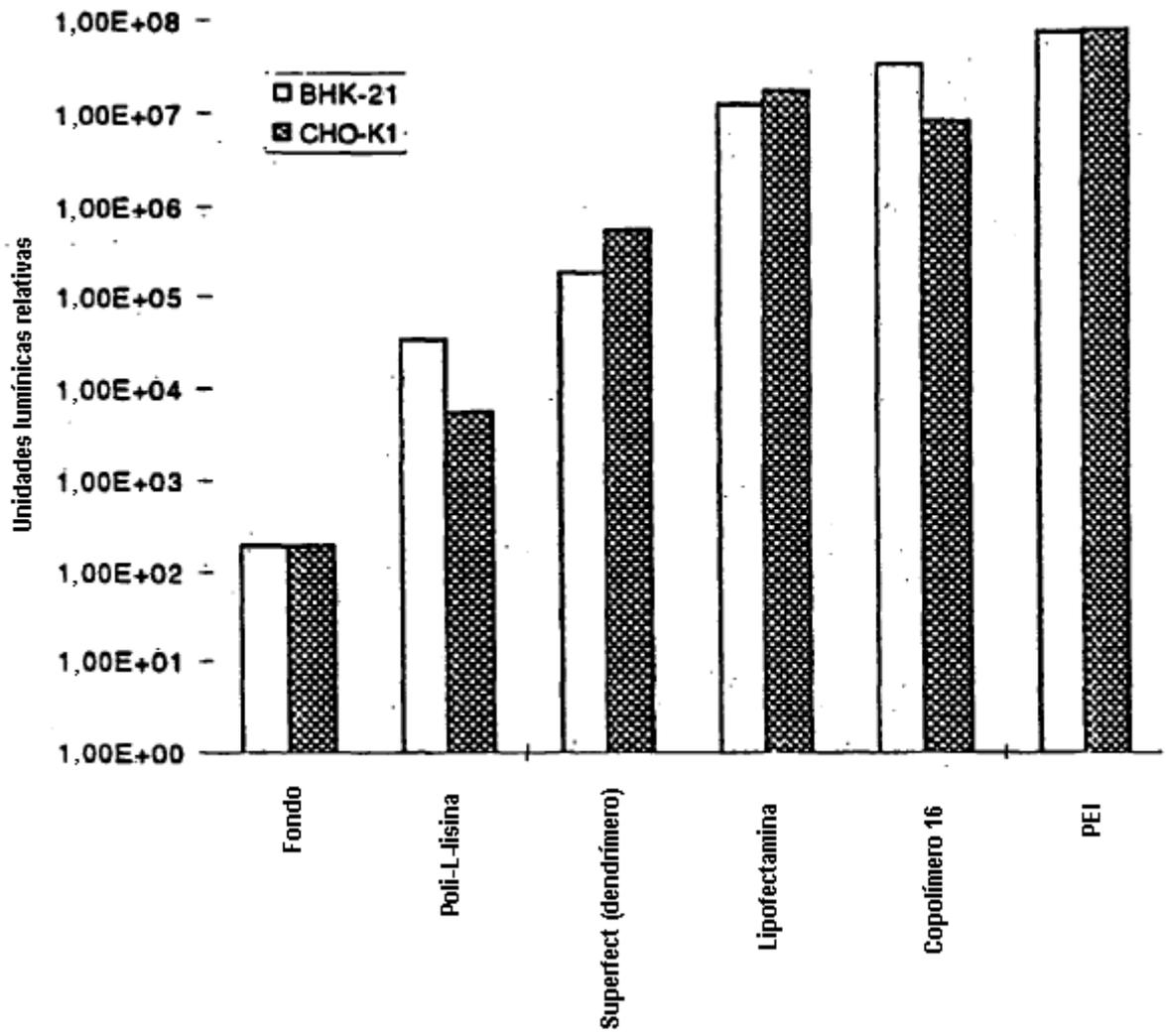
Transfección y toxicidad del copolímero 16 en CHO-K1

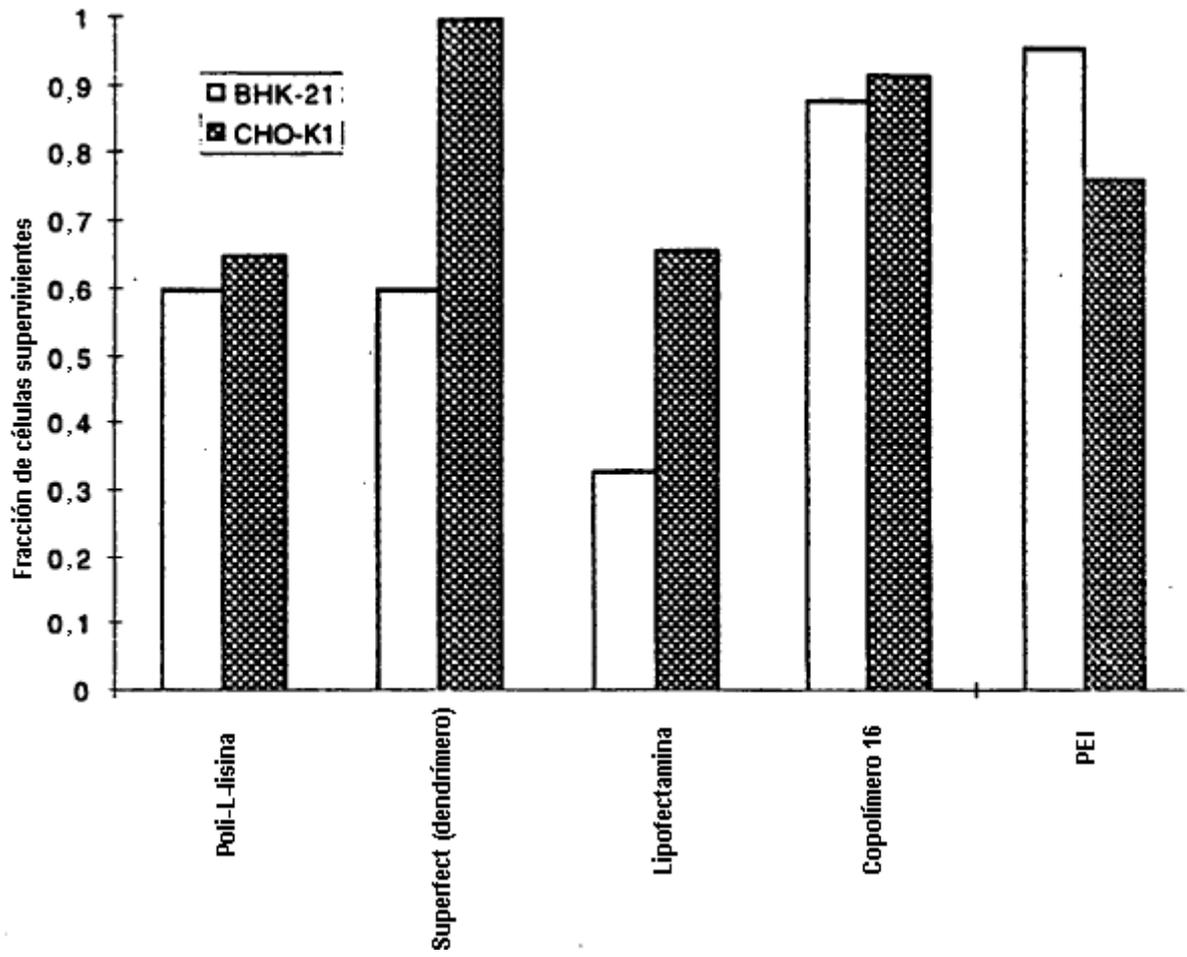


5 Efecto de la relación de carga de copolímero 16/ADN y las condiciones del suero sobre la eficacia de transfección (• y ■) y supervivencia celular (▼ y ▲) en células CHO-K1. Los resultados de la transfección en medios con suero al 10% y exentos de suero se muestran, respectivamente, como líneas de puntos y continuas. Los datos se reseñan como media ± DE de tres muestras. Los datos de toxicidad se presentan como líneas de ajuste óptimo.

Ejemplo comparativo 1: Estudios de transfección con plásmidos que codifican el gen informador de luciferasa

10 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 32, se estudiaron la eficacia de transfección y toxicidad de diversos vectores no víricos con células BHK-21 y CHO-K1 y se compararon frente a aquellos conseguidos con complejos de ADN/copolímero 16. Se transfectaron las células BHK-21 y CHO-K1 a un intervalo de relaciones de carga y densidades celulares iniciales para todos los vectores en medios exentos de suero. Los resultados se ilustran a continuación e ilustran las condiciones de transfección óptimas encontradas para cada vector.





REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un copolímero de ciclodextrina lineal hidrosoluble, en el que el copolímero tiene un esqueleto polimérico lineal, incluyendo dicho copolímero una pluralidad de restos monoméricos de ciclodextrina y restos ligadores en el esqueleto polimérico lineal, en el que, a menos que el resto monomérico de ciclodextrina o el resto ligador esté presente en el extremo de una cadena polimérica, cada uno de los restos monoméricos de ciclodextrina está unido con dos de los restos ligadores y cada uno de los restos ligadores liga covalentemente dos restos monoméricos de ciclodextrina; y en el que los restos monoméricos de ciclodextrina están no sustituidos o sustituidos con grupos que no interfieren con la copolimerización con el resto ligador y

5 en el que los restos ligadores comprenden un grupo polietilenglicol o un grupo que tiene la siguiente estructura -SCH₂CH₂NHC(NH₂⁺)(CH₂)_xC(NH₂⁺)NHCH₂CH₂S-, en el que x= 1 a 50;

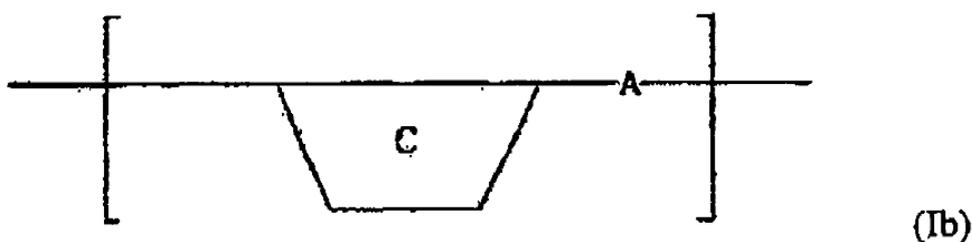
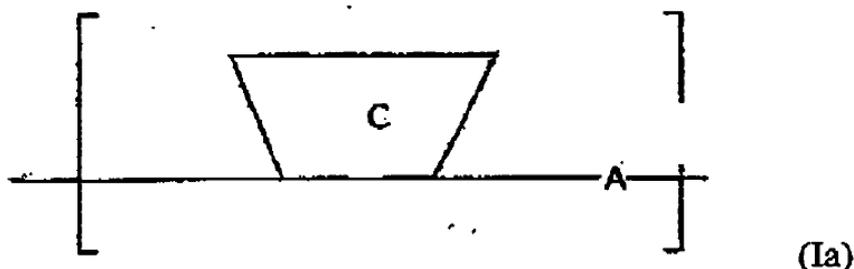
10 en el que el método comprende:

proporcionar un precursor monomérico de ciclodextrina diaminado y

15 copolimerizar el precursor monomérico de ciclodextrina diaminado con un precursor de ligador que contiene al menos dos grupos funcionales a través de los cuales puede conseguirse un ligamiento con el precursor monomérico de ciclodextrina.

2. El método de la reivindicación 1, en el que los restos monoméricos de ciclodextrina son iguales o diferentes en todo el polímero.

3. El método de la reivindicación 1, que comprende unidades repetidas de fórmula Ia, Ib o Ic o una combinación de las mismas:

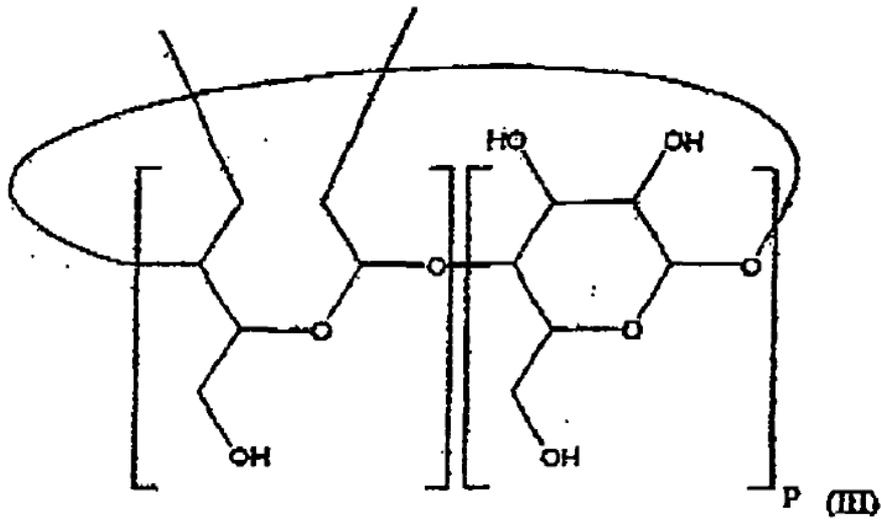


20 en las que C es un resto monomérico de ciclodextrina sustituido o no sustituido y A es un resto ligador unido al resto monomérico de ciclodextrina C.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los restos monoméricos de ciclodextrina son α, β o γ-ciclodextrina o una combinación de las mismas.

25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los restos monoméricos de ciclodextrina se seleccionan independientemente de: 6^A,6^B-desoxi-α-ciclodextrina, 6^A,6^C-desoxi-α-ciclodextrina, 6^A,6^D-desoxi-α-ciclodextrina, 6^A,6^B-desoxi-β-ciclodextrina, 6^A,6^C-desoxi-β-ciclodextrina, 6^A,6^D-desoxi-β-ciclodextrina, 6^A,6^B-desoxi-γ-ciclodextrina, 6^A,6^C-desoxi-γ-ciclodextrina, 6^A,6^D-desoxi-γ-ciclodextrina y 6^A,6^E-desoxi-γ-ciclodextrina.

30 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el resto monomérico de ciclodextrina tiene la fórmula general (III):



en la que $p=5-7$.

7. El método de la reivindicación 6, en el que los restos monoméricos de ciclodextrina se seleccionan independientemente de 2^A,3^A-desoxi-2^A,3^A-dihidro- α -ciclodextrina, 2^A,3^A-desoxi-2^A,3^A-dihidro- β -ciclodextrina y 2^A,3^A-desoxi-2^A,3^A-dihidro- γ -ciclodextrina.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el resto ligador es biodegradable o lábil ante ácidos.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el copolímero de ciclodextrina está reticulado con un polímero.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que al menos un ligando está unido al copolímero de ciclodextrina lineal.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos un resto monomérico de ciclodextrina está oxidado.
12. El método de la reivindicación 11, en el que sustancialmente todos los restos monoméricos de ciclodextrina están oxidados.
13. El método de la reivindicación 12, en el que todos los restos monoméricos de ciclodextrina están oxidados.