

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 939**

51 Int. Cl.:

**C08G 63/91** (2006.01)  
**C08G 63/48** (2006.01)  
**A61K 31/724** (2006.01)  
**C08G 65/333** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C08G 83/00** (2006.01)  
**A61K 49/08** (2006.01)  
**A61K 49/12** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2016 PCT/US2016/057202**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.04.2017 WO17066689**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2016 E 16856354 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022 EP 3362501**

54 Título: **Polirrotaxanos que contienen especies de ciclodextrinas mixtas y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**14.10.2015 US 201562241413 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.10.2022**

73 Titular/es:

**PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)  
101 Foundry Drive, Suite 2500  
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:

**THOMPSON, DAVID H.;  
MONDJINO, YAWO;  
COLLINS, CHRISTOPHER y  
HYUN, SEOK-HEE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 925 939 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

Polirrotaxanos que contienen especies de ciclodextrinas mixtas y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

5 Los agentes terapéuticos y los agentes de contraste para la obtención de imágenes a veces presentan inconvenientes que se derivan de una alta eliminación y/o una alta toxicidad. Por ejemplo, aunque algunos estudios han demostrado que la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y sus derivados, incluida la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad típicamente mortal Niemann-Pick tipo C (NPC), se requieren altas dosis de las  $\beta$ -CD administradas o derivados de las mismas ya que su persistencia en el torrente sanguíneo es breve ( $> 90\%$  se elimina en 24 horas). Con respecto a los agentes de contraste para la obtención de imágenes, la mayoría de los agentes de contraste utilizados clínicamente, aunque pueden tener un alto paramagnetismo, una excelente mejora de la relajación y estabilidad, presentan una eliminación rápida del cuerpo, de modo que son ineficaces, por ejemplo, para la mejora angiográfica. En algunos casos, las plataformas de nanopartículas utilizadas como portadoras de, por ejemplo,  $Gd^{3+}$ , aunque tienen una mejor farmacocinética que otros agentes de contraste usados clínicamente, presentan problemas como toxicidad aguda y mala accesibilidad en agua. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de agentes terapéuticos para tratar, por ejemplo, NPC, y agentes de contraste para obtención de imágenes que no presenten los inconvenientes enumerados en este documento.

El documento WO2014/182804 divulga polirrotaxanos que comprenden un núcleo de poloxámero y al menos una ciclodextrina que comprende una fracción quelante de nucleídos. Los polirrotaxanos son útiles en el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

20 Breve descripción de las figuras

Las figuras ilustran en general, a modo de ejemplo, pero no a modo de limitación, diversas realizaciones discutidas en el presente documento.

La FIG. 1 son espectros de DRMN de  $^1H$  de polirrotaxanos basados en  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD, donde PR<sub>1</sub>, PR<sub>2</sub>, PR<sub>3</sub> y PR<sub>5</sub> corresponden al polirrotaxano preparado con copolímeros Pluronic<sup>®</sup> F127, F68, L35, L81.

25 La FIG. 2 es un gráfico que muestra la determinación de la relajividad de polirrotaxanos basada en  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD y DOTAREM<sup>®</sup> con 7 T, 25 °C.

Las FIGS. 3A-3E son imágenes de RM tridimensional de polirrotaxanos. A: DOTAREM, B:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-F127, C:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-F68, D:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-L35, E:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-L81. Las imágenes se registraron con Bruker 7 T.

30 La FIG. 4 son gráficos de intensidad normalizada de agentes de contraste de polirrotaxano basados en  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD.

La FIG. 5 es un gráfico de viabilidad celular de los polirrotaxanos basados en  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD incubados con células macrófagas J774.

35 La FIG. 6 son gráficos de absorción celular de polirrotaxanos en células macrófagas J774. F127:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-F127, F68:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-F68, L35:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-L35, L64:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-L64, L81:  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-L81. Las imágenes se registraron con Bruker 7 T.

La FIG. 7 es un gráfico de la adsorción de proteína total en polirrotaxanos (PR) de diferentes derivados de CD.

La FIG. 8 es un gráfico del porcentaje promedio de la corona de proteína del polirrotaxano.

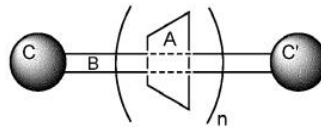
Descripción detallada de la invención

40 Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones del objeto divulgado, cuyos ejemplos se ilustran en parte en los dibujos adjuntos. El objeto divulgado se describirá junto con las reivindicaciones enumeradas.

Los agentes terapéuticos y los agentes de contraste para la obtención de imágenes de las diversas realizaciones de la presente invención se basan en una clase de materiales supramoleculares conocidos como polirrotaxanos que tienen uno o más huéspedes macrocíclicos "ensartados" en el "eje" del polirrotaxano, como se muestra en el Esquema 1 a continuación. Se ha encontrado inesperadamente que a medida que aumenta el número de huéspedes macrocíclicos presentes en los polirrotaxanos descritos en el presente documento, la dosis de polirrotaxano que se necesita usar para lograr la eficacia terapéutica o con fines de obtención de imágenes disminuye, en algunos casos significativamente. Aunque no se desea limitarse a ninguna teoría específica, se cree que a medida que aumenta el número de huéspedes macrocíclicos, los polirrotaxanos de las diversas realizaciones descritas en el presente documento se vuelven más "similares a varillas" y, como resultado, se observan mejoras significativas en la relajividad molar dependiente de la concentración de los polirrotaxanos. Las mejoras en la relajividad molar dependiente de la concentración conducen, en algunas realizaciones, a polirrotaxanos que son agentes para la obtención de imágenes significativamente mejorados que pueden mejorar el contraste, proporcionando así una mayor discriminación en la anatomía.

55 Un polirrotaxano es una molécula o moléculas huésped macrocíclicas que se "ensartan" en una cadena polimérica de dimensiones compatibles a través de interacciones hidrófobas huésped-huésped, con los extremos de la cadena

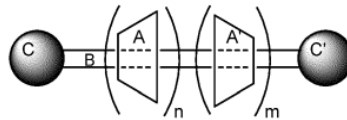
polimérica rematados con grupos protección de los extremos. En el Esquema 1 se proporciona una representación esquemática de un polirrotaxano:



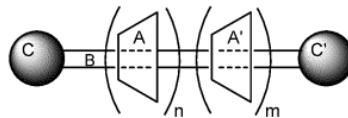
Esquema 1

5 o una sal del mismo (por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo), donde C y C' son iguales o diferentes y representan grupos protectores de los extremos; B representa la "cadena polimérica de dimensiones compatibles" a la que se unen covalentemente los grupos de protección de los extremos; A representa la molécula huésped macrocíclica que está "ensartada" en la cadena polimérica B; y n es un número entero de 1 a 100 (por ejemplo, 1 a 75, 1 a 50, 1 a 30, 5 a 15, 5 a 12, 10 a 30, 10 a 50, 1 a 20, 1 a 15, 5 a 15, 3 a 11, 1 a 12, 2 a 12 o 2 a 18), donde n representa el número de moléculas huésped macrocíclicas A que están "ensartadas" en la cadena polimérica B.

En los Esquemas IA y IB se muestra una representación esquemática de un polirrotaxano donde una o más de las moléculas huésped macrocíclicas A son diferentes:

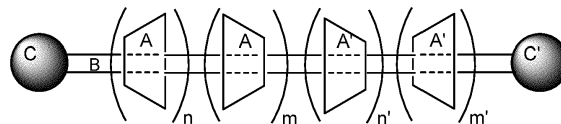


Esquema IA



Esquema IB

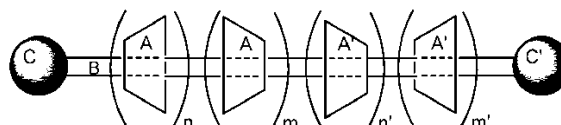
15 donde m y n pueden ser iguales o diferentes; n es un número entero de 0 a 100 (por ejemplo, 1 a 75, 1 a 50, 0 a 30, 1 a 30, 5 a 15, 5 a 12, 10 a 30, 10 a 50, 1 a 20, 1 a 15, 5 a 15, 3 a 11, 1 a 12, 2 a 12 o 2 a 18); m es un número entero de 0 a 100 (por ejemplo, 1 a 75, 1 a 50, 0 a 30, 1 a 30, 5 a 15, 5 a 12, 10 a 30, 10 a 50, 1 a 20, 1 a 15, 5 a 15, 3 a 11, 1 a 12, 2 a 12 o 2 a 18); y donde m y n representan el número de moléculas huésped macrocíclicas A' y A, respectivamente, que están "ensartadas" en la cadena polimérica B. Está claro, por lo tanto, que cuando las moléculas huésped macrocíclicas son diferentes, pueden estar presentes en relaciones molares determinadas por la relación de n a m. En algunas realizaciones, la relación puede estar entre 1:0 y 0:1, incluido 1:1. Aunque en los Esquemas IA y IB se dan dos orientaciones específicas de A y A', debe entenderse que A y A' pueden estar en todas las orientaciones posibles, incluida la orientación que se muestra en el Esquema IC, donde cada m y n pueden ser iguales o diferentes:



Esquema IC

30 donde m, m', n y n' pueden ser iguales o diferentes.

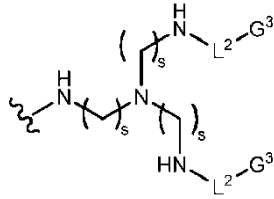
La invención proporciona un polirrotaxano que comprende la fórmula general:



o sales del, donde:

35 cada m y n es, independientemente, un número entero de 0 a 30, con la condición de que  $m + m' + n + n'$  sea de aproximadamente 4 a aproximadamente 30;

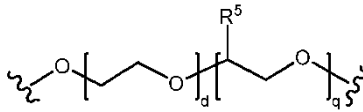
C y C' son iguales o diferentes y representan grupos protectores de los extremos de la fórmula:



donde cada L<sup>2</sup> es independientemente un enlace o acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cada G<sup>3</sup> es un grupo hidrocarbilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>) sustituido o no sustituido, interrumpido por 0 a 5 grupos elegidos entre -O-, -NH- y -S-, donde el grupo hidrocarbilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>) es estéricamente voluminoso; y cada s es independientemente un número entero de 1 a 6;

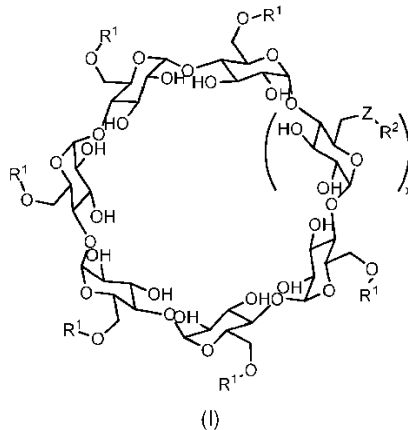
5

B representa:



a la que los grupos protectores de los extremos están unidos covalentemente a B a través del grupo hidrocarbilenio (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o B representa carbohidratos, polipéptidos, policarbonato, poliamida o polímeros de poliéster; donde R<sup>5</sup> es metilo; d es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 800; y q es un número entero de aproximadamente 6 a aproximadamente 800; y cada uno de A y A' representa la molécula huésped macrocíclica de fórmula general (I):

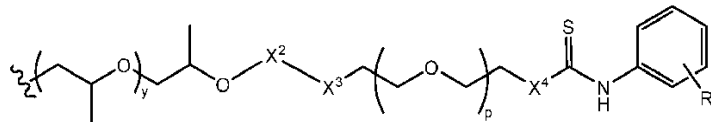
10



donde:

A y A' son diferentes; x es un número entero de 0 a 8; Z es O o NH; cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es, independientemente, hidrógeno, un grupo hidrocarbilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido o un grupo de fórmula (IIIc):

15



donde y es un número entero de 0 a 10; p es un número entero de 1 a 10; X<sup>2</sup> representa acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), un polipéptido de cadena corta, un carbohidrato de cadena corta, un poliéster o una poliamida; X<sup>3</sup> y X<sup>4</sup> son cada uno, independientemente, -O-, -NH-, un grupo carbamilo, un grupo heterociclilo, un disulfuro (-S-S-), amida o éster; y R<sup>4</sup> es un grupo reportero, con la condición de que al menos un grupo R<sup>2</sup> sea un grupo de fórmula (IIIc).

20

En algunas realizaciones, la orientación de las moléculas huésped macrocíclicas (A) y (A') pueden ser como se muestra en el Esquema IC, en el presente documento, donde m, m', n y n' son distintos de cero y aproximadamente el 85% (por ejemplo de aproximadamente 65% a aproximadamente 90%, aproximadamente 75% a aproximadamente 90% o aproximadamente 80% a aproximadamente 90%) de las moléculas huésped macrocíclicas tienen la orientación "cola con cola" de (A)<sub>n</sub> y (A)<sub>m</sub> y aproximadamente 15% (por ejemplo, aproximadamente 10% a aproximadamente 35%; aproximadamente 10% a aproximadamente 25%; o aproximadamente 10% a aproximadamente 20%) de las moléculas huésped macrocíclicas tienen la orientación "cabeza a cabeza" de (A')<sub>n'</sub> y (A')<sub>m'</sub>.

25

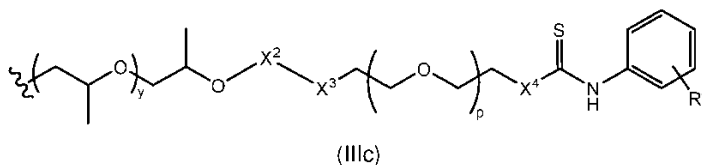
30

La molécula huésped macrocíclica (A) y (A') puede ser cualquier molécula huésped macrocíclica adecuada tal como la de la fórmula general (I), siempre que la molécula o moléculas huésped macrocíclicas puedan "ensartarse" en una cadena polimérica de dimensiones compatibles a través de interacciones hidrófobas huésped-huésped. Para moléculas huésped macrocíclicas adecuadas, véase, por ejemplo, CJ Collins et al., *Biochemistry* 52: 3242-3253 (2013). En algunas realizaciones, la molécula huésped macrocíclica (A) y (A') puede ser una ciclodextrina. Como se usa en el presente documento, el término "ciclodextrina" se refiere en términos generales a los oligosacáridos macrocíclicos producidos por la ciclación (por ejemplo, ciclación enzimática) de 6, 7 u 8 unidades de (+)-glucopiranosido unidas por, por ejemplo, enlaces  $\alpha$ -1,4 para generar  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -CD, respectivamente.

Las ciclodextrinas tienen una topología toroidal con una cavidad interna hidrófoba. La  $\beta$ -CD y sus derivados han atraído la atención debido a su uso en la industria farmacéutica y alimentaria como agentes solubilizantes, potenciadores de la permeabilidad y estabilizadores de ingredientes activos.

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) es hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). HP- $\beta$ -CD es un precursor atractivo para la síntesis de polirrotaxano, ya que está aprobado por la FDA como ingrediente farmacéutico inactivo y es sustancialmente más soluble en agua a temperatura ambiente (0.65 g/mL en agua) que  $\beta$ -CD. Tal solubilidad en solución acuosa lo convierte en un buen candidato para diseñar polirrotaxanos bien tolerados, tales como los descritos en este documento, que podrían mejorar la farmacocinética y la biodistribución de HP- $\beta$ -CD en modelos de, por ejemplo, enfermedad de NPC.

En otras realizaciones, en compuestos de fórmula (I),  $R^2$  tiene la fórmula (IIIc):

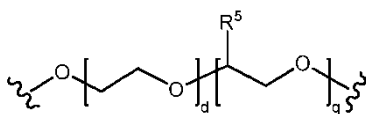


donde  $y$  es un número entero de 0 a 10;  $p$  es un número entero de 1 a 10;  $X^2$  representa un enlazador adecuado, incluido un acilo ( $C_1$ - $C_6$ ) (por ejemplo,  $C=O$ ), un polipéptido de cadena corta (por ejemplo, un polipéptido que tiene hasta 20 aminoácidos o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos), un carbohidrato de cadena corta (por ejemplo, un carbohidrato que tiene hasta 20 unidades de sacárido o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 unidades de sacárido), un poliéster o una poliamida;  $X^3$  y  $X^4$  son cada uno, independientemente,  $-O-$ ,  $-NH-$ , un grupo carbamilo (por ejemplo,  $-OC(O)N(R)-$ , donde  $R$  se define en el presente documento), un grupo heterocíclico,  $-S-S-$ , un éster (por ejemplo,  $-C(O)O-$ ), o una amida ( $C(O)N(R)$ , donde  $R$  se define en el presente documento); y  $R^4$  es una fracción quelante (por ejemplo, un radical de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA)).

En algunas realizaciones, cuando la molécula huésped macrocíclica (A) o (A') comprende un grupo  $R^2$  que comprende un radical de una fracción quelante (por ejemplo, un radical DOTA), los polirrotaxanos descritos en el presente documento son útiles como agentes de contraste de IRM, cuando la fracción quelante comprende un radionúclido, como se define el término en el presente documento.

La cadena polimérica (B), a veces denominada "eje" en este documento, puede ser cualquier cadena polimérica adecuada como se describe en las reivindicaciones, siempre que la cadena polimérica pueda "ensartarse" a través de una molécula o moléculas huésped macrocíclicas y pueda interactuar con la cadena polimérica a través de interacciones hidrófobas huésped-huésped. Para cadenas poliméricas adecuadas, véase, por ejemplo, CJ Collins et al., *Biochemistry* 52: 3242-3253 (2013). Algunas cadenas poliméricas adecuadas pueden "desensartarse" del "eje" en determinadas condiciones (por ejemplo, en condiciones fisiológicas o en presencia de enzimas, cuando las enzimas eliminan enzimáticamente los grupos protectores de los extremos (C y C'), por ejemplo, en células NPC), de manera que se libera la molécula huésped macrocíclica. La cadena polimérica (B) es una cadena polimérica de dimensiones compatibles. Otras cadenas poliméricas adecuadas (B) incluyen carbohidratos, polipéptidos, policarbonato, poliamida y polímeros de poliéster. La cadena polimérica (B) se puede unir covalentemente a los grupos protectores de los extremos C y C'.

Las cadenas poliméricas adecuadas (B) también incluyen aquellas basadas en cadenas poliméricas de óxido de polialquileno que pueden denominarse en el presente documento, en algunos casos, como un "núcleo de poloxámero". Los ejemplos de cadenas poliméricas (B) de óxido de polialquileno (por ejemplo, arreglo de copolímero aleatorio, copolímero dibloque o copolímero tribloque) incluyen aquellas que tienen la fórmula (IV):



donde cada  $R^5$  es metilo;  $d$  es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 800 (por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 200; aproximadamente 20 a aproximadamente 200; aproximadamente 20 a aproximadamente 150; aproximadamente 100 a aproximadamente 500; aproximadamente 250 a aproximadamente

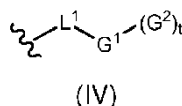
750; aproximadamente 150 a aproximadamente 400; aproximadamente 250 a aproximadamente 600 o aproximadamente 300 a aproximadamente 700); y q es un número entero de aproximadamente 6 a aproximadamente 800 (por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100; aproximadamente 10 a aproximadamente 75; de aproximadamente 10 a aproximadamente 50; aproximadamente 100 a aproximadamente 500; aproximadamente 250 a aproximadamente 750; aproximadamente 150 a aproximadamente 400; aproximadamente 250 a aproximadamente 600 o aproximadamente 300 a aproximadamente 700).

En algunas realizaciones, d + q es de aproximadamente 10 a aproximadamente 800 (por ejemplo, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500; aproximadamente 250 a aproximadamente 750; aproximadamente 150 a aproximadamente 400; aproximadamente 250 a aproximadamente 600 o aproximadamente 300 a aproximadamente 700). En otras realizaciones, d + q son tales que el peso molecular de la cadena polimérica de óxido de polialquileno (B) es de aproximadamente 2 kD a aproximadamente 50 kD (por ejemplo, de aproximadamente 10 kD a aproximadamente 35 kD, aproximadamente 10 kD a aproximadamente 20 kD, aproximadamente 15 kD a aproximadamente 25 kD o aproximadamente 15 kD a aproximadamente 30 kD).

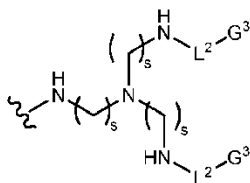
Los ejemplos de cadenas poliméricas de óxido de polialquileno (B) incluyen cadenas poliméricas de óxido de polialquileno basadas en poloxámeros tales como los tensioactivos PLURONIC<sup>®</sup>, una familia de copolímeros tribloque de poli(etilenglicol)-poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol) (PEG-PPG-PEG). Los propios tensioactivos PLURONIC<sup>®</sup> disfrutan de una amplia gama de aplicaciones debido a su favorable biocompatibilidad y baja toxicidad. Ejemplos de tensioactivos PLURONIC<sup>®</sup> incluyen, pero sin limitarse a, PLURONIC<sup>®</sup> F127; PLURONIC<sup>®</sup> F68; PLURONIC<sup>®</sup> L35; PLURONIC<sup>®</sup> L64; y PLURONIC<sup>®</sup> L81.

Los grupos C y C' son iguales o diferentes y representan cualquier grupo protector adecuado de los extremos. Para grupos protectores de los extremos adecuados, véase, por ejemplo, CJ Collins et al., Biochemistry 52: 3242-3253 (2013). Los grupos protectores de los extremos funcionan generalmente para evitar que la molécula huésped macrocíclica (A) o (A') se "desensarte" de la cadena polimérica (B), por ejemplo, proporcionando suficiente volumen estérico. En algunas realizaciones, los grupos protectores de los extremos evitan que la molécula huésped macrocíclica (A) o (A') se "desensarte" de la cadena polimérica (B) hasta que se aplique un "activador" apropiado que elimine los grupos protectores de los extremos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas o en presencia de enzimas, cuando las enzimas eliminan enzimáticamente los grupos protectores de los extremos (C y C'), por ejemplo, en células NPC).

Los grupos C y C' están unidos covalentemente a la cadena polimérica a través de un grupo de enlace adecuado. Los grupos protectores de los extremos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, grupos de fórmula (IV):

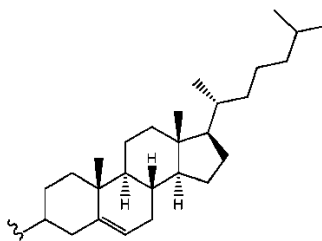


donde L<sup>1</sup> es un grupo hidrocarbilenilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup>, juntos, forman un radical que tiene la fórmula:

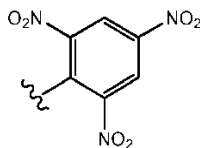


donde cada L<sup>2</sup> es independientemente un enlace o acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (por ejemplo, C=O); cada G<sup>3</sup> es un grupo hidrocarbilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>) sustituido o no sustituido, interrumpido por 0 a 5 (por ejemplo, 0-3) grupos elegidos entre -O-, -NH- y -S- (por ejemplo, -O-), donde el grupo hidrocarbilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>) es estéricamente voluminoso; y cada s es independientemente un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 2 a 5 o 2 a 3).

En algunas realizaciones, el grupo G<sup>3</sup> es un grupo -O- alquilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>) sustituido o no sustituido o un grupo arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), sustituido o no sustituido donde el grupo alquilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>) y el grupo arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) son estéricamente voluminosos. En otras realizaciones, el grupo G<sup>3</sup> es un grupo -O-alquilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>), donde, en algunos ejemplos, el grupo alquilo (C<sub>6</sub>-C<sub>50</sub>) es un grupo colesterol:



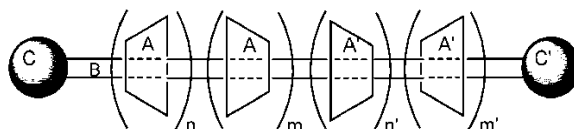
En otras realizaciones,  $G^3$  es un grupo fenilo sustituido, donde el grupo fenilo está sustituido con al menos dos sustituyentes (por ejemplo,  $NO_2$ ). En algunas realizaciones, el grupo fenilo sustituido es un grupo fenilo trisustituido tal como un grupo 2,4,6-trinitrofenilo:



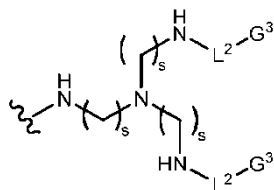
5 En aún otras realizaciones, el grupo  $G^3$  es un péptido o carbohidrato que tiene suficiente volumen estérico para evitar que la molécula huésped macrocíclica (A) o (A') se "desensarte" de la cadena polimérica (B). Por ejemplo, el péptido o carbohidrato, o cualquiera de los grupos protectores de los extremos descritos en el presente documento, tienen un volumen estérico definido por su diámetro efectivo de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm (por ejemplo, de aproximadamente 4 nm a aproximadamente 10 nm; aproximadamente 2 nm a aproximadamente 15 nm, o aproximadamente 3 nm a aproximadamente 12 nm).

En aún otras realizaciones, el grupo  $G^3$  puede ser una fracción fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o un radical fluoresceínico), un esteroide (por ejemplo, colesterol o un radical colesterilo), un polipéptido de cadena corta, un carbohidrato de cadena corta, un grupo arilo (por ejemplo, un grupo arilo sustituido) o un grupo ciclodextrina, tal como una  $\alpha$ - o una  $\beta$ -ciclodextrina.

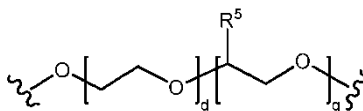
15 En algunas realizaciones, los polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención son compuestos de fórmula



donde A, A', B, C, C', n, m, n' y m' son como se definen en el presente documento. En algunos ejemplos, C y C' son iguales o diferentes y comprenden grupos de la fórmula:

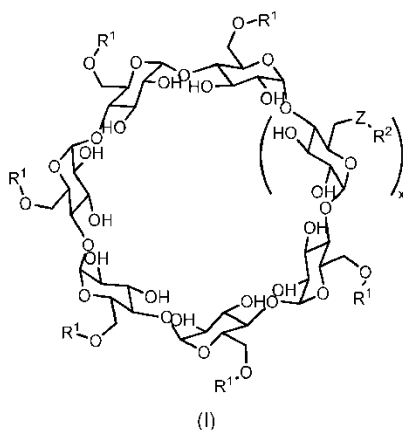


20 donde cada s es 2, cada  $L^2$  es un enlace o  $C=O$ , y cada  $G^3$  es un grupo colesterilo, un grupo 2,4,6-trinitro fenilo o un péptido o carbohidrato que tiene suficiente volumen estérico para evitar que la molécula huésped macrocíclica (A) o (A') se "desensarte" de la cadena polimérica (B); B representa una "cadena polimérica de dimensiones compatibles" de la fórmula:



25 donde  $R^5$  es metilo y d y q son como se definen en este documento, a los que los grupos de protección de los extremos están unidos covalentemente a la cadena polimérica a través de cualquier grupo de enlace adecuado (por ejemplo,  $L^1$  en el presente documento), seleccionado de un grupo hidrocarbilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) adecuado, tal como un grupo acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); y

30 A representa la molécula huésped macrocíclica de fórmula general (I):



donde  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $Z$  y  $x$  son como se definen en el presente documento, donde la molécula huésped macrocíclica está "ensartada" en la cadena polimérica B;  $n$  es un número entero de 0 a 30 (por ejemplo, de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 12, de 2 a 12 o de 2 a 18); y  $m$  es un número entero de 0 a 30 (por ejemplo, de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 12, de 2 a 12 o de 2 a 18), donde  $m$  y  $n$  representan el número de moléculas huésped macrocíclicas  $A'$  y  $A$ , respectivamente, que están "ensartados" en la cadena polimérica B con la condición de que  $m + m' + n + n'$  sea de aproximadamente 4 a aproximadamente 30. Véase, por ejemplo, CJ Collins et al., *Biochemistry* 52: 3242-3253 (2013).

En algunas realizaciones, los polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención son HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F127; HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F68; HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L35; -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L64; o HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L81, donde el polirrotaxano tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 20,000 g/mol a aproximadamente 50,000 g/mol según se determina mediante análisis de GPC. En algunas realizaciones, los polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención comprenden de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de HP $\beta$ CD y de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 SBE $\beta$ CD-F68.

Los expertos en la técnica reconocerán que los compuestos descritos en el presente documento (por ejemplo, la molécula huésped macrocíclica (A) o (A')) contienen centros quirales. Todos los diastereoisómeros de los compuestos descritos en el presente documento se contemplan en el presente documento, así como los racematos.

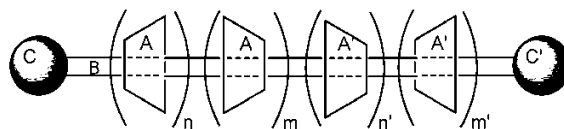
Los polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención son útiles para tratar la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC). NPC es una enfermedad de trastorno de almacenamiento lisosomal causada por la acumulación de colesterol no esterificado y esfingolípidos en los lisosomas de las células del cerebro, el hígado, el bazo y los pulmones. Se ha demostrado que la acumulación aberrante de colesterol en las células NPC se origina a partir de la mutación de los genes que codifican las proteínas NPC1 unidas a la membrana o las proteínas NPC2 solubles requeridas para la salida de colesterol del lisosoma. Desafortunadamente, las opciones de tratamiento son limitadas para esta enfermedad típicamente fatal. Varios estudios han demostrado que la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y sus derivados, incluida la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), pueden movilizar la eliminación del colesterol almacenado de los compartimentos lisosomales. Algunos grupos han demostrado que la inyección subcutánea de HP- $\beta$ -CD (4.0 mg/kg de peso corporal) en ratones *npc1*<sup>-/-</sup> produjeron una mejora en su supervivencia, hepatopatología y neuropatología. Aunque estos resultados son prometedores, todavía no está claro cómo HP- $\beta$ -CD solubiliza el colesterol de las células en la enfermedad NPC1 humana. Además, se requieren altas dosis de las HP- $\beta$ -CD administradas ya que su persistencia en el torrente sanguíneo es breve (>90% se elimina en 24 h) debido a su apreciable hidrosolubilidad y peso molecular relativamente bajo ( $\approx 1460 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

Los polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención pueden tener una circulación prolongada; biocompatible; y puede aumentar sustancialmente la eliminación de colesterol de las células, tal como las células NPC. Además, tras la eliminación de los grupos protección de los extremos, pueden suministrar múltiples "copias" de, por ejemplo, HP- $\beta$ -CD a los lisosomas de las células NPC. El análisis de ciertos polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención en células de fibroblastos NPC2<sup>-/-</sup> usando tinción con filipina reveló que promueven la eliminación de colesterol acumulado de forma anómala de estas células. Véanse los ejemplos en este documento.

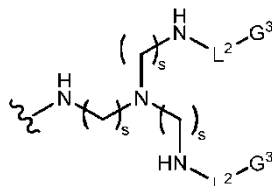
En algunas realizaciones, por lo tanto, la presente invención contempla métodos para tratar NPC que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polirrotaxano de las diversas realizaciones de la presente invención o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende al menos un polirrotaxano de las diversas realizaciones de la presente invención a un sujeto que lo necesite.

En otras realizaciones, la presente invención contempla métodos para eliminar el colesterol de las células de un animal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un polirrotaxano de las diversas realizaciones de la presente invención o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende al menos un polirrotaxano de las diversas realizaciones de la presente invención a un sujeto que lo necesite.

En algunas realizaciones, el polirrotaxano contemplado para usar en los métodos para tratar NPC o eliminar el colesterol de las células de un animal incluye polirrotaxanos que tienen la fórmula general:

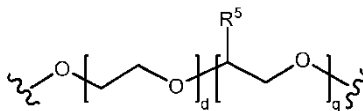


- 5 o combinaciones de los mismos o sales de los mismos, donde A, A', B, C, C', n, m, n' y m' son como se definen en el presente documento. C y C' son iguales o diferentes y representan grupos protectores de los extremos de la fórmula:

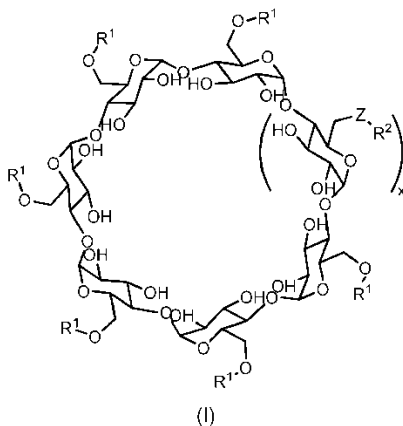


donde cada s es 2, cada L<sup>2</sup> es un enlace o C=O, y cada G<sup>3</sup> es un grupo colesterilo o un grupo 2,4,6-trinitrofenilo;

B representa una "cadena polimérica de dimensiones compatibles" de la fórmula:



- 10 donde R<sup>5</sup> es metilo y d y q son como se definen en este documento, a los que los grupos de protección de los extremos están unidos covalentemente a la cadena polimérica a través de cualquier grupo de enlace adecuado (por ejemplo, L<sup>1</sup> en el presente documento), incluyendo un grupo hidrocarbilenlo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) adecuado, tal como un grupo acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); y A representa la molécula huésped macrocíclica de fórmula general (I):



- 15 como se define en este documento.

En algunas realizaciones, x es 1; Z es O; R<sup>2</sup> es H; y R<sup>1</sup> es H.

En otras realizaciones, x es 1; Z es O; R<sup>2</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido; y R<sup>1</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, el grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) está sustituido con -OH o -SO<sub>3</sub>.

- 20 La obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM) es una poderosa herramienta para obtener imágenes médicas tridimensionales (3D) de alta resolución de estructuras anatómicas y órganos o tejidos específicos dentro del cuerpo. La IRM tiene ventajas tales como la ausencia de radiación ionizante, alto contraste, alta resolución espacial y excelentes capacidades de perfilado de profundidad. La IRM tiene amplias aplicaciones en el diagnóstico de diversas enfermedades neurológicas, cardiovasculares y oncológicas. La calidad y el contraste de las imágenes de IRM se pueden mejorar mediante el uso de agentes de contraste de IRM que mejoran el contraste de la imagen dentro del
- 25 tejido de interés al alterar la longitud (T<sub>1</sub>) y tasas de relajación transversal (T<sub>2</sub>) de los protones del agua circundante. Los agentes de contraste se pueden clasificar en agentes T<sub>1</sub> tales como quelatos de gadolinio (III), que aumentan la tasa de relajación T<sub>1</sub> y producen un contraste de imagen positivo, o agentes T<sub>2</sub>, como las nanopartículas de óxido de hierro supermagnético, que aumentan la tasa de relajación T<sub>2</sub> y producen un contraste de imagen negativo.

La mayoría de los agentes de contraste utilizados clínicamente son quelatos de  $Gd^{3+}$ , que se ven favorecidos debido a su alto paramagnetismo, excelente mejora de la relajación y estabilidad. Desafortunadamente, la mayoría de los agentes de contraste clínicamente aprobados presentan una eliminación rápida del cuerpo y una mejora del contraste ineficaz, lo que los hace ineficaces para la mejora angiográfica. Por lo tanto, el uso de macromoléculas, ensamblajes macromoleculares y nanopartículas como portadores de agentes de contraste es atractivo debido a sus propiedades de larga circulación y su potencial para la selectividad tisular mediante el uso de ligandos dirigidos. Dichos materiales no solo tienen una mejor farmacocinética, sino que potencialmente también pueden transportar una carga mucho mayor de  $Gd^{3+}$ . Se han utilizado plataformas tales como dendrímeros, polímeros, liposomas, partículas inorgánicas y ensamblajes supramoleculares como transportadores de  $Gd^{3+}$ ; sin embargo, la mayoría de estos transportadores presentan problemas tales como toxicidad aguda y poca accesibilidad en agua debido a la localización de  $Gd^{3+}$  dentro del núcleo de la partícula.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla un polirrotaxano que comprende un núcleo de poloxámero y al menos una ciclodextrina que comprende al menos una fracción quelante de nucleido. Los polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención pueden funcionar como portadores de  $Gd^{3+}$  multivalentes. Por ejemplo, cuando la molécula huésped macrocíclica (A) comprende un grupo  $R^2$  que comprende una fracción quelante (por ejemplo, un radical DOTA), los polirrotaxanos descritos en el presente documento son útiles como agentes para la obtención de imágenes para IRM, cuando la fracción quelante comprende un nucleido, como se define el término en el presente documento.

En algunas realizaciones, por lo tanto, la presente invención contempla métodos para la formación de imágenes que comprenden administrar una cantidad suficiente para la formación de imágenes de un polirrotaxano de acuerdo con las diversas realizaciones de la presente invención o una composición que comprende una cantidad suficiente para la formación de imágenes de un polirrotaxano de acuerdo con las diversas realizaciones de la presente invención, a un sujeto que lo necesite.

En algunas realizaciones, los polirrotaxanos útiles en el método para obtener imágenes incluyen polirrotaxanos como se describe en las reivindicaciones.

Los métodos para fabricar los rotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención comprenden combinar/poner en contacto una cadena polimérica adecuada (B) con una molécula huésped macrocíclica adecuada (A) y/o (A') (por ejemplo, bajo condiciones heterogéneas) bajo condiciones no acuosas (por ejemplo, en presencia de un disolvente no polar, tal como éter dietílico, hexano o similares). Una cadena polimérica adecuada (B) y una molécula huésped macrocíclica adecuada (A) y/o (A') se ponen en contacto durante un tiempo suficiente (por ejemplo, 48 horas) para la molécula huésped macrocíclica (A) o (A') para "ensartar" en la cadena polimérica (B), tal que al menos una (por ejemplo, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 5 a 15, 3 a 11, 1 a 12, 2 a 12 o 2 a 18) molécula huésped macrocíclica se ensarte en la cadena polimérica. Los extremos de la cadena polimérica (B), que comprenden al menos una (por ejemplo, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 5 a 15, 3 a 11, 1 a 12, 2 a 12 o 2 a 18) molécula huésped macrocíclica ensartada en la cadena polimérica se "proteja" posteriormente usando los métodos de protección descritos en el presente documento o los conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, CJ Collins et al., *Biochemistry* 52: 3242-3253 (2013).

#### Composiciones farmacéuticas

Varias realizaciones de la presente invención también contemplan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de las diversas realizaciones de la presente invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para la administración a un sujeto (por ejemplo, un animal, tal como, pero sin limitarse a, un mamífero). Dichas composiciones pueden formularse específicamente para la administración a través de una o más de varias vías, que incluyen, pero sin limitarse a, bucal, cutánea, epicutánea, epidural, infusión, inhalación, intraarterial, intracardíaca, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, pulmonar, rectal a través de un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica y transmucosa. Además, la administración puede realizarse por medio de cápsulas, gotas, espumas, gel, goma de mascar, inyección, líquido, parche, píldora, bolsa porosa, polvo, comprimido u otros medios de administración adecuados.

Un "excipiente farmacéutico" o un "excipiente farmacéuticamente aceptable" comprende un vehículo, a veces un líquido, en el que se formula un agente terapéutico activo. El excipiente generalmente no proporciona ninguna actividad farmacológica a la formulación, aunque puede proporcionar estabilidad química y/o biológica y características de liberación. Se pueden encontrar ejemplos de formulaciones adecuadas, por ejemplo, en Remington, *The Science And Practice of Pharmacy*, vigésima Edición, (Gennaro, A. R., Editor en Jefe), Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000.

Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción que son fisiológicamente compatibles. En una realización, el vehículo es adecuado para la administración parenteral. Alternativamente, el vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen

soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, polisacáridos, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, los compuestos descritos en el presente documento se pueden formular en una formulación de liberación prolongada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos los implantes y los sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos y poliglicólicos (PLG). Los expertos en la técnica conocen muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones.

Las formas orales de administración también se contemplan en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral en forma de cápsula (dura o blanda), comprimido (recubierto con película, con recubrimiento entérico o sin recubrir), polvo o gránulos (con o sin recubrimiento) o líquido (solución o suspensión). Las formulaciones se pueden preparar convenientemente mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir uno o más coadyuvantes de producción o excipientes adecuados, incluidos rellenos, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, diluyentes, agentes de fluidez, agentes tamponadores, agentes humectantes, conservantes, colorantes, edulcorantes, sabores y vehículos farmacéuticamente compatibles.

Para cada una de las realizaciones enumeradas, los compuestos se pueden administrar mediante una variedad de formas de dosificación como se conoce en la técnica. Se contempla cualquier forma de dosificación biológicamente aceptable conocida por los expertos en la materia y combinaciones de las mismas. Ejemplos de tales formas de dosificación incluyen, sin limitación, comprimidos masticables, comprimidos de disolución rápida, comprimidos efervescentes, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, comprimidos de múltiples capas, comprimidos de dos capas, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, pastillas para chupar, pastillas, pastillas masticables, perlas, polvos, goma de mascar, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, sellos, duchas vaginales, supositorios, cremas, compuestos tópicos, inhalantes, inhalantes en aerosol, parches, inhalantes de partículas, implantes de depósito, compuestos ingeribles, compuestos inyectables (incluyendo subcutáneos, intramusculares, intravenosos e intradérmicos), infusiones y combinaciones de los mismos.

Otros compuestos que se pueden incluir mediante mezcla son, por ejemplo, ingredientes médicamente inertes (por ejemplo, diluyentes sólidos y líquidos), tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón o fosfato de calcio para comprimidos o cápsulas, aceite de oliva u oleato de etilo para cápsulas blandas y agua o aceite vegetal para suspensiones o emulsiones; agentes lubricantes tales como sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes gelificantes tales como arcillas coloidales; agentes espesantes tales como goma de tragacanto o alginato de sodio, agentes aglutinantes tales como almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes tales como almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; colorante; edulcorantes; agentes humectantes tales como lecitina, polisorbatos o laurilsulfatos; y otros ingredientes auxiliares terapéuticamente aceptables, tales como humectantes, conservantes, tampones y antioxidantes, que son aditivos conocidos para dichas formulaciones.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones, soluciones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículo, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerol y/o manitol y/o sorbitol. Las suspensiones y las emulsiones pueden contener un vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico.

La cantidad de compuesto activo en una composición terapéutica de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el género, el peso, el historial del paciente, los factores de riesgo, la predisposición a la enfermedad, la vía de administración, un régimen de tratamiento preexistente (por ejemplo, posibles interacciones con otros medicamentos) y peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede

administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

"Forma unitaria de dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr, y las limitaciones inherentes en el arte de preparar un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos. En el uso terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos (por ejemplo, seres humanos) para los que los compuestos de la presente invención o una composición farmacéutica apropiada de los mismos son eficaces, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en una cantidad eficaz. Las dosis adecuadas para esta invención pueden ser una composición, una composición farmacéutica o cualquier otra composición descrita en el presente documento.

Para cada una de las realizaciones enumeradas, la dosificación se administra normalmente una, dos o tres veces al día, aunque son posibles intervalos de dosificación más frecuentes. La dosis puede administrarse todos los días, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días y/o cada 7 días (una vez por semana). En una realización, la dosificación se puede administrar diariamente durante un máximo de 30 días inclusive, preferiblemente entre 7 - 10 días. En otra realización, la dosificación se puede administrar dos veces al día durante 10 días. Si el paciente requiere tratamiento por una enfermedad o condición crónica, la dosis puede administrarse mientras persistan los signos y/o síntomas. El paciente puede requerir un "tratamiento de mantenimiento" donde el paciente recibe dosis todos los días durante meses, años o por el resto de sus vidas. Además, la composición de esta invención puede efectuar la profilaxis de síntomas recurrentes. Por ejemplo, la dosificación puede administrarse una o dos veces al día para prevenir la aparición de síntomas en pacientes de riesgo, especialmente en pacientes asintomáticos.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por cualquiera de las siguientes vías: bucal, epicutánea, epidural, infusión, inhalación, intraarterial, intracardiaca, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, pulmonar, rectal a través de un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica y transmucosa. Las vías de administración preferidas son la bucal, la oral y la intravenosa. La administración puede ser local, donde la composición se administra directamente, en cercanías a, en el sitio, cerca, en, alrededor o en la vecindad del sitio o sitios de la enfermedad, por ejemplo, inflamación, o sistémica, donde la composición se administra al paciente y atraviesa ampliamente el cuerpo, llegando así al sitio o sitios de la enfermedad. La administración local puede ser administración a la célula, tejido, órgano y/o sistema de órganos, que abarca y/o está afectado por la enfermedad, y/o donde los signos y/o síntomas de la enfermedad están activos o es probable que ocurran. La administración local también puede ser administración a la célula, tejido, órgano y/o sistema de órganos, lo que requiere formación de imágenes (por ejemplo, formación de imágenes de resonancia magnética).

La administración puede ser tópica con efecto local, la composición se aplica directamente donde se desea su acción. La administración puede ser enteral donde el efecto deseado es sistémico (no local), la composición se administra a través del tracto digestivo. La administración puede ser parenteral, donde el efecto deseado es sistémico, la composición se administra por otras vías distintas a la digestiva.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de uno o más compuestos de las diversas realizaciones de la presente invención que provoca una respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano, que está siendo buscado por un investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es aquella que puede tratar o aliviar la enfermedad o los síntomas de la enfermedad con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, debe entenderse que el uso diario total de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento puede ser decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen la afección que se está tratando y la gravedad de la afección; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el género y la dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentemente con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos por el investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico. También se aprecia que la cantidad terapéuticamente eficaz se puede seleccionar con referencia a cualquier toxicidad u otro efecto secundario indeseable que pueda ocurrir durante la administración de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento.

#### Definiciones

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento puede permitir un grado de variabilidad en un valor o intervalo, por ejemplo, dentro del 10 %, dentro del 5 % o dentro del 1 % de un valor establecido o de un límite establecido de un intervalo.

El término "sustancialmente", como se usa en el presente documento, se refiere a la mayoría de, o en su mayoría, como en al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.5 %, 99.9 %, 99.99 %, o al menos aproximadamente 99.999 % o más.

5 Los valores expresados en un formato de intervalo deben interpretarse de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos enumerados explícitamente como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o sub-intervalos incluidos dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y el subintervalo se mencionaron explícitamente. Por ejemplo, un intervalo de "aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 5 %" o "aproximadamente 0.1 % a 5 %" debe interpretarse que incluye no solo aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5 %, sino también los valores individuales (por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 % y 4 %) y los subintervalos (por ejemplo, 0.1 % a 0.5 %, 1.1 % a 2.2 %, 3.3 % a 4.4 %) dentro del intervalo indicado. La afirmación "de aproximadamente X a Y" tiene el mismo significado que "aproximadamente X a aproximadamente Y", a menos que se indique lo contrario. Asimismo, la afirmación "aproximadamente X, Y o aproximadamente Z" tiene el mismo significado que "aproximadamente X, aproximadamente Y o aproximadamente Z", a menos que se indique lo contrario.

15 En este documento, los términos "un", "uno, una" o "el, la" se utilizan para incluir uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "o" se utiliza para referirse a un "o" no exclusivo a menos que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en el presente documento, y no definida de otro modo, es solo para fines de descripción y no de limitación. Cualquier uso de los títulos de las secciones está destinado a facilitar la lectura del documento y no debe interpretarse como una limitación. Además, la información que es relevante para el título de una sección puede aparecer dentro o fuera de esa sección en particular.

20 En los métodos descritos en este documento, las etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden sin apartarse de los principios de la invención, excepto cuando se enumera explícitamente una secuencia temporal u operativa. Además, las etapas especificadas pueden llevarse a cabo al mismo tiempo, a menos que la expresión explícita de la reivindicación indique que deben llevarse a cabo por separado. Por ejemplo, una etapa reivindicada de hacer X y una etapa reivindicada de hacer Y pueden llevarse a cabo simultáneamente dentro de una sola operación, y el proceso resultante caerá dentro del alcance literal del proceso reivindicado.

30 Como se usa en el presente documento, el término "hidrocarbilo" se refiere a un grupo funcional derivado de un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado o cíclico, y puede ser alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo o cualquier combinación de los mismos. El grupo hidrocarbilo puede tener de 1 a 50 átomos de carbono ( $C_1-C_{50}$ ), de 10 a 30 átomos de carbono ( $C_{10}-C_{30}$ ), de 12 a 18 átomos de carbono ( $C_{12}-C_{18}$ ), de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono ( $C_1-C_{20}$ ), de 1 a 10 carbonos ( $C_1-C_{10}$ ), de 1 a 8 átomos de carbono ( $C_1-C_8$ ), de 1 a 5 átomos de carbono ( $C_1-C_5$ ) o, en algunas realizaciones, de 1 a 3 átomos de carbono ( $C_1-C_3$ ).

35 Como se usa en este documento, el término "hidrocarbilenos" se refiere ampliamente a un grupo funcional divalente derivado de un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado o cíclico, tal como un alquilenos (por ejemplo,  $-CH_2-$  y  $-CH_2CH_2-$ ), alquenileno (por ejemplo,  $-CH=CH-$  y  $-CH=CH-CH_3$ , donde, cuando corresponda, la geometría del doble enlace puede ser E-, Z- o una mezcla de E- y Z-), alquinileno (por ejemplo,  $-C=C-$  y  $-C\equiv C-CH_3$ ), arileno (por ejemplo, fenileno), cicloalquileno (por ejemplo, ciclopentileno y ciclohexileno), acilo divalente (por ejemplo,  $-C(=O)-$  y  $-CH_2C(=O)-CH_2$ ), o una combinación de los mismos. Los grupos hidrocarbilenos pueden estar sustituidos o no sustituidos, como se define en el presente documento.

40 El grupo hidrocarbilo puede estar sustituido o no sustituido. El término "sustituido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo orgánico como se define en el presente documento o molécula en la que uno o más átomos de hidrógeno contenidos en el mismo se reemplazan por uno o más átomos que no son de hidrógeno. El término "grupo funcional" o "sustituyente", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que puede estar o está sustituido en una molécula o en un grupo orgánico. El "sustituyente" también puede ser un grupo orgánico. Los ejemplos de sustituyentes o grupos funcionales incluyen, pero sin limitarse a, un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br e I); un átomo de oxígeno en grupos tales como grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos ariloxi, grupos aralquiloxi, grupos oxo(carbonilo), grupos carboxilo que incluyen ácidos carboxílicos, carboxilatos y ésteres de carboxilato; un átomo de azufre en grupos tales como grupos tiol, grupos sulfuro de alquilo y arilo, grupos sulfóxido, grupos sulfona, grupos sulfonilo y grupos sulfonamida; un átomo de nitrógeno en grupos tales como aminas, hidroxilaminas, nitrilos, grupos nitro, N-óxidos, hidrazidas, azidas y enaminas; y otros heteroátomos en varios otros grupos.

50 El término "grupo orgánico", como se usa en el presente documento, se refiere, pero no se limita a, cualquier grupo funcional que contiene carbono. Por ejemplo, un grupo que contiene oxígeno tal como un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo aralquiloxi, un grupo oxo(carbonilo), un grupo carboxilo que incluye un ácido carboxílico, carboxilato y un éster de carboxilato; un grupo que contiene azufre tal como un grupo sulfuro de alquilo y arilo; y otros grupos que contienen heteroátomos. Los ejemplos no limitativos de grupos orgánicos incluyen OR, OOR, OC(O)N(R)(R'), CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, R, C(O), metilendioxi, etilendioxi, N(R)(R'), SR, SOR, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>N(R)(R'), SO<sub>3</sub>R, C(O)R, C(O)C(O)R, C(O)CH<sub>2</sub>C(O)R, C(S)R, C(O)OR, OC(O)R, C(O)N(R)(R'), OC(O)N(R)(R'), C(S)N(R)(R'), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>N(R)C(O)R', (CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>N(R)N(R)(R'), N(R)N(R)C(O)R', N(R)N(R)C(O)OR', N(R)N(R)CON(R)(R'), N(R)SO<sub>2</sub>R', N(R)SO<sub>2</sub>N(R)(R'), N(R)C(O)OR', N(R)C(O)R', N(R)C(S)R', N(R)C(O)N(R)(R'), N(R)C(S)N(R)(R'), N(COR)COR', N(OR)R', C(=NH)N(R)(R'), C(O)N(OR)R', o C(=NOR)R; donde cada R y R' pueden ser, independientemente, hidrógeno (en ejemplos que

incluyen otros átomos de carbono) o una fracción basada en carbono (por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo), y donde la fracción basada en carbono puede estar también sustituida.

Los grupos orgánicos también incluyen fracciones quelantes, también denominadas en el presente documento "fracción quelante de nucleidos", tales como, pero sin limitarse a, ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), trietilentetramina (TETA) y ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-triacético (NOTA), que son capaces de quelar, por ejemplo, un radionucleido o un nucleido paramagnético. Los ejemplos de nucleidos incluyen, pero sin limitarse a, In-111, Y-90, F-18, P-32, Sc-47, Cu-62, Cu-64, Cu-67, Ga-67, Ga-68, Y-86, Y-90, Zr-89, Tc-99m, Pd-109, Ag-111, In-111, I-123, I-125, I-131, Sm-153, Gd-155, Gd-157, Th-161, Lu-177, Re-186, Re-188, Pt-197, Pb-212, Bi-212, Bi-213, Ra-223, Ac-225, As-72, As-77, At-211, Au-198, Au-199, Bi-212, Br-75, Br-76B, C-11, Co-55Co, Dy-166, Er-169, F-18, Fe-52, Fe-59, Ga-67, Ga-68, Gd-154-158, Ho-166, I-120, I-121, I-124, In-110, In-111, M194, Lu-177, Mn-51, Mn-52, Mo-99, N-13, O-15, P-32, P-33, Pb-211, Pb-212, Pd-109, Pm-149, Pr-142, Pr-143, Rb-82, Re-189, Rh-105, Sc-47, Se-75, Sr-83, Sr-89, Th-161, Tc-94, Tc-99, Y-86, Y-90 y Zr-89. Los ejemplos de nucleidos paramagnéticos incluyen, pero sin limitarse a, Gd<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, y Fe<sup>3+</sup>.

Los ejemplos no limitados de sustituyentes, J, que se pueden unir a un átomo de carbono sustituido (u otro) incluyen F, Cl, Br, I, OR, OC(O)N(R')<sub>2</sub>, CN, NO, NO<sub>2</sub>, ONO<sub>2</sub>, azido, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, R', O (oxo), S (tiono), C(O), S(O), metilendioxi, etilendioxi, N(R)<sub>2</sub>, SR, SOR, SO<sub>2</sub>R', SO<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>R, C(O)R, C(O)C(O)R, C(O)CH<sub>2</sub>C(O)R, C(S)R, C(O)OR, OC(O)R, C(O)N(R)<sub>2</sub>, OC(O)N(R)<sub>2</sub>, C(S)N(R)<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>N(R)C(O)R, (CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>N(R)N(R)<sub>2</sub>, N(R)N(R)C(O)R, N(R)N(R)C(O)OR, N(R)N(R)CON(R)<sub>2</sub>, N(R)SO<sub>2</sub>R, N(R)SO<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>, N(R)C(O)OR, N(R)C(O)R, N(R)C(S)R, N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, N(COR)COR, N(OR)R, C(=NH)N(R)<sub>2</sub>, C(O)N(OR)R, o C(=NOR)R, donde R puede ser hidrógeno o una fracción basada en carbono, y donde la fracción basada en carbono puede estar sustituida; por ejemplo, donde R puede ser hidrógeno, alquilo, acilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, donde cualquier alquilo, acilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heteroarilo o heteroarilalquilo o R puede ser independientemente sustituido una sola vez o sustituido múltiples veces con J; o donde dos grupos R unidos a un átomo de nitrógeno o a átomos de nitrógeno adyacentes pueden, junto con el átomo o los átomos de nitrógeno, formar un heterociclilo, que puede estar sustituido una sola vez o independientemente sustituido múltiples veces con J.

El término "alquilo" y "alquileno", como se usa en este documento, se refiere a grupos alquilo y alquileno de cadena lineal y ramificados sustituidos o no sustituidos y grupos cicloalquileno que tienen de 1 a 50 átomos de carbono, 10 a 30 átomos de carbono, 12 a 18 átomos de carbono, 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, 1 a 10 átomos de carbono, 1 a 8 átomos de carbono, 1 a 5 átomos de carbono o, en algunas realizaciones, de 1 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena lineal incluyen aquellos con 1 a 8 átomos de carbono tales como grupos metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo. Los ejemplos de grupos alquilo ramificados incluyen, pero sin limitarse a, grupos isopropilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, neopentilo, isopentilo, 2,2-dimetilpropilo e isoestearilo. Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" y "alquileno" abarca n-alquilo y n-alquileno; isoalquilo e isoalquileno; y grupos anteisoalquilo y anteisoalquileno así como otras formas de cadena ramificada de alquilo y alquileno.

El término "alqueniilo" y "alqueniileno", como se usa en este documento, se refiere a grupos alquilo y alquileno de cadena lineal o ramificada y cíclicos sustituidos o no sustituidos como se define en este documento, excepto que exista al menos un doble enlace entre dos átomos de carbono. Por lo tanto, los grupos alqueniilo y alqueniileno tienen de 2 a 50 átomos de carbono, o de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o de 2 a 12 carbonos o, en algunas realizaciones, de 2 a 8 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alqueniilo incluyen, pero sin limitarse a, vinilo, -CH=CH(CH<sub>3</sub>), -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)=CH(CH<sub>3</sub>), -C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, ciclohexeniilo, ciclopentenilo, ciclohexadieniilo, butadieniilo, pentadieniilo y hexadieniilo entre otros.

El término "alquiniilo" y "alquiniileno", como se usa en este documento, se refiere a grupos alquilo y alquileno de cadena lineal o ramificada sustituidos o no sustituidos, excepto que existe al menos un triple enlace entre dos átomos de carbono. Por lo tanto, los grupos alquiniilo y alquiniileno tienen de 2 a 50 átomos de carbono, de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono o de 2 a 12 átomos de carbono o, en algunas realizaciones, de 2 a 8 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, -C≡CH, -C≡C(CH<sub>3</sub>), -C≡C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH<sub>2</sub>C≡CH, -CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>3</sub>), y -CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) entre otros.

El término "acilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene una fracción carbonilo donde el grupo está unido a través del átomo de carbono del carbonilo. El átomo de carbono del carbonilo también está unido a otro átomo de carbono, que puede ser parte de un grupo alquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo o similar. En el caso especial donde el átomo de carbono del carbonilo está unido a un hidrógeno, el grupo es un grupo "formilo", un grupo acilo como se define el término en este documento. Un grupo acilo puede incluir de 0 a aproximadamente 12-20 o 12-50 átomos de carbono adicionales unidos al grupo carbonilo. Un grupo acilo puede incluir enlaces dobles o triples dentro del significado de este documento. Un grupo acrililo es un ejemplo de un grupo acilo. Un grupo acilo también puede incluir heteroátomos (por ejemplo, -O-, -NH- y -S-). Un grupo nicotinoilo (piridil-3-carbonilo) es un ejemplo de un grupo acilo dentro del significado del presente documento. Otros ejemplos incluyen grupos acetilo, benzóilo, fenilacetilo, piridilacetilo, cinamoilo y acrililo. Cuando el grupo que contiene el átomo de carbono que está unido al átomo de

carbono del carbonilo contiene un halógeno, el grupo se denomina grupo "haloacilo". Un ejemplo es un grupo trifluoroacetilo.

Los términos "arilo" y "arileno", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a hidrocarburos aromáticos cíclicos sustituidos o no sustituidos que no contienen heteroátomos en el anillo. Por lo tanto, los grupos arilo incluyen, pero sin limitarse a, grupos fenilo, azulenilo, heptalenilo, bifenilo, indaceno, fluorenilo, fenantrenilo, trifenilenilo, pirenilo, naftaceno, crisenilo, bifenilenilo, antraceno y naftilo. En algunas realizaciones, los grupos arilo y arileno contienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 carbonos en las porciones del anillo de los grupos. Los grupos arilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tal como, pero sin limitarse a, fenilo sustituido en 2, 3, 4, 5 o 6 o grupos naftilo sustituidos en 2-8.

El término "heterociclilo", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos de anillos aromáticos y no aromáticos sustituidos o no sustituidos que contienen 3 o más miembros del anillo, de los cuales, uno o más es un heteroátomo tal como, pero sin limitarse a, N, O, y S. Por lo tanto, un heterociclilo puede ser un cicloheteroalquilo, o un heteroarilo, o si es policíclico, cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los grupos heterociclilo incluyen de 3 a aproximadamente 20 miembros en el anillo, mientras que otros grupos tienen de 3 a aproximadamente 15 miembros en el anillo. Un grupo heterociclilo designado como heterociclilo C<sub>2</sub> puede ser un anillo de 5 miembros con dos átomos de carbono y tres heteroátomos, un anillo de 6 miembros con dos átomos de carbono y cuatro heteroátomos y así sucesivamente. Del mismo modo un heterociclilo C<sub>4</sub> puede ser un anillo de 5 miembros con un heteroátomo, un anillo de 6 miembros con dos heteroátomos, y así sucesivamente. El número de átomos de carbono más el número de heteroátomos es igual al número total de átomos en el anillo. Un anillo de heterociclilo también puede incluir uno o más dobles enlaces. Un anillo de heteroarilo es una realización de un grupo heterociclilo. La frase "grupo heterociclilo" incluye especies de anillos fusionados, incluidas aquellas que incluyen grupos aromáticos y no aromáticos fusionados. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, tetrazinilo, quinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo (por ejemplo, 1,2,4-triazolilo), bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, bencisoxazolilo y benzisotiazolilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo también incluyen tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, tetrahidropirranilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo y quinuclidinilo.

El término "alcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a un átomo de oxígeno conectado a un grupo alquilo, incluido un grupo cicloalquilo, como se define en el presente documento. Los ejemplos de grupos alcoxi lineales incluyen, pero sin limitarse a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi y hexiloxi. Los ejemplos de alcoxi ramificado incluyen pero sin limitarse a isopropoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, isopentiloxi e isohexiloxi. Los ejemplos de alcoxi cíclico incluyen pero sin limitarse a ciclopropiloxi, ciclobutiloxi, ciclopentiloxi y ciclohexiloxi. Un grupo alcoxi puede incluir de uno a aproximadamente 12-20 o aproximadamente 12-40 átomos de carbono unidos al átomo de oxígeno, y puede incluir además dobles o triples enlaces, y también puede incluir heteroátomos. Por ejemplo, un grupo aliloxi es un grupo alcoxi dentro del significado de este documento. Un grupo metoxietoxi también es un grupo alcoxi dentro del significado de este documento, como lo es un grupo metilendioxo en un contexto donde dos átomos adyacentes de una estructura están sustituidos con el mismo.

Los términos grupo "halo", "halógeno" o "haluro", como se usan en el presente documento, solos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

El término grupo "haloalquilo", como se usa en el presente documento, incluye grupos mono-haloalquilo, grupos poli-haloalquilo donde todos los átomos halo pueden ser iguales o diferentes, y grupos per-haloalquilo, donde todos los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de halógeno, tales como flúor. Los ejemplos de haloalquilo incluyen trifluorometilo, 1,1-dicloroetilo, 1,2-dicloroetilo, 1,3-dibromo-3,3-difluoropropilo, perfluorobutilo y -CF(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Como se usa en el presente documento, el término "sales" y "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a derivados de los compuestos divulgados donde el compuesto original se modifica haciendo sales ácidas o básicas del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, sales de ácidos minerales u orgánicos de grupos básicos tales como aminas; y sales alcalinas u orgánicas de grupos ácidos tales como ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico y nítrico; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico e isetiónico.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene una fracción básica o ácida mediante métodos químicos convencionales. En algunos casos, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimoséptima edición, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1985.

## Ejemplos

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos que se ofrecen a modo de ilustración. La presente invención no se limita a los ejemplos dados en el presente documento.

5       Materiales. Se adquirieron los copolímeros tribloque PLURONIC® F127 (EO 200, PO 65), F68 (EO 153, PO 29), L35 (EO 22, PO 16), L64 (EO 26, PO 30) y L81 (EO 6, PO 43) a través de Sigma Aldrich y se secaron por destilación azeotrópica a partir de benceno al vacío antes de su uso. También se adquirieron a través de Sigma-Aldrich 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina, carbonildiimidazol (CDI), trietilamina (TEA), tris(2-aminoetil)amina (TAEA), y se usaron directamente. La solución de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), al 10% p/v en agua, se obtuvo a través de Research Organics en Cleveland, OH y se usó tal como se recibió. Todos los disolventes se destilaron de un desecante apropiado antes de su uso. Las membranas de celulosa para diálisis se obtuvieron a través de Spectrum Labs Inc. y se sumergieron en agua desionizada durante al menos 30 minutos antes de su uso. Se generó agua ultrapura (resistividad ≈ 18.0 MΩ/cm<sup>-1</sup>) a partir de un sistema de agua Ultrapure NANOpure.

15       Espectroscopia ultravioleta-visible. Los espectros de absorción, registrados utilizando un espectrofotómetro UV-Vis HP8453 equipado con lámparas de tungsteno y deuterio, se midieron para confirmar la eficacia de, por ejemplo, reacciones de protección de los extremos con TNBS de polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención. Las muestras se disolvieron en agua (1 mg/mL) y los espectros se registraron a 20 °C.

20       Tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz, MALDI-TOF. Los espectros MALDI-MS se adquirieron en un intervalo de masas de 1500 - 35000 Da en modo de reflector de iones positivos en un analizador MALDI-TOF/TOF Applied Biosystems/MDS Sciex 4800 con el software 4000 Series Explorer v3.5 utilizando una potencia de láser de 6000 y 6500 disparos láser en modo lineal. La matriz incluía una matriz de líquido iónico (ILM) recién preparada usando un protocolo descrito previamente con algunas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 2',4',6'-trihidroxiacetofenona monohidrato (THAP) y 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG) en una relación molar de 1:2 en metanol. A continuación, la solución se sonicó durante 15 min a 40 °C. Después de eliminar el metanol por evaporación centrífuga en un SpeedVac durante 3 h a 20 °C, las ILM se dejaron a un vacío de 50 μm de Hg durante la noche. A continuación, se prepararon soluciones de ILM finales a una concentración de 90 mg/mL en DMF para su uso como matriz. Las muestras de polirrotaxanos se prepararon a razón de 3 mg/mL en DMF y luego se mezclaron en una relación de polirrotaxano: ILM de 1:80 para el análisis MALDI-MS. Luego, se depositaron 0.6 μL de una mezcla de polirrotaxano: ILM en un objetivo MALDI de acero inoxidable pulido como un espejo y se dejó secar a 20 °C bajo presión atmosférica durante la noche antes del análisis.

30       Microscopía de fuerza atómica. La topología (tamaño, altura) de las partículas de polirrotaxano se determinó en el aire a 22 °C mediante microscopía de fuerza atómica en modo de toque utilizando un AFM multimodo equipado con un controlador Nanoscope IIIa (Veeco Instruments, EE. UU.), una punta de sonda sin recubrimiento de 10 nm o menos (NSC15/A1BS, MikroMasch, EE. UU.), y voladizos con una constante de resorte de 40 N/m. En una medición típica, 7.0 μL de una muestra de polirrotaxano (1.0 × 10<sup>-9</sup> mg/mL en agua) se depositaron sobre una superficie de mica después de limpiar mediante sonicación con sonda y eliminación de agua usando un espolvoreador TechSpray que contenía gas 1,1,1,2-tetrafluoroetano.

40       Cromatografía líquida de alto rendimiento y ultra rendimiento, HPLC/UPLC. Se empleó un HPLC Agilent Serie 1200 acoplado con un detector ESA Corona para los estudios de deshinchado de polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención. En este ensayo, se integró el pico de ciclodextrina en el cromatograma y se determinó la concentración de HP-β-CD, obtenida a partir de la escisión de polirrotaxanos, por comparación con una curva estándar para alícuotas de 1 mL de solución acuosa de solución de polirrotaxano que se trataron con uno de dos tampones diferentes (pH 7.4 y pH 5.5) a 37 °C. Las soluciones acuosas de polirrotaxanos (2.0 mg/mL) se filtraron a través de un filtro de membrana de celulosa de 0.2 μm antes de la inyección. La curva de calibración se construyó analizando diferentes concentraciones de estándar HP-β-CD disueltas en agua. La separación se realizó a 50 °C en una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB-fenilo de fase inversa (2.1 mm × 150 mm, tamaño de partícula 5 μm). La composición de la fase móvil fue una mezcla de agua (A) y acetonitrilo (B) en el gradiente de elución a un caudal de 0.25 mL/min. La composición de la mezcla agua/acetonitrilo fue la siguiente: 0-9 min, agua (100%), 9-11 min, agua/acetonitrilo (40/60, v/v), 11-12 min, agua/acetonitrilo (29/71, v/v) y 12- 25 min, agua (100%). El análisis UPLC-MS se realizó como una medición independiente para determinar el porcentaje de ciclodextrina libre en las muestras utilizando un sistema de UPLC Thermo Accela (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas Thermo LTQ Velos. Se usó una columna de interacción hidrofílica hecha en laboratorio (2.1 × 30 mm, partículas de sílice no porosas de 700 nm recubiertas con poli(acrilamida) como fase estacionaria. La temperatura del horno para la columna se mantuvo a 25 °C. Se prepararon soluciones patrón de HP-β-CD a diferentes concentraciones en el intervalo de 0.05 - 2 mg/mL en agua como estándares de calibración.

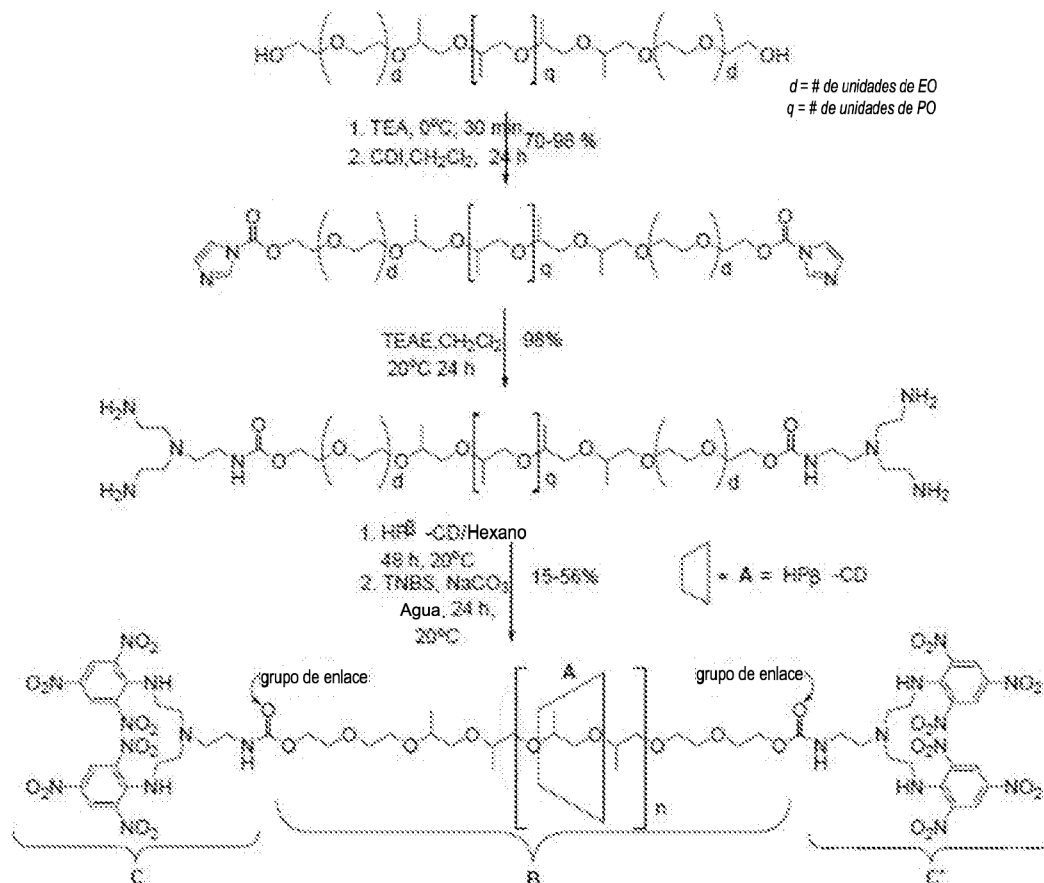
55       Estudio de rescate en cultivos celulares de polirrotaxanos. Para evaluar el potencial terapéutico de, entre otros polirrotaxanos de las diversas realizaciones de la presente invención, polirrotaxano HP-β-CD:PLURONIC® en un modelo de cultivo tisular apropiado, se cultivaron células de fibroblastos humanos deficientes en NPC2 (*npc2*<sup>-/-</sup>) y se trataron con los polirrotaxanos. Cada compuesto se solubilizó en DMSO y se diluyó en medio de cultivo de células de fibroblastos (MEM/FBS al 15%/penicilina/estreptomicina) a una concentración que produjo el equivalente de HP-β-CD libre 25 μM y una concentración final de DMSO de 0.001%. Se eliminó el medio antiguo de las células y se añadió el

60

5 medio que contenía cada muestra de polirrotaxano antes de fijar las células a los 30 min, 1.0 h, 3.0 h y 6.0 h después del tratamiento. A continuación, las células fijadas se tiñeron con 0.05 mg.mL<sup>-1</sup> de Filipin seguido de preparación de portaobjetos. La reducción de la acumulación de colesterol se controló cualitativamente mediante la formación de imágenes de la tinción con Filipin en las células, y cuantitativamente mediante la determinación del área de tinción con Filipin con respecto al área celular total. Los resultados se expresan en relación con las células de control no tratadas y se representan como la media ± EE (n = 3).

Ejemplo 1

La síntesis de polirrotaxanos HP-β-CD:poloxámero se realizó a través de la secuencia mostrada en el Esquema 2, donde d, q, n son como se definen en el presente documento y A, B, C y C' son como se muestran.



Esquema 2

Preparación de copolímero tribloque PLURONIC<sup>®</sup> α,ω-bis-tris(2-aminoetil)amina (TAEA-PLURONIC<sup>®</sup>). El procedimiento de síntesis típico de derivados TAEA-PLURONIC<sup>®</sup> se describe a continuación. El copolímero PLURONIC<sup>®</sup> seco (0.400 mmol) se disolvió en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Se añadió lentamente trietilamina (1.5 equivalentes) durante 30 min en un baño de hielo. La mezcla se dejó calentar lentamente hasta 20 °C antes de añadir un exceso de CDI (20.0 mmol). Luego, esta mezcla se agitó bajo nitrógeno durante 24 h a 20 °C y se concentró con un evaporador rotatorio. El producto se precipitó en 500 mL de éter y se filtró en los casos de PLURONIC<sup>®</sup> sólidos (F127 y F68). El producto crudo se lavó con éter, se filtró y se secó al vacío para proporcionar 70 - 98 % de un polvo blanco del copolímero tribloque PLURONIC<sup>®</sup> α,ω-bis-carbonilimidazol. En el caso de los PLURONIC<sup>®</sup> líquidos (L35, L64, L81), los productos se lavaron por centrifugación (8000 rpm, 5 min, 20 °C). Los compuestos intermedios de PLURONIC<sup>®</sup> crudos activados por CDI (3.53 g; 0.276 mmol) se disolvieron en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco antes de la adición de tris(2-aminoetil)amina (13.8 mmol). A continuación, la mezcla se agitó bajo nitrógeno seco a 20 °C durante 24 h. El producto se precipitó en 300 mL de éter y se lavó tres veces con éter dietílico por centrifugación (PLURONIC<sup>®</sup> líquidos) o filtración (PLURONIC<sup>®</sup>) sólidos. El producto final se secó a un vacío de 50 μm de Hg durante 72 h para producir polvos blancos o líquidos amarillos de compuestos intermedios PLURONIC<sup>®</sup> α,ω-bis-tris(2-aminoetil)amina (PLURONIC<sup>®</sup>-TAEA). RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O): δ = 1.00 ppm (m, CH<sub>3</sub> de PPG), 2.60 - 2.80 ppm (m, 16H, CH<sub>2</sub> de TAEA), 3.54 - 3.65 ppm (m, CH<sub>2</sub> de PEG y PPG, CH de PPG).

15

20

25

Preparación de polirrotaxanos protegidos en el extremo con TNBS. Protocolo general. PLURONIC<sup>®</sup> -TAEA secos (0.04 mmol) y 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (es decir, relación de unidades de CD:PPG = 1:2) se disolvieron (o suspendieron) en 15 mL de hexano y la mezcla se agitó con vórtex durante 3 min antes de agitar vigorosamente

30

durante 2 h. Luego, se realizó una sonicación en baño durante 30 min a 30 °C seguida de una sonicación con sonda de 5 min (Modelo W-350, 50 w, sonda de ½") para mejorar la eficiencia de ensartado de los copolímeros de PLURONIC®. A continuación, la mezcla se agitó durante 48 h a 20 °C y se agitó en una placa oscilante durante 24 h más antes de eliminar el hexano y añadir agua para hacer una solución en suspensión a la que se añadieron una solución de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (10 % p/v en agua, 0.24 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (0.24 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C durante 24 h y luego se mezcló durante 24 h adicionales en una placa oscilante para permitir que los productos se agregaran y precipitaran. Los reactivos sin reaccionar y las ciclodextrinas no ensartadas se eliminaron resolviendo dos veces el producto crudo en 10 mL de metanol y precipitando el producto mediante la adición de 500 mL de éter dietílico. El producto se purificó mediante diálisis utilizando membranas de celulosa regenerada con corte de peso molecular de 3.500-14.000 en agua desionizada durante 8 días y se secó mediante liofilización para generar polvos de polirrotaxanos de color amarillo anaranjado. RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.7 ppm (s, 8H, meta H de fenilo), 5.0 ppm (b, C<sub>1</sub>-H de CD), 4.0 ppm (t, 4H, fenil C-NH) 3.5 - 3.8 ppm (m, C<sub>3,5,6</sub>-H de CD), 2.6 - 2.8 ppm (m, 16H, CH<sub>2</sub> de TAEA), 1.0 ppm (d, CH<sub>3</sub> de PPG).

## Ejemplo 2

La preparación de poloxámeros modificados con tris(2-aminotil)amina se logró mediante una ligera modificación del método informado por Li y colaboradores. Li, J. et al., *Advanced Materials* 18: 2969 - 2974 (2006). Se evaluaron disolventes orgánicos para la reacción de ensartado. Se usaron varios disolventes (3 mL) para disolver 100 mg de PLURONIC® F127-TAEA y HP-β-CD en una relación de PPG:CD de 2:1. Las soluciones turbias se sonicaron secuencialmente con baño y sonda, seguido de agitación a 20 °C durante 48 h. Los disolventes de bajo punto de ebullición (por ejemplo, DCM, metanol, éter dietílico, acetato de etilo y hexano) se eliminaron a presión reducida para producir compuestos intermedios de pseudopolirrotaxano blancos. La adición posterior de una solución de suspensión en exceso de sulfonato de 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) en presencia de NaHCO<sub>3</sub>, seguido de la agitación de las soluciones viscosas de color naranja a 20 °C durante 24 h, produjo polirrotaxanos protegidos en los extremos que se purificaron mediante lavado con disolvente y diálisis. Para las reacciones de formación de estructuras tipo rotaxano en disolventes de mayor punto de ebullición, tales como agua, DMSO y DMF, se añadió directamente el reactivo de protección de los extremos TNBS, seguido de un procedimiento de purificación por lavado y diálisis. Un resumen del impacto del tipo de disolvente en el rendimiento de la reacción de polirrotaxano y el porcentaje correspondiente de cobertura del bloque de PPG de PLURONIC® se muestra a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto del disolvente sobre el rendimiento de HP-β-CD:PLURONIC® F127.

Disolvente	ε <sup>a</sup>	mg	Nº de CD <sup>b</sup>	Relación de cobertura (%) <sup>c</sup>
agua	79	2.2	0	0
D <sub>2</sub> O	78	5.2	0	0
DMSO	46	14	0	0
DMF	37	39	0	0
metanol	33	1.4	0	0
diclorometano	9.1	6.8	1	3
acetato de etilo	6.0	24	4	12
éter dietílico	4.2	17	9	28
hexano	1.9	86	11	34

PLURONIC® F127 (Mn 12600, 100 mg), HP-β-CD (Pm 1460, 0.34 g, 1 unidad CD/2 PO), agitado en disolvente (3 mL) durante 48 h a 20 °C antes de la adición de TNBS (0.046 mmol, 0.14 mL) y agitando a 20 °C durante 24 h. a ε: constante dieléctrica, b Número de unidades de HP-β-CD ensartadas, c Determinado por integración de RMN de <sup>1</sup>H, con base en la relación de protones C<sub>1</sub>-H de HP-β-CD y protones de metilo de PPG (asumiendo 1 unidad de CD/2 PPG).

Se utilizó el análisis de espectroscopia RMN de <sup>1</sup>H para determinar el número de ciclodextrinas "ensartadas" en el eje de PLURONIC® comparando las intensidades integrales de las señales de C<sub>1</sub>-H de HP-β-CD (5.05 ppm) y CH<sub>3</sub> de PPG (1.0 ppm). La relación de cobertura se calculó con base en el supuesto de que se incluyen dos unidades de PPG por unidad de CD. Nuestros datos muestran que los disolventes no polares tales como el hexano y el éter dietílico promueven una mayor eficiencia de ensartado que el agua, D<sub>2</sub>O, metanol, DMSO o DMF, que muestran poca o ninguna señal de HP-β-CD en los espectros de RMN del producto. Se puede inferir de estos hallazgos que los disolventes polares hacen que las ciclodextrinas polares se agreguen a través de interacciones de enlaces de hidrógeno entre las caras "ancha" y "estrecha" del toroide, formando así túneles hidrófobos que permiten la inclusión de cadenas de PLURONIC®. Además, aunque no están sujetos a ninguna teoría en particular, los disolventes no polares parecen evitar la autoasociación de copolímeros de PLURONIC® por solvatación de sus bloques de PPG lipofílicos. La estructura de polirrotaxano, obtenida al ensartar HP-β-CD en PLURONIC® F127 en solución de hexano, fue confirmado por RMN <sup>1</sup>H. Un pico de protones a -1.0 ppm se asigna a los grupos metilo de PPG en el copolímero,

mientras que las señales de protones en la región de 3-3.5 ppm se atribuyen a las unidades de metileno (CH<sub>2</sub>) del PEG y algunos de los protones de HP-β-CD. Una señal amplia que se muestra en la región de 4.5 - 5.0 ppm se asigna al protón C<sub>1</sub>-H de HP-β-CD así como el protón OH-8 de la modificación de hidroxipropil ciclodextrina. Las señales de protones de TNB aromático se pueden observar más abajo en la región de 7-8 ppm. El número promedio de unidades de HP-β-CD que se ensartaron en el bloque de PPG se estimó a partir de las intensidades relativas de las señales de RMN de <sup>1</sup>H atribuidas a los picos de C<sub>1</sub>-H, OH-8 de HP-β-CD y al doblete de PPG/CH<sub>3</sub>.

Para confirmar aún más la reacción de formación de estructuras tipo rotaxano entre HP-β-CD y el eje de PLURONIC® F127, se recogieron los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de NOESY bidimensional. Los protones C<sub>3,5</sub>-H internos de HP-β-CD muestran una correlación espacial con los grupos metilo de PPG. Este resultado es consistente con informes anteriores para complejos de polímeros β-CD, lo que sugiere que las moléculas HP-β-CD se ensartaron en las cadenas de PLURONIC® F127. Además, para probar que la reacción de protección del extremo fue efectiva, se realizó espectroscopía UV-visible en soluciones acuosas (0.5 mg/mL) de polirrotaxano de PLURONIC® HP-β-CD: F127 y TNBS libre. Los máximos de absorción del complejo de polirrotaxano (aprox. 345 nm, 422 nm) difieren completamente de los del precursor de TNBS sin reaccionar. Este hallazgo confirma que el correspondiente pseudopolirrotaxano PLURONIC® HP-β-CD:F127 estaba completamente protegido en el extremo.

Se implementaron las mismas condiciones de reacción en hexano para preparar polirrotaxanos basados en otros poloxámeros (copolímeros PLURONIC® F68, L35, L64, L81, con diferentes longitudes de bloque PEG y PPG). En estos casos se utilizaron 0.04 mmol para todos los demás poloxámeros, disueltos en 15 mL de hexano para la reacción de ensartado.

La Tabla 2 resume el efecto del tamaño del bloque de PPG en el porcentaje de cobertura en relación con la máxima cobertura teórica posible para el bloque de PPG. Como se puede observar, la eficiencia de ensartado es inversamente proporcional al balance hidrofílico-lipofílico (HLB) del eje del poloxámero, observándose altas coberturas para PLURONIC® L81 y PLURONIC® L64. Estos hallazgos son consistentes con nuestra hipótesis de que los disolventes no polares favorecen la reacción de formación de estructuras tipo rotaxano al promover interacciones entre el bloque de PPG hidrófobo y la cavidad hidrófoba de los monómeros de HP-β-CD autoasociados. PLURONIC® F127 es una excepción a esta tendencia, probablemente debido a los grandes bloques de PEG que flanquean el núcleo de PPG, lo que suprime la reacción de formación de estructuras tipo rotaxano debido a interacciones hidrófobas más débiles entre la cavidad de ciclodextrina y los bloques de PEG.

Tabla 2. Peso molecular y pureza de los polirrotaxanos

Polirrotaxano	HLB <sup>a</sup>	CAC(%) <sup>a</sup>	% de CD libre (UPLC)	n <sub>co</sub>	Eficiencia de enhebrado	Pm (RMN)	Pm (MALDI)	Altura promedio (nm)	Tamaño promedio (nm)
07HP.F127	22	0.004	3.3	7	22	24008	24939	2.20	80
02HP.F68	29	0.04	0.90	2	15	12458	13059	1.30	50
04HP.L35	19	1	2.3	4	44	8928	8109	0.81	61
06HP.L64	15	0.14	6.0	6	43	12848	13248	1.30	70
11HP.L81	2	0.0063	1.5	11	52	20048	17611	0.39	48

En la Tabla 2, y en otras partes del presente documento, la notación nHP.XXX se refiere al número n de moléculas de HP-β-CD que están "ensartadas" en un "eje" de poloxámero, donde XXX indica el tipo de "eje" de poloxámero.

La eficiencia de ensartado se calculó con base en una supuesta relación de unidades de 1 HP-β-CD:2 PO. nCD se refiere al número de moléculas de HP-β-CD ensartadas en el núcleo de PLURONIC® determinado por Integración de RMN de <sup>1</sup>H. Los valores de CD libre (p/v) se determinaron mediante cromatografía UPLC utilizando HP-β-CD como estándar. El tamaño y la altura promedio de los productos de polirrotaxano se determinaron a partir de imágenes de AFM de los productos finales. HLB: equilibrio hidrofílico-lipofílico, CAC: concentración crítica de agregación, donde los valores han sido adaptados de P. Laibinis et al., J. Coll. Interfaz. Sci. 1991, 142, 74.

Análisis MALDI-TOF MS de polirrotaxanos HP-β-CD:poloxámero. Se usó espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar la distribución de masas molares de los productos de polirrotaxano formados por la secuencia que se muestra en el Esquema 2.

La espectroscopia de RMN y la cromatografía SEC son los métodos más comunes empleados para la caracterización de polirrotaxano; sin embargo, también se puede usar el análisis de composiciones del polirrotaxano polidimetil siloxano: ciclodextrina y pesos moleculares usando MALDI-TOF. La composición de la matriz de polirrotaxano: ILM 1:80, evaluada inicialmente para HP-β-CD: se encontró que el polirrotaxano PLURONIC® F127, con la mezcla THAP/TMG (relación 1:2 en metanol) produce las mejores relaciones señal-ruído. Los espectros de RMN de polirrotaxanos muestran un intervalo de picos correspondientes a diferentes grados de ensartado de HP-β-CD (n<sub>CD</sub>). Se encontró que la intensidad máxima disminuía al aumentar los valores m/z de polirrotaxano, hasta que la señal ya no era discernible desde la línea base. Para todos los polirrotaxanos, los valores de m/z observados correspondieron a la suma de las cadenas de poloxámero protegidas en el extremo con TNB + 1460 × n<sub>CD</sub>. Curiosamente, los espectros revelan un incremento gradual de masa que difiere en 1460 Da, correspondiente a la masa molar del monómero de HP-β-CD. Además, las familias de picos de iones más intensos estaban de acuerdo con los valores calculados por RMN como se resume en la Tabla 2, sin embargo, los perfiles espectrales muestran que los productos de polirrotaxano son compuestos polidispersos (los espectros MALDI-TOF se pueden observar en la información de respaldo).

Formación de imágenes de AFM de polirrotaxanos. Usando AFM en modo de toque, se observaron microestructuras de polirrotaxanos HP-β-CD 100% agregados. Todos los polirrotaxanos aparecen como grandes agregados globulares de diferentes tamaños, con diámetros promedio que oscilan entre 47 y 80 nm y alturas que varían entre 0.5 - 2 nm. Estos datos muestran que las moléculas de polirrotaxano se agrupan en ensamblajes esféricos, presumiblemente debido a interacciones laterales de enlaces de hidrógeno entre las hidroxipropil-β-ciclodextrinas tipo rotaxano. La combinación de eficiencias bajas de ensartado y extremos de PEG flexibles y sin ensartado promueve la agregación de los dominios hidrófobos PPG-HP-β-CD en partículas esféricas que están rodeadas por una corona de PEG, de acuerdo con lo informado por Zhang. *et al.* La apariencia esférica de estas partículas sugiere que pueden poseer atractivas propiedades de larga circulación *in vivo* evitando su rápida eliminación de la sangre a través de la filtración renal.

### Ejemplo 3

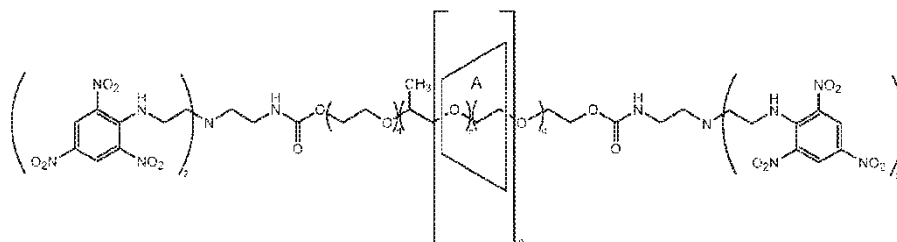
Respuesta de células de fibroblastos *NPC2*<sup>-/-</sup> a la exposición a polirrotaxano. La asociación no covalente de HP-β-CD con polirrotaxanos basados en poloxámeros confiere a estos polímeros la capacidad de desensartar fácilmente las unidades de ciclodextrina de los ejes del polímero tras la eliminación del grupo protector de los extremos debido, por ejemplo, a la activación enzimática. Recientemente se han evaluado varios esquemas de activación enzimática, sin embargo, no se ha informado ninguno para las células NPC. Para investigar los polirrotaxanos que liberarán HP-β-CD tras la activación dentro de las células NPC para promover la solubilización del colesterol y la salida del lisosoma, se investigó la reacción de escisión del extremo protegido y la cinética de desensartado de los complejos de polirrotaxano HP-β-CD:poloxámero que se expusieron a tampones de diferentes pH como una imitación de su respuesta a los compartimentos del endosoma neutro (pH 7.4) y ácido (pH 5.5). El análisis de HPLC de polirrotaxano basado en F127 (07HP.F127, 2 mg/ml) expuesto a tampón PBS, pH 7.4 o tampón de citrato, pH 5.5 a 37 °C, reveló que el polirrotaxano HP-β-CD: PLURONIC® F127 es estable tanto en condiciones de pH ligeramente ácidas como neutras. Aunque este resultado fue alentador en términos de la estabilidad de las partículas de polirrotaxano en condiciones fisiológicas antes de la endocitosis, sugirió que la escisión de el extremo protector del portador de polirrotaxano dentro de endosomas/lisosomas tardíos ácidos sería lenta en estas condiciones. Sorprendentemente, sin embargo, el tratamiento de fibroblastos *npc2*<sup>-/-</sup>, que tienen reservas sustanciales de colesterol almacenado de manera aberrante, con polirrotaxanos, produjeron una disminución sustancial y rápida en la tinción con filipina, proporcionando una indicación cualitativa de la reducción del colesterol dentro de estas células. La evaluación dependiente del tiempo de la tinción con filipina en estas células proporcionó evidencia adicional de la acumulación reducida de colesterol para todos los compuestos de polirrotaxano a niveles que fueron similares al grado de reducción del colesterol producido por HP-β-CD libre 25 μM, es decir, 60 a 80 % de los controles no tratados.

Si bien no está sujeto a ninguna teoría en particular, este hallazgo sugiere que los polirrotaxanos se internalizaron y se desensartaron dentro de células *npc2*<sup>-/-</sup>, liberando así HP-β-CD libre que luego podría movilizar el colesterol almacenado de manera aberrante. Con base en estos hallazgos, se cree que el grupo TNB se escinde del polirrotaxano mediante una reacción enzimática o de reducción que ocurre dentro de las células. Existe una cantidad significativa de datos que indican que los sustratos de nitrobenzoceno se reducen por las enzimas nitroreductasas que están

presentes en numerosos tejidos humanos. Si bien no está vinculado a ninguna teoría en particular, con base en estos hallazgos y el mecanismo de reducción secuencial de los nitrocompuestos aromáticos, se puede inferir que los protectores de los extremos del trinitrobencono unidos al carbamilo de los polirrotaxanos se reducen a sustituyentes de amina estéricamente más pequeños que permiten que las ciclodextrinas se deslicen fuera de los ejes del polímero. Una explicación alternativa es que el enlace de carbamato que une al protector del extremo a la estructura del polirrotaxano puede servir como sustrato para la hidrólisis de la tirosinasa, lo que provoca la eliminación del protector del extremo y el posterior desensartado del polirrotaxano.

Ejemplo 4

En el presente documento se describe un agente para la obtención de imágenes de resonancia magnética (RM) de  $Gd^{3+}$  basado en polirrotaxano construido a partir de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y un poloxámero (por ejemplo, un copolímero tribloque tal como PEG-PPG-PEG). Se sintetizó una familia de polirrotaxanos basados en  $\beta$ -CD que poseen enlaces carbamato escindibles con el protector del extremo del polirrotaxano (PRTx), que tiene la fórmula:



donde d, q, n y A son como se definen en el presente documento.

Estos compuestos tienen un núcleo de poloxámero (por ejemplo, un copolímero tribloque tal como PEG-PPG-PEG) que se ha ensartado con 5-15 copias de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) ( $n = 5-15$ ) o 3-11 copias de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) ( $n = 3-11$ ) como se muestra en las Tablas 3 y 4:

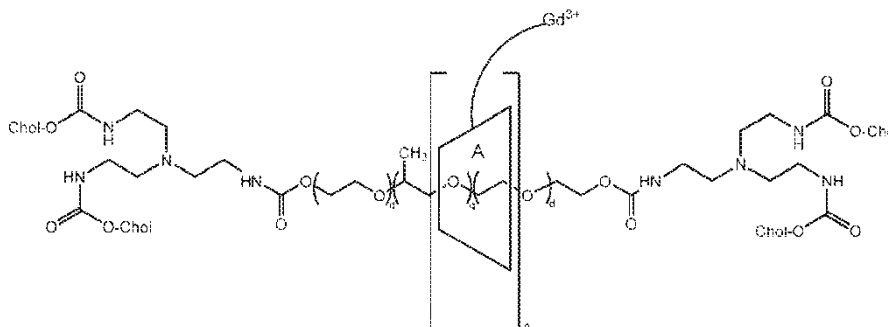
Tabla 3

Base polimérica (PLURONIC®)	n $\beta$ - CD	% de ensartado	PM (RMN)	PM (GPC)	PM (AUC)
F127	15	71	30.8 kDa	33.3 kDa	30.0
F68	14	100	25.5 kDa	28.5 kDa	-
L64	12	92	11.0 kDa	13.1 kDa	-
L35	5	62	17.7 kDa	17.1 kDa	-

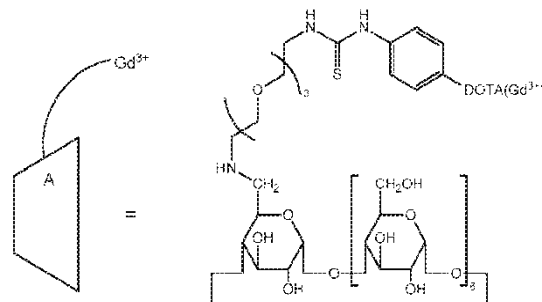
Tabla 4

Base polimérica (PLURONIC®)	n HP- $\beta$ -CD	% de ensartado	PM (RMN)
F127	11	34	29.8 kD
F68	4	29	15.3 kDa
L64	4	27	7.5 kDa
L35	3	36	10.0 kDa
L81	5	23	11.3 kDa

También se sintetizaron compuestos de fórmula:



donde Chol se refiere a un grupo colesterilo; d, q, y n son como se definen en el presente documento; y



Dichos compuestos a veces se denominan en este documento "PRTx-DOTA" y "PRTx-DOTA (Rad)", cuando los compuestos comprenden uno o más nucleídos (Rad) quelados por DOTA.

- 5 Se utilizó la inclusión de los bloques de PPG del poloxámero por HP- $\beta$ -CD para construir un polirrotaxano que retiene las unidades de CD a través de los protectores de los extremos de bis-carbamilcolesterol. Si bien no están sujetos a ninguna teoría en particular, los polirrotaxanos descritos en el presente documento parecen tener una morfología similar a una barra flexible que puede mejorar en gran medida su farmacocinética al conferirles propiedades de circulación prolongada. Dado que se sabe que HP- $\beta$ -CD forma complejos de inclusión con los bloques de PPG del poloxámero, esta propiedad se utilizó para construir protectores de los extremos del colesterol con polirrotaxano que se unieron mediante enlaces carbamato (HP- $\beta$ -CD:F127-Chol).

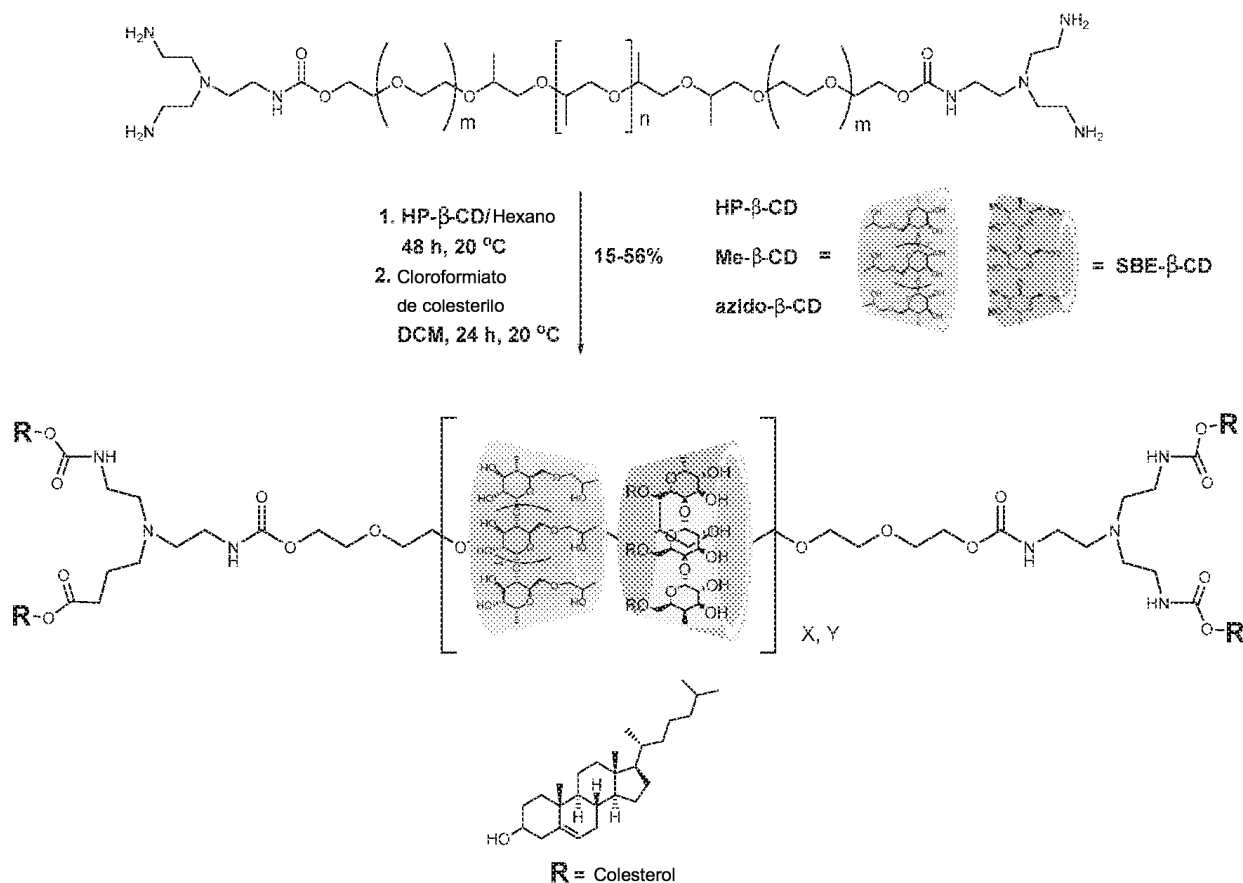
15 Análisis por RMN de  $^1\text{H}$ , la espectroscopia de efecto Overhouser nuclear 2D y la espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS) indicaron que el polirrotaxano transportaba 15 copias de HP- $\beta$ -CD, con un peso molecular de 35 kDa y una cobertura de bloques de PPG de  $\sim 46\%$ . El polirrotaxano también se analizó para determinar la presencia de contaminación por HP- $\beta$ -CD libre mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa y cromatografía líquida de interacción hidrófila; ambas técnicas indicaron  $\leq 10\%$  de HP- $\beta$ -CD libre. El HP- $\beta$ -CD:F127-Chol se modificó luego con un exceso de oligo(etilenglicol) a través del acoplamiento activado por CDI para aumentar la solubilidad en agua del material. Finalmente, este se conjugó con DOTA-Bn-NCS a través de un enlace de tiocarbamato y luego se acomplejó con  $\text{Gd}^{3+}$  para obtener el PRTx-DOTA( $\text{Gd}^{3+}$ ) final con  $\sim 14$  fracciones DOTA ( $\text{Gd}^{3+}$ ) unidas. Las imágenes de AFM de las muestras indicaron que el polirrotaxano preparado tenía una morfología similar a una barra con longitudes en el intervalo de 30 - 40 nm por AFM. Se sabe que las partículas con dimensiones inferiores a 3 - 7 nm se eliminan rápidamente del torrente sanguíneo debido a que el tamaño efectivo de los poros de la pared glomerular es de aproximadamente 8 nm. Se anticipó, por lo tanto, que el  $\text{Gd}^{3+}$ :DOTA- $\beta$ -CD:poloxámero PRTx tendría una tasa de eliminación de la sangre mucho más lenta que el control de  $\text{Gd}^{3+}$ :DOTA- $\beta$ -CD monomérico debido a la alineación del flujo y la ampliación del diámetro efectivo de la barra de PRTx a  $\sim 4.6$  nm debido al injerto de PEG-DOTA.

A continuación, los materiales sintetizados se evaluaron en un modelo de ratón para determinar sus capacidades de mejora del contraste. Los datos de IRM revelan que PRTx-DOTA ( $\text{Gd}^{3+}$ ) tuvo una relación de mejoramiento (ER) de 2 veces en el corazón durante 30 min. Por el contrario, la ER de  $\beta$ -CD-DOTA( $\text{Gd}^{3+}$ ) de control cayó de 1.5 a 1 durante un período de 30 min. Además, los datos de IRM también indicaron que la ER observada en el riñón con PRTx-DOTA ( $\text{Gd}^{3+}$ ) se redujo de 2 a 1.6 durante un período de 30 min, mientras que lo observado con  $\beta$ -CD-DOTA ( $\text{Gd}^{3+}$ ) de control descendió rápidamente de 1.9 a 1.1 durante un período de 30 min, lo que indica una filtración renal rápida del control. El contraste de RM superior del PRTx-DOTA ( $\text{Gd}^{3+}$ ) en el corazón a los 30 min en comparación con el control confirmó además la farmacocinética mejorada del polirrotaxano. El aumento del peso molecular y las dimensiones de las construcciones de  $\beta$ -CD reducen su tasa de filtración renal debido al efecto EPR después de la modificación con  $\text{Gd}^{3+}$ :DOTA, lo que conduce a una vida media en circulación sustancialmente más larga y a relaciones de mejora en ratones para la estructura del polirrotaxano en comparación con el control del monómero HP- $\beta$ -CD. Además, los polirrotaxanos se eliminaron a través de la vejiga y no se observó toxicidad aguda. Exposición de fibroblastos  $2^{-/-}$  de Niemann-Pick tipo C al compuesto original  $\beta$ -CD:poloxámero PRTx (es decir, antes de la activación de DOTA y la carga de  $\text{Gd}^{3+}$ ) revela que las estructuras de polirrotaxano protegidas en los extremos con carbamilo permanecen intactas en medios suplementados con suero hasta que se transportan al compartimento de LE/LY, donde las unidades  $\beta$ -CD se liberan de la cadena principal del polímero a través de la eliminación inducida por pH o enzimas de los protectores de los extremos PRTx. Si bien no están sujetos a ninguna teoría en particular, estos hallazgos sugieren que el PRTx puede excretarse como una especie intacta. Además, estos resultados tomados en conjunto sugieren que PRTx-DOTA ( $\text{Gd}^{3+}$ ) pueden ser agentes potenciales para la mejora vascular debido a su falta de toxicidad aguda y propiedades de circulación prolongada.

#### Ejemplo 5

Se preparó una biblioteca de compuestos de  $\beta$ -CD:polirrotaxano Pluronic (PR) mezclando a fondo 4-sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD) con el segundo derivado deseado de  $\beta$ -CD en estado sólido mediante una molienda extensa de los dos polvos de  $\beta$ -CD antes de iniciar las reacciones de ensartado del polímero y protección de los extremos. Los

5 compuestos intermedios de pseudopolirrotaxano generados por este procedimiento fueron protegidos en los extremos con cloroformiato de colesterol para generar el producto PR correspondiente como se muestra en el Esquema 3. Se utilizó el análisis de RMN <sup>1</sup>H para determinar el número de unidades de β-CD ensartadas en el eje de Pluronic comparando las intensidades integrales de las señales de C1-H de HP-β-CD (5.05 ppm) y CH<sub>3</sub> de PPG (1.0 ppm). Para los compuestos que contienen SBE-β-CD, el pico ancho de la fracción CH<sub>2</sub> de sulfobutilo a 1.7 ppm se usó para determinar el número de unidades de SBE-β-CD incorporadas. La relación de cobertura se calculó con base en el supuesto de que se incluyen dos unidades de PPG por unidad de CD. El número estimado de unidades de β-CD totales ensartadas en cada copolímero y el porcentaje de cobertura de β-CD de las muestras correspondientes a Pluronic L81 PR obtenidas de β-CD, HP-β-CD, Me-β-CD y azido-β-CD solas o como especies mixtas de β-CD se muestran en la Tabla 5.



Esquema 3. Ruta de síntesis empleada para derivados de PR mezclados con β-CD/SBE-β-CD

Tabla 5

PR basado en Pluronic L81	Composición de βCD/SBE-β-CD <sup>a</sup>		Cubrimiento <sup>a</sup>		Peso molecular		
	Relación de alimentación	CD total encontrado	CD total (%)	SBE-βCD (%)	Rendimiento de PR <sup>b</sup> (%)	Pm, RMN	Pm, GPC <sup>c</sup>
β-CD-PR	100	18	82	-	44	2.60 × 10 <sup>4</sup>	8.03 × 10 <sup>4</sup>
HP-β-CD-PR		11	50	-	13	2.17 × 10 <sup>4</sup>	3.60 × 10 <sup>4</sup>
Me-β-CD-PR	100	8	36	-	20	1.61 × 10 <sup>4</sup>	1.70 × 10 <sup>4</sup>
azido-p-CD-PR	100	8	36	-	25	1.49 × 10 <sup>4</sup>	2.26 × 10 <sup>4</sup>
β-CD/SBE-β-CD-PR	50:50	21	95	41	35	3.70 × 10 <sup>4</sup>	5.40 × 10 <sup>4</sup>

PR basado en Pluronic L81	Composición de $\beta$ CD/SBE- $\beta$ -CD <sup>a</sup>		Cubrimiento <sup>a</sup>		Peso molecular		
	Relación de alimentación	CD total encontrado	CD total (%)	SBE- $\beta$ CD (%)	Rendimiento de PR <sup>b</sup> (%)	Pm, RMN	Pm, GPC <sup>c</sup>
HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR	50:50	19	86	46	37	$3.85 \times 10^4$	$1.50 \times 10^4$
Me- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR	50:50	19	86	64	27	$4.00 \times 10^4$	$1.16 \times 10^4$
azido-p-CD/SBE-p-CD-PR	50:50	18	82	64	35	$3.91 \times 10^4$	$5.19 \times 10^4$
SBE- $\beta$ -CD-PR	100	21	95	100	63	$4.72 \times 10^4$	NA

Los pesos moleculares de los PR estimados por productos de análisis de RMN de  $^1\text{H}$  se compararon luego con los resultados de GPC-MALS/RI usando DMSO como eluyente (Tabla 5). Los pesos moleculares determinados por el análisis de GPC concuerdan en general con los valores calculados a partir de RMN, excepto para  $\beta$ -CD/PR, que parece autoagregarse en DMSO de acuerdo con la aparición de un pico de PM muy alto en el cromatograma de GPC.

Para evaluar el papel de la competencia de  $\beta$ -CD en la reacción de formación de estructuras tipo rotaxano mixtas, se prepararon mezclas binarias que contenían  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, Me- $\beta$ -CD o azido- $\beta$ -CD mezcladas con SBE- $\beta$ -CD en diferentes relaciones molares comenzando con 0 % de SBE- $\beta$ -CD. Las mezclas sólidas de  $\beta$ -CD se suspendieron en hexano de modo que el copolímero Pluronic L81 tuviera fácil acceso a ambos huéspedes de  $\beta$ -CD en la mezcla. Cuando el porcentaje de eficiencia de ensartado de cada par de  $\beta$ -CD se representa frente a la relación molar porcentual de SBE- $\beta$ -CD en la alimentación de reacción, la eficiencia de ensartado de los derivados de  $\beta$ -CD sin carga permanece aproximadamente constante mientras que la cantidad de SBE- $\beta$ -CD ensartado en el eje del polímero aumenta al aumentar la relación de alimentación. Si bien no está sujeto a ninguna teoría específica, se cree que dado que las modificaciones estructurales de los derivados de  $\beta$ -CD pueden variar significativamente entre los derivados de  $\beta$ -CD descritos en este documento, el disolvente de hexano atrapado en CD se desplaza más fácilmente desde la cavidad de SBE- $\beta$ -CD por los extremos de PEG de la cadena del polímero que las cavidades de los otros derivados de  $\beta$ -CD no iónicos menos polares.

Se usó FTIR para analizar los compuestos de PR; estos espectros se compararon con los de los precursores monoméricos de  $\beta$ -CD puros y el precursor Pluronic L81. El pico correspondiente al carbamato de protección de los extremos del colesterol aparece a  $1672\text{ cm}^{-1}$  y las vibraciones de estiramiento COC y CNC del grupo carbonilo en el enlace carbamato emergen a  $1109\text{ cm}^{-1}$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, para todos los PR. La amplia absorción entre  $3100 - 3500\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de estiramiento del hidroxilo de CD. Un pico fuerte a  $2103\text{ cm}^{-1}$  también se observó en los compuestos de PR azido- $\beta$ -CD:Pluronic L81 y de PR azido- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD:Pluronic L81, correspondientes al modo de estiramiento de azida, lo que indica que el PR aislado de estas reacciones tiene un contenido significativa de azido- $\beta$ -CD.

Las estructuras de los productos PR se caracterizaron aún más mediante la dispersión de rayos X de gran angular (WAXS). Se observa un pico único cerca de  $2\theta = 20^\circ$ ; este pico es diferente de los encontrados en el correspondiente  $\beta$ -CD puro o Pluronic L81. Las muestras amorfas de HP- $\beta$ -CD, Me- $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD y  $\beta$ -CD muestran picos a  $12.04^\circ$ ,  $14.36^\circ$ ,  $18.24^\circ$  y  $21.76^\circ$ . En conjunto, estos datos sugieren la presencia de una estructura cristalina tipo canal para todas los PR  $\beta$ -CD generados en este estudio, similar a las estructuras tipo canal que se informaron anteriormente en la literatura.

La inclusión de Pluronic dentro de las unidades de  $\beta$ -CD fue respaldada además por el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas de DSC de  $\beta$ -CD puro (excepto azido-p-CD), así como el polímero Pluronic L81 no modificado, no producen transiciones endotérmicas significativas. Esto probablemente se deba al desorden del polvo microcristalino de  $\beta$ -CD durante la primera fase de calentamiento, lo que produce un sólido amorfo que no tiene transiciones de fusión. Para azido-p-CD, el pico a  $140^\circ\text{C}$  se puede atribuir a la extrusión de  $\text{N}_2$ . Por otro lado, se observan claras transiciones endotérmicas para el PR. Esto corresponde a la agregación de segmentos en forma de varilla de la especie PR vecina más cercana en dominios microcristalinos que se funden a temperaturas elevadas. Los intercambios de entalpía correspondientes a todos los PR basados en SBE- $\beta$ -CD parecen ser más pequeños que los de los materiales de CD simple y PR mixto. Es posible que la repulsión de carga causada por los grupos sulfonato de SBE- $\beta$ -CD impida que estas macromoléculas se empaqueten en estructuras ordenadas.

La estabilidad térmica de PR también se evaluó mediante análisis termogravimétrico (TGA). La  $\beta$ -CD pura, con la excepción de azido- $\beta$ -CD y SBE- $\beta$ -CD, tuvo un solo evento de descomposición térmica. Azido-p-CD produce un perfil diferente con una fuerte pérdida de peso a  $440^\circ\text{C}$  que indica la descomposición del grupo azida y la pérdida de  $\text{N}_2$  (g) de la CD. Las múltiples pérdidas de peso observadas para SBE- $\beta$ -CD probablemente se deban a procesos de

deshidratación, extrusión y/o agrietamiento (por ejemplo, pérdida de H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub> y butanosulfona) de las modificaciones de  $\beta$ -CD.

Los termogramas de PR mostraron dos o más etapas en el proceso de degradación térmica. La primera etapa se atribuye a la descomposición térmica de las correspondientes ciclodextrinas, mientras que la segunda está relacionado con la degradación del copolímero Pluronic L81. Aparentemente, las pérdidas de peso de los complejos de polímeros de inclusión son más lentas que las de la  $\beta$ -CD libre, lo que sugiere que la  $\beta$ -CD unida al bloque de PPG confiere mayor estabilidad térmica a la  $\beta$ -CD que a las especies monoméricas de CD. Además, las temperaturas de descomposición del Pluronic L81 durante la segunda fase de degradación de PR aumentan en relación con la del polímero libre. Se puede inferir de estas observaciones, sin estar limitado por ninguna teoría específica, que la inclusión de las cadenas de PPG dentro de las cavidades de CD proporciona una mayor estabilidad térmica para el copolímero al amortiguar las vibraciones del segmento de polímero inducidas térmicamente a través de colisiones de pared de PPG- $\beta$ -CD. Estos hallazgos, es decir, que la estabilidad térmica tanto de la especie  $\beta$ -CD como del copolímero tribloque Pluronic L81 aumentan con la formación de estructuras tipo rotaxano, sugieren que el polímero está incluido dentro de la cavidad hidrófoba de  $\beta$ -CD.

Usando microscopía TEM de tinción negativa, se observan las microestructuras de las dispersiones de PR. Se obtuvieron micrografías de TEM para PR HP- $\beta$ -CD:Pluronic L81 y PR HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD:Pluronic L81, que se eligieron como modelos para todas las PR preparados. Ambos compuestos muestran autoagregación para producir partículas esféricas. PR HP- $\beta$ -CD:Pluronic L81 dio lugar a nanopartículas con diámetros de 10-88 nm, mientras que, en las mismas condiciones, los PR HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD:Pluronic L81 se agregaron en partículas más regulares y pequeñas que tenían 6-12 nm de diámetro. Si bien no está sujeto a ninguna teoría específica, la diferencia neta observada entre estas dos muestras puede explicarse por la repulsión de la carga electrostática entre las CD sulfonadas, lo que evita una agregación más extensa de los PR en el caso de PR HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD: Pluronic L81.

Se realizaron experimentos para probar si las solubilidades de PR HP- $\beta$ -CD se mejoran lo suficiente como para permitir estudios de detección en células Niemann Pick Tipo C. Se cree que las cargas negativas introducidas por las unidades de SBE- $\beta$ -CD en los complejos de PR reducen su agregación y mejoran su solubilidad en agua. Para probar esta suposición, las muestras obtenidas de las mezclas HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD se disolvieron en agua nanopura y se controló la apariencia de las soluciones. Se encontró que aumentar la cantidad de SBE- $\beta$ -CD en la estructura de PR conduce a una mejora significativa en su solubilidad en agua, particularmente para las muestras con proporciones molares de SBE- $\beta$ -CD de  $\geq 25\%$ . Es bien sabido que los PR basadas en CD son generalmente insolubles en agua debido a la agregación de sus estructuras similares a varillas. La incorporación de SBE- $\beta$ -CD, un material altamente soluble en agua, conduce a interacciones intermoleculares más débiles y mejores solubilidades en agua de los productos de PR mixtos.

Dado que la incorporación de SBE- $\beta$ -CD aumenta significativamente la solubilidad de PR, se realizaron experimentos para determinar si PR con composiciones mixtas de  $\beta$ -CD también eran biológicamente activas en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Niemann-Pick Tipo C. Se administraron PR que portaban un porcentaje creciente de SBE- $\beta$ -CD a fibroblastos deficientes en Niemann-Pick C1 de (*npc1<sup>-/-</sup>*) para examinar su capacidad para movilizar el colesterol desde los sitios de acumulación aberrante. Cada miembro de la familia de PR, generado con una relación de alimentación de SBE- $\beta$ -CD del 0 %, 30 %, 50 %, 60 % o 100 %, se administró a una concentración total de  $\beta$ -CD de 25  $\mu$ M y se comparó con la administración monómeros SBE- $\beta$ -CD o HP- $\beta$ -CD 25  $\mu$ M como controles. Las comparaciones se realizaron a concentraciones equivalentes de  $\beta$ -CD en estos experimentos, de modo que cada construcción de PR que contenía 10 copias de  $\beta$ -CD se administró a una concentración molar 10 veces menor que para los controles de monómero de  $\beta$ -CD, de modo que cualquier diferencia aparente en la movilización del colesterol podría atribuirse al agente PR (un tipo de fármaco de  $\beta$ -CD) más que a la concentración total del fármaco añadido a las células.

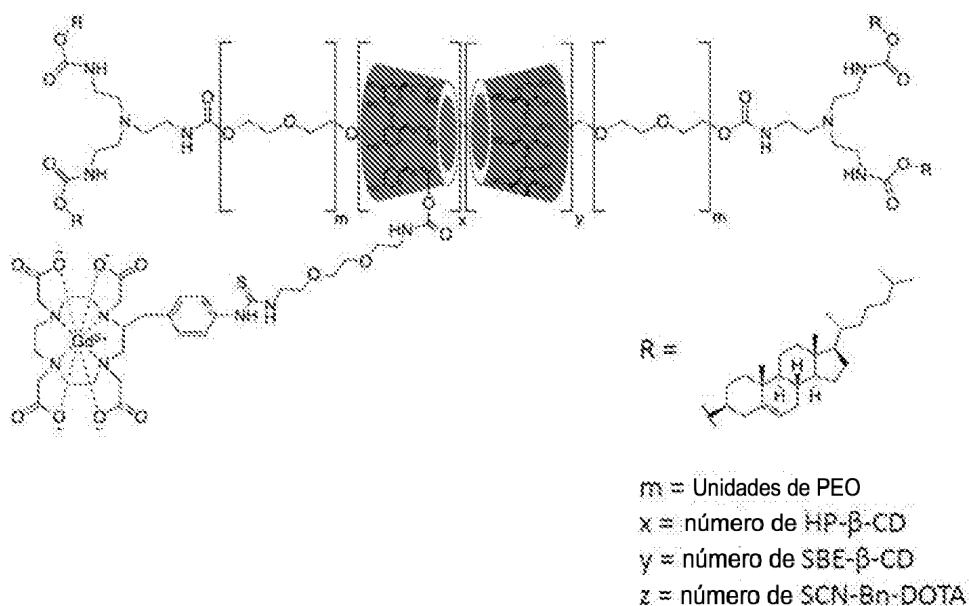
El análisis de la movilización del colesterol 6 h después del tratamiento reveló que estos miembros de la familia de PR se desempeñan aproximadamente de manera equivalente a sus respectivos monómeros en los ensayos de movilización del colesterol. Los monómeros HP- $\beta$ -CD y SBE- $\beta$ -CD redujeron la tinción promedio de filipina en fibroblastos *npc1<sup>-/-</sup>* a aproximadamente el 75 % de los niveles de control sin tratar después de 6 h. El PR compuesto por 100 % de HP- $\beta$ -CD y 100 % de SBE- $\beta$ -CD se realizó de manera equivalente, cada una de las cuales disminuyó la tinción con filipina a ~78 % del control. Los PR con una relación de SBE- $\beta$ -CD:HP- $\beta$ -CD de 30:70 disminuyeron la fluorescencia a ~65 % del grupo no tratado. Los PR con una carga de fármaco SBE- $\beta$ -CD:HP- $\beta$ -CD de 50:50 o 60:40 fueron menos efectivas, disminuyendo la fluorescencia al 86 % y al 83 %, respectivamente. Sería necesario una selección más amplia de las concentraciones de PR para determinar si la incorporación de proporciones bajas de SBE- $\beta$ -CD (por ejemplo, 30 %) puede mejorar significativamente la salida de colesterol en relación con los monómeros de  $\beta$ -CD o PR con porcentajes más altos de SBE- $\beta$ -CD. Los experimentos de control con DMSO no mostraron ningún efecto del tratamiento con DMSO sobre la tinción con filipina. Estos experimentos muestran claramente que los PR generados a partir de reacciones de ensartado mixtas conservan su actividad de movilización de colesterol *in vitro*.

En resumen, estos experimentos representan un método de síntesis eficiente para la construcción de PR basado en  $\beta$ -CD mixtos usando una estrategia heterogénea. La competencia entre los monómeros de  $\beta$ -CD durante la reacción de formación de estructuras tipo rotaxano probablemente esté dictada por un equilibrio entre la repulsión electrostática entre las unidades vecinas de SBE- $\beta$ -CD, la capacidad de enlace de hidrógeno intermolecular de los diversos

derivados de  $\beta$ -CD y sus solubilidades relativas en el disolvente orgánico utilizado durante la reacción de ensartado heterogéneo. Se infiere un proceso de ensartado cooperativo de la  $\beta$ -CD durante la reacción de formación de estructuras tipo rotaxano, lo que conduce al ensartado de CD mixtos en el núcleo del polímero. La formación de estructuras tipo rotaxano de SBE- $\beta$ -CD aumentó en función de su relación molar creciente en la alimentación. Curiosamente, las solubilidades en agua de los PR mejoraron significativamente debido a la presencia de unidades de SBE- $\beta$ -CD en el producto de PR. La incorporación de SBE- $\beta$ -CD dentro de la estructura del PR no afecta significativamente su capacidad para movilizar el colesterol almacenado de forma anómala en relación con los controles monoméricos de  $\beta$ -CD. La síntesis de PR soluble en agua con unidades definidas de azida puede abrir posibilidades para modificaciones posteriores ortogonales y controladas para una amplia variedad de aplicaciones, incluida una forma más fácil de administrar y retener de derivados de  $\beta$ -CD para mejorar la terapia para Niemann-Pick Tipo C.

#### Ejemplo 6

Síntesis de agentes de contraste de polirrotaxanos basados en HP- $\beta$ -CD y SBE- $\beta$ -CD ( $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR). Los enfoques esquemáticos utilizados para sintetizar los agentes de contraste de polirrotaxano se representan en el Esquema 4.



Esquema 4

Primero, la síntesis de una familia de polirrotaxanos HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD:Pluronic<sup>®</sup> se realizó de acuerdo con los procedimientos informados previamente en condiciones heterogéneas. Se consideraron cinco copolímeros de Pluronic<sup>®</sup> que incluyen F-127, F-68, L-35, L-64, L-81 en función del tamaño, así como de los bloques de óxido de polietileno (PEG) y óxido de polipropileno (PPG) de los polímeros. Los compuestos se prepararon mezclando a fondo SBE- $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD con una relación molar del 30 % de SBE- $\beta$ -CD en su estado sólido mediante una molienda extensiva de las dos ciclodextrinas en una mezcla finamente pulverizada antes de iniciar las reacciones de ensartado y de protección de los extremos del polímero usando hexano como disolvente. Los compuestos intermedios de pseudopolirrotaxano generados por este procedimiento se protegieron en los extremos a través de un enlazador de carbamato con cloroforato de colesterol para generar los productos de polirrotaxano correspondientes. Se utilizó el análisis de espectroscopia RMN de  $^1H$  para cuantificar el número de ciclodextrinas ensartadas en los ejes de Pluronic<sup>®</sup> comparando las intensidades integrales de las ciclodextrinas, señales de  $C_1$ -H de HP- $\beta$ -CD (4.5 - 5.0 ppm) y de HP- $\beta$ -CD (1.6 ppm) y de  $CH_3$  de PPG (1.0 ppm) de Pluronic<sup>®</sup>. La relación de cobertura se calculó basándose en la suposición de que una molécula de CD era capaz de incluir dos unidades de PPG en su cavidad. El pico de protones a ~1.0 ppm se asigna a los grupos metilo de PPG en el copolímero, mientras que las señales de protones en la región de 3 - 3.5 ppm se atribuyen a las unidades de metileno ( $CH_2$ ) del PEG y algunos de los protones HP- $\beta$ -CD. La señal amplia que se muestra en la región de 4.5 - 5.0 ppm se asigna al protón  $C_1$ -H de las ciclodextrinas. El ensanchamiento de los picos en esta región confirma que los copolímeros de Pluronic<sup>®</sup> se ensartaron con éxito con las ciclodextrinas. La Tabla 6 resume la cantidad de CD que tiene cada uno de los ejes de Pluronic<sup>®</sup>, el porcentaje de cobertura así como la cantidad porcentual de SBE- $\beta$ -CD contenida en las moléculas. La eficiencia del ensartado tiende a mejorar con polímeros que tienen una alta relación de unidades de PPG a PEG. Esto se puede ver con L-35, L-64 y L-81 con una relación de PPG/PEG de 0.72, 1.2 y 7.2 respectivamente. Las proporciones de las ciclodextrinas en los polirrotaxanos parecen estar controladas entre los compuestos en el intervalo de 40 a 50 % de SBE- $\beta$ -CD. Los compuestos intermedios de PR HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD:Pluronic<sup>®</sup> se activaron luego con CDI antes de la modificación con un exceso de 1,8-diamino-3,6-oxo-octano para aumentar la solubilidad en agua de los materiales e incorporar la función amina

para conjugaciones químicas adicionales. Finalmente, los compuestos intermedios de DADO-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR se acoplaron con DO3A-Bn-SCN y luego se trataron con GdCl<sub>3</sub> para obtener el Gd<sup>3+</sup>-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR final con diferente quelante DO3A unido de acuerdo con lo determinado por RMN de <sup>1</sup>H (Tabla 6).

5 Tabla 6. Resumen del número y cobertura de las CD de los agentes de contraste de polirrotaxanos basados en Gd<sup>3+</sup>-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD.

Polirrotaxano	# de CD <sup>a</sup>	# de HP $\beta$ CD <sup>a</sup>	# de SBE $\beta$ CD <sup>a</sup>	% de cobertura de CD	# de DO3A <sup>b</sup>
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F127	10	6	4	31	12
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F68	5	3	2	38	15
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L35	16	10	6	100	14
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L64	11	6	5	73	22
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L81	20	10	10	91	22

<sup>a</sup> Determinado por RMN de <sup>1</sup>H. <sup>b</sup> Estimado utilizando la integración de RMN de los protones de fenilo de DOTA normalizados con protones de metilo de PPG.

Los pesos moleculares de los compuestos se estimaron por análisis de RMN de <sup>1</sup>H, GPC-MALS/RI y análisis de ultracentrifugación analítica (AUC) con DMSO como eluyente se usaron para comparación (Tabla 7).

Tabla 7. Peso molecular promedio de los polirrotaxanos Gd<sup>3+</sup>-DOTA-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD.

Polirrotaxano	Pm (RMN)	Pm (GPC)	Pm (AUC)	# de DO3A <sup>a</sup>	% Contenido del de Gd <sup>b</sup>
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F127	39251	34120	33300	12	4.5
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F68	29529	24770	11800	15	11
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L35	40232	52630	29100	14	6.2
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L64	39065	30610	11800	22	8.0
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L81	54705	49430	-	22	5.2

<sup>a</sup> Estimado utilizando la integración de RMN de los protones de fenilo de DOTA normalizados con protones de metilo de PPG. <sup>b</sup> Análisis ICP-MS.

10 Los pesos moleculares relativos determinados por el análisis de GPC concuerdan en general con los valores calculados a partir de la RMN, mientras que los valores de AUC son más bajos para la mayoría de los compuestos. Esto puede explicarse por la preparación de la muestra de centrifugación utilizada para sortear los problemas de solubilidad. Dado que los polirrotaxanos son muy polidispersos, los sobrenadantes considerados para el análisis de AUC presumiblemente contienen moléculas de polirrotaxano de bajo peso molecular. En la Tabla 7, se indican los porcentajes en peso de los contenidos de Gd en las muestras, evaluados con análisis de ICP-MS. Estos valores son relativamente bajos, presumiblemente debido a la pérdida de Gd durante la purificación por diálisis que requería mantener el pH del agua en 7 durante varios días. Las propiedades físicas de las muestras se caracterizaron con análisis de DLS (Tabla 8).

20 Tabla 8. Diámetros hidrodinámicos y potencial zeta de polirrotaxanos Gd<sup>3+</sup>-DOTA-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD

Polirrotaxano	Tamaño (nm)	PDI	Potencial de $\xi$ (v)
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F127	230	0.46	- 3.5
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-F68	138	0.49	- 13
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L35	116	1.0	- 6.0
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L64	120	0.40	- 9.4
Gd <sup>3+</sup> -HP $\beta$ CD/SBE $\beta$ CD-L81	173	1.0	- 11

25 Los diámetros hidrodinámicos de los compuestos disueltos en agua están en el intervalo de 116 a 140 nm a excepción de Gd<sup>3+</sup>-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-F127 y Gd<sup>3+</sup>-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-L64 que probablemente experimentaron agregación. Los datos de DLS también revelaron que los compuestos están ampliamente polidispersos, como se observó anteriormente en nuestros trabajos anteriores. Las mediciones del potencial zeta indicaron que los agentes de contraste de polirrotaxanos tienen una carga ligeramente negativa debido a la carga negativa de sulfonato de SBE- $\beta$ -CD, lo que mejora significativamente la solubilidad en agua de los compuestos.

30 Relaxividad molar de los Gd<sup>3+</sup>-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR. La dispersión de relajación magnética nuclear de protones (DRMN de <sup>1</sup>H) se utilizó para medir la relaxividad T<sub>1</sub> de los agentes de contraste del polirrotaxano. Esta técnica es un método magnético no destructivo de campo bajo que generalmente se usa para recopilar la dinámica molecular de una sustancia a través de la medición de la constante de red de espín nuclear 1/T<sub>1</sub> en un intervalo de intensidades de campo magnético. Los perfiles obtenidos a 30 °C cubren 30 valores de campos magnéticos desde 0.24 mT hasta 0.97

T de todos los compuestos, excepto para Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L64, disueltos en no deuterado se representan en la FIG. 1 y muestran ligeros aumentos de 20 MHz a 40 MHz para todos los compuestos. Este nivel fuera de las curvas de  $r_1$  aproximadamente 30 MHz es característico de los agentes de contraste macromoleculares como los dendrímeros que muestran un máximo de perfiles de DRMN alrededor de esta región. Los monómeros de quelato de GD(III) tales como DOTAREM® y Prohance® tienen perfiles de DRMN de <sup>1</sup>H que no muestran ningún incremento o máximo en las mismas regiones. Las relaxividades más bajas y más altas se observaron para Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F68 (12.2 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, 40 MHz) y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L35 (6.7 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, 40 MHz). Estos valores son relativamente bajos en comparación con los de los dendrímeros. Esto puede explicarse por la alta flexibilidad, es decir, la libre rotación y traslación de las CD alrededor del eje de los polímeros de las construcciones de polirrotaxano, lo que induce un largo tiempo de residencia,  $T_M$ . Generalmente, el tiempo de residencia debe ser razonablemente corto para aumentar la relajación de las macromoléculas. Además, el tiempo de rotación,  $T_R$  de estas estructuras flexibles se espera que sean cortas, lo que conduce a una menor relaxividad en comparación con las nanopartículas rígidas, tales como los dendrímeros, que tienen una estructura compacta que impone restricciones dinámicas rotacionales isotrópicas y, por lo tanto, aumentan  $r_R$ . La medición de la relaxividad de los agentes de contraste de polirrotaxano en campos superiores discretos (1.5 T o campo clínico, 3 T) es necesaria para evaluar sus propiedades de obtención de imágenes de RM.

También se realizó una medición de campo fijo de la relaxividad en soluciones acuosas de los agentes de contraste de polirrotaxano en el intervalo de 0.05 a 1.0 mM usando un escáner Bruker BioSpec de 7 T (261 MHz) a 23 °C. La relaxividad  $r_1$  y  $r_2$  se determinaron graficando los tiempos de relajación longitudinal inverso ( $1/T_1$ ) y transversal ( $1/T_2$ ), respectivamente, en función de las concentraciones de Gd. Como se muestra en la FIG. 2, la  $r_1$  y la  $r_2$  de los agentes de contraste de polirrotaxano es mayor que la de DOTAREM® (Tabla 9), lo que indica que estos compuestos tienen características de agente de contraste de IRM macromolecular.

Tabla 9. Relaxividad molar de polirrotaxanos basados en Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD y DOTAREM®

Polirrotaxano	$r_1$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) (DRMN de <sup>1</sup> H)	$r_1$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) ( $1/T_1$ )	$r_2$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) ( $1/T_2$ )
DOTAREM	-	3.8	3.7
Gd <sup>3+</sup> -HPβCD/SBEβCD-F127	7.9	22	19
Gd <sup>3+</sup> -HPβCD/SBEβCD-F168	12	10	17
Gd <sup>3+</sup> -HPβCD/SBEβCD-L35	6.9	8.2	14
Gd <sup>3+</sup> -HPβCD/SBEβCD-L64	-	7.0	10
Gd <sup>3+</sup> -HPβCD/SBEβCD-L81	11	14	14

Estas altas relaxividades obtenidas para los compuestos de polirrotaxano en un campo alto probablemente se pueden atribuir a un aumento de su tiempo de volteo rotacional  $T_R$ , que en este caso es una combinación tanto del movimiento general de las macromoléculas como de los movimientos internos de las cadenas laterales que influyen en las tasas de relajación, como han demostrado Lipari y sus colaboradores. Además, dado que se sabe que los polirrotaxanos tienen poca solubilidad en agua, su agregación podría tener un impacto severo en el incremento de la relaxividad. Este fenómeno fue observado recientemente por Elhabiri et al. Los valores más altos obtenidos para Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F127 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L35 con esta técnica en comparación con la de DRMN de <sup>1</sup>H probablemente se deba al campo más alto donde se realizó la medición. Los grupos de Wood y Bologh han informado que las aplicaciones de alto campo a complejos con  $T_M$  más corto puede producir alta relaxividad. Los valores de relaxividad,  $r_1$  y  $r_2$ , de Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F127, Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F68 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L81 son mayores que las de Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L35 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L64. Esto puede explicarse en parte por el tamaño de los bloques de PEG de los compuestos. Los grandes bloques de PEG del Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F127 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F68 (200 y 152 unidades de óxido de etileno respectivamente) probablemente faciliten el acceso de las moléculas de agua al quelato de Gd dentro de las partículas. Kodjima et al., observaron el mismo efecto del tamaño de PEG sobre la relaxividad de los dendrímeros PEGilados. En el caso de Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L81, su alta cobertura de subprocesos (90 %) probablemente imparte a la molécula una estructura en forma de varilla, lo que podría limitar ciertos grados de libertad de los CD a lo largo del eje del polímero y por lo tanto, reduzca la velocidad de volteo de la molécula y acorte su tiempo de relajación como resultado.

En algunas realizaciones, los polirrotaxanos de las diversas realizaciones descritas en el presente documento tienen una relaxividad molar dependiente de la concentración ( $1/T_1$  y/o  $1/T_2$  medida en agua desionizada a 7 T y 25 °C) o de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (por ejemplo, aproximadamente 5 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> hasta aproximadamente 50 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, aproximadamente 25 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> hasta aproximadamente 35 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, aproximadamente 50 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a aproximadamente 100 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, o aproximadamente 50 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> hasta aproximadamente 150 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>).

Obtención de imágenes de RM *in vitro* de polirrotaxanos Gd (III). Para evaluar las propiedades de mejora de la señal de las muestras de polirrotaxano, se registraron imágenes ponderadas de RM de eco de espín  $T_1$  para soluciones acuosas de las muestras con concentraciones crecientes de Gd. Las imágenes de DOTAREM® y agua pura también se obtuvieron en las mismas condiciones. Se observó mejoramiento alto de contraste positivo para todos los polirrotaxanos basados en Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD con las manchas que se vuelven más brillantes con el aumento de la concentración de Gd en comparación con los obtenidos de DOTAREM®. Sin embargo, el brillo de las señales se

observa a partir de la concentración más baja con Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F127 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L35. Estos resultados mostraron que las muestras preparadas tienen una formación de imágenes de contraste similar o mejor que DOTAREM®.

5 Mejoramiento del contraste de IRM *in vivo* de los Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-PR. Para investigar el mejoramiento del  
 10 contraste de RM y el destino de la circulación *in vivo* de los polirrotaxanos, se adquirieron imágenes de RM ponderadas  
 de T1 tridimensionales de ratones Balb/C después de la inyección intravenosa con un escáner para animales  
 pequeños Bruker 7 T antes de la inyección y 10, 20, 35, 50 y 60 minutos después de la inyección. El mejoramiento del  
 15 contraste del tejido de los compuestos tiene diferentes destinos que dependen de la eficiencia de ensartado, el peso  
 molecular, el tamaño y la carga superficial de cada agente de contraste. Se presentan las FIGS. 3A-3E, donde las  
 imágenes de proyección de máxima intensidad obtenidas de todos los agentes de contraste de polirrotaxano, excepto  
 Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L64, muestran grandes mejoras de contraste para la mayoría de los compuestos de  
 polirrotaxano en corazón, hígado, riñón, después de 15 min, y vejiga después de 35 min. En general, las intensidades  
 de contraste disminuyen progresivamente con el tiempo en el corazón y el sistema circulatorio, pero aumentan  
 significativamente en la vejiga después de la depuración renal. Como era de esperar, DOTAREM® se eliminó por  
 completo en 20 minutos, una tendencia típica comúnmente observada para los agentes de contraste pequeños.

20 Sorprendentemente, Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F127 ha mostrado menor realce de contraste en comparación con el  
 resto de los polirrotaxanos. Esto probablemente se deba al bajo ensartado (31 %) que exponen los grandes bloques  
 de PEG y casi la mitad del bloque de PPG del Pluronic F127. Aparentemente, el bloque de PPG hidrófobo envolvió  
 los pocos quelatos de GD(III) junto con los bloques de PEG que forman una corona que los protege de tener acceso  
 25 al agua. Kojima et al. han observado un fuerte efecto de los bloques de PEG grandes (PEG 5k) en la reducción de la  
 relaxividad y la mejora de los dendrímeros PEGilados en comparación con PEG 2k cortos.<sup>71</sup> Por el contrario, los  
 agentes de contraste de polirrotaxanos ensartados tales como Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L35 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-  
 β-CD-L81 muestran las mejoras más altas, probablemente debido a su alta eficiencia de ensartado que confiere una  
 morfología similar a la de una barra en circulación y, como consecuencia, evitan la absorción de macrófagos y  
 permanecen en circulación por más tiempo.

30 Para cuantificar las mejoras de contraste, se calculó la relación señal-ruido (CNR) de contraste a partir de las regiones  
 de interés (ROI) cuidadosamente dibujadas en las imágenes de sección transversal del corazón, el hígado y los riñones  
 obtenidas de escaneos ponderados de T<sub>1</sub> bidimensionales. Hubo un aumento de señal insignificante en todos estos  
 tejidos (FIG. 4). En el corazón, se observaron aumentos de señal significativos para todos los polirrotaxanos, y los  
 35 aumentos más notables se obtuvieron con Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F68, Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L35 y Gd<sup>3+</sup>-HP-  
 β-CD/SBE-β-CD-L81. Parece que estos compuestos persisten en circulación más tiempo que DOTAREM® y Gd<sup>3+</sup>-HP-  
 β-CD/SBE-β-CD-F127. Estas observaciones pueden explicarse por la eficiencia de ensartado y el alto peso molecular  
 de los primeros compuestos. Los perfiles renales se ven diferentes en una forma en que Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-  
 F127 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L81 muestran acumulación y permanecen más tiempo en el tejido. Para el hígado,  
 40 aparte de Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L81, que muestra un alto nivel de acumulación y demuestra una persistencia  
 sostenida, el resto de los polirrotaxanos muestran una presencia entre baja y media en los tejidos. De hecho, Gd<sup>3+</sup>-  
 HP-β-CD/SBE-β-CD-L35 y Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F68 acumulados en el hígado con el tiempo con un aumento del  
 25 % de la intensidad de contraste para el último y del 10 % para el primero 70 min después de la inyección. Las líneas  
 de SNR de Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-F127 están por debajo de DOTAREM®

40 Citotoxicidad *in vitro*. Para evaluar la biocompatibilidad de los Gd-polirrotaxanos, se evaluó su viabilidad celular  
 utilizando el ensayo de MTS en células de macrófagos J774. Los resultados mostrados en la FIG. 5 se normalizaron  
 a una muestra de control de células incubadas sin muestra. En general, Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-PR tienen un efecto  
 moderado sobre la proliferación celular a una concentración de Gd de 0.1 mM, lo que indica una tolerancia razonable  
 45 de los agentes de contraste de polirrotaxano segura para experimentos *in vivo*. A esta concentración, la viabilidad  
 celular oscila entre el 70 y el 83 % para todos los polirrotaxanos excepto para Gd<sup>3+</sup>-HP-β-CD/SBE-β-CD-L81. Esto  
 podría atribuirse al bloque de PEG muy pequeño que tienen los copolímeros Pluronic L81, ya que se ha demostrado  
 que PEG puede disminuir la citotoxicidad en los agentes de contraste de macromoléculas basados en Gd.

50 Estudios de absorción celular. Dado que las construcciones macromoleculares como los polirrotaxanos pueden activar  
 el sistema inmunitario innato (monocitos, macrófagos, células dendríticas) *in vivo*, los macrófagos evaluaron su  
 absorción del contraste de polirrotaxano utilizando la modalidad de formación de imágenes de RM. Además, se pueden  
 aprovechar las propiedades biológicas de estos materiales para obtener imágenes de macrófagos en enfermedades  
 humanas como el cáncer, la aterosclerosis, el infarto de miocardio, la diabetes y otras afecciones. Se sabe que los  
 macrófagos desempeñan un papel importante en la defensa del sistema huésped, lo que conduce al destino perjudicial  
 55 de la mayoría de los nanomateriales. Del mismo modo, la sobreexpresión de macrófagos está relacionada con muchas  
 enfermedades, incluida la regulación de tejidos y la angiogénesis en el cáncer,<sup>76-78</sup> desestabilización de lesiones que  
 conducen a la ruptura de placas de arteria que conducen a accidentes cerebrovasculares y enfermedades  
 inflamatorias. La formación de imágenes de RM se ha utilizado para controlar el crecimiento tumoral y la terapia del  
 cáncer, predecir el riesgo de enfermedad cardiovascular y visualizar la progresión de la diabetes mediante la  
 60 acumulación de macrófagos en los sitios del tumor o de la lesión. Con base en estos informes, se evaluó la absorción  
 celular en macrófagos J774 de los agentes de contraste de polirrotaxano. Los compuestos se incubaron con células  
 J774 a una concentración final de Gd 0.1 mM durante 12 horas a 37 °C en medios sin suero y se lisaron para obtener  
 imágenes de RM. Los valores de T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> de las células lisadas contenidas en tubos eppendorf de 300 μL se midieron

utilizando una secuencia de recuperación de inversión a 7 T y se evaluaron los tiempos de relajación de la inversa de la red de espín ( $1/T_1$ ) y spin-spin ( $1/T_2$ ). Como se muestra en la FIG. 6, los tiempos de relajación se acortan con macrófagos tratados con los  $Gd^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR mientras DOTAREM<sup>®</sup> no mostró ninguna endocitosis en comparación con la célula de control que no se trató con muestras. Dado que los polirrotaxanos no están dotados de ninguna capacidad de direccionamiento para mejorar su endocitosis a través de la vía mediada por receptores, sus altas absorciones observadas son inespecíficas y probablemente se deban a la repartición del colesterol para protección de los extremos de los polirrotaxanos en las membranas celulares que favorecen su internalización. Esta suposición está respaldada por la baja absorción de DOTAREM<sup>®</sup> que no posee ninguna propiedad lipofílica. Estos resultados sugieren que los agentes de contraste de polirrotaxano son atractivos para formación de imágenes *in vivo* y diagnóstico de varias enfermedades asociadas a los macrófagos.

Análisis proteómico de la corona dura de proteína de polirrotaxano. La química superficial y de carga de los polirrotaxanos descritos en este ejemplo se evaluó mediante la incorporación de derivados de  $\beta$ -CD como mezclas de especies en un núcleo de Pluronic L81. Ver cómo la incorporación de diferentes derivados de CD influye en su rendimiento biológico proporcionará información sobre la importancia de los aspectos fisicoquímicos generales e informará la selección de candidatos para condiciones objetivo específicas. Con ese fin, se desarrollaron y caracterizaron cuatro polirrotaxanos diferentes que contienen diferentes derivados de  $\beta$ -CD, a saber,  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, beta ciclodextrina metilada (Me- $\beta$ -CD) y una mezcla de HP- $\beta$ -CD y polirrotaxanos basada en sulfobutil éter beta ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD) (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de la cantidad y cobertura de CD de polirrotaxanos para análisis proteómico

Polirrotaxano	Relación de alimentación de CD	CD total	SBE- $\beta$ -CD	PM (RMN) (KDa)
$\beta$ -CD	100	18	0	26
HP- $\beta$ -CD	100	11	0	22
Me- $\beta$ -CD	100	8	0	16
HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD	50:50	19	8	58

La incorporación de SBE- $\beta$ -CD en una estructura de PR introduciría repulsión electrostática. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría específica, se anticipa que los grupos sulfonato en los polirrotaxanos tienen el potencial de cambiar drásticamente la forma en que los PR se comportan e interactúan con los componentes de la sangre. Por otro lado, HP- $\beta$ -CD proporciona un exceso de grupos hidroxilo en la superficie de los polirrotaxanos que podrían inducir más interacciones de enlaces de hidrógeno, mientras que la introducción de Me- $\beta$ -CD sin duda reduciría estas interacciones de enlaces de hidrógeno.

Los cambios en los derivados de CD transportados por las estructuras de PR produjeron diferencias en las cantidades e identidades de las proteínas que componen la corona dura de PR. Las cantidades totales de proteína adsorbida variaron mucho entre las CD incorporadas en los polirrotaxanos y, por lo tanto, su química de superficie, como se muestra en la FIG. 7. La  $\beta$ -CD no modificada acumuló la mayor cantidad de proteínas de superficie, posiblemente debido a la rigidez de la cadena principal con enlaces de hidrógeno y la disponibilidad de alcoholes de superficie reactivos en el borde de la CD. Los PR de HP- $\beta$ -CD tuvieron la segunda adsorción de proteína promedio más alta, posiblemente por razones similares. La disminución de HP- $\beta$ -CD en relación con PR de  $\beta$ -CD sin modificar puede estar mediada por un escudo similar a un cepillo que se origina en las modificaciones de HP o una disponibilidad menos regular de alcoholes reactivos. Me- $\beta$ -CD y PR ensartados mixtos recogieron aproximadamente la misma cantidad de proteína a pesar de exhibir químicas de superficie muy diferentes. La adsorción disminuida en Me- $\beta$ -CD puede originarse por la protección de los alcoholes superficiales. También parece que la incorporación de CD cargadas también reduce la adsorción por algún mecanismo, potencialmente por una mayor repulsión o la reducción de las interacciones hidrófobas. Es necesario un estudio más cuidadoso para identificar definitivamente los mecanismos detrás de estas diferencias.

Con el fin de discernir si ciertas arquitecturas de polirrotaxano interactuarán específicamente dentro de ciertas vías, las proteínas presentes en cada corona se clasificaron en ciertas familias respectivas. Al comparar grupos de proteínas, la variación de CD nuevamente condujo a cambios en la deposición preferencial de familias de proteínas (FIG. 7). En toda la familia, los polirrotaxanos tenían altos porcentajes de lipoproteínas adsorbidas. La corona que presentaba el porcentaje más bajo de contenido de lipoproteínas era el polirrotaxano basado en  $\beta$ -CD sin modificar, y esta familia representaba ~30 % de la corona total. La incorporación de CD sin modificar parece impulsar el reclutamiento de otras familias de proteínas, reduciendo el porcentaje ocupado por disopsoninas de lipoproteínas. Además, debido a que todos los miembros de esta familia de polirrotaxanos adsorben porcentajes similares de lipoproteínas, parece que la asociación con estas proteínas es modificada por el núcleo o las protecciones de los extremos de PR, no por las químicas específicas de CD. Se sabe que las lipoproteínas transportan colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos a través del torrente sanguíneo y, por lo tanto, pueden ser propensas a asociarse con las protecciones de los extremos del colesterol del polirrotaxano. En particular, PR  $\beta$ -CD y PR HP- $\beta$ -CD logran una deposición de inmunoglobulina significativamente mayor que sus contrapartes. Esto puede deberse al reconocimiento de anticuerpos de las arquitecturas de 1,4-glucosa, ya que las cadenas principales rígidas de azúcar podrían parecerse a las superficies presentes en las bacterias invasoras. Esto podría indicar que estos materiales serán propensos a una

eliminación más rápida del cuerpo. Los PR de HP- $\beta$ -CD también representan las fracciones más grandes de albúmina de suero del grupo, con un contenido de albúmina de ~20 %, aunque cada PR recogió esta proteína en cierta medida. Nuevamente, esta asociación puede explicarse por la asociación de la protección de los extremos con bolsas hidrófobas de albúmina.

5 Las PR de HP- $\beta$ -CD también presentaban niveles significativamente reducidos de adsorción del complemento a pesar de los alcoholes no modificados en la superficie de la CD, y el complemento C3 solo representaba el ~2 % de la corona en relación con otras arquitecturas. Por el contrario, los PR de Me- $\beta$ -CD se encontraban entre los reclutadores de proteínas del complemento más altos a pesar de la reducción de la química de la superficie del alcohol, lo que implica un mecanismo de adsorción distinto de la modificación covalente. Las cuatro estructuras exhiben poca deposición de  
10 proteínas de la vía de la coagulación. Es probable que esto se deba en parte al uso de suero humano, que carece de fibrinógeno, y no de plasma humano.

En la Figura 8 se muestra una tabla que muestra las proteínas más abundantes en la corona de cada PR. La proteína más abundante en la corona de los PR  $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD no modificados es la albúmina de suero. Esta mayor representación de la albúmina superficial puede otorgar a estas arquitecturas un tiempo de circulación prolongado en  
15 relación con otras arquitecturas. En ambos casos, la segunda proteína más abundante es la inmunoglobulina kappa, que refleja el porcentaje más alto de sus coronas representadas por albúminas e inmunoglobulinas. Ambas arquitecturas cuentan con un gran número de lipoproteínas en sus 20 proteínas principales. Además, ambas coronas de polirrotaxanos contienen serotransferrina y apolipoproteína E (ApoE), lo que aumenta el potencial de penetración de la barrera hematoencefálica (BBB).

20 PR de Me- $\beta$ -CD y SBE- $\beta$ -CD mezclada comparten sus tres proteínas más abundantes, que representan ~45.2 % y ~41.5 % de sus coronas totales, respectivamente. Estas proteínas son el complemento C3, la apolipoproteína E y la albúmina de suero, respectivamente. Es interesante que el complemento C3 sea relativamente más abundante a pesar de la protección de los alcoholes superficiales reactivos, lo que nuevamente sugiere un mecanismo alternativo a la unión covalente. Hacer que el complemento C3 ocupe la fracción predominante de la corona proteica puede dar lugar  
25 a reacciones de hipersensibilidad mediadas por la vía del complemento. El alto porcentaje de apolipoproteína E en Me- $\beta$ -CD y el polirrotaxano de ensartado mixto, 16.9% y 12.2% respectivamente, aumenta las posibilidades de que estas arquitecturas crucen la BBB. El hecho de que estas arquitecturas compartan fracciones tan grandes de sus coronas es interesante dadas las diferencias fisicoquímicas en las CD que transportan.

Colectivamente, todos los miembros de la familia de PR comparten diez de sus veinte proteínas más abundantes.  
30 Entre estas proteínas se encuentran el complemento C3, la albúmina de suero, tres inmunoglobulinas y cuatro lipoproteínas. Muchas de las otras proteínas superponen múltiples arquitecturas pero no están presentes en las cuatro coronas. Cada par de PR comparte entre 13 y 15 proteínas identificadas. Esto muestra que la respuesta de la proteína del suero a la incubación con PR es similar a pesar de las diferencias en el carácter de la CD. Entonces, en general, las similitudes entre las estructuras de PR (estructura del polímero, química de la protección de los extremos y forma)  
35 pueden desempeñar un papel más importante en el reclutamiento de proteínas que el carácter de CD.

La composición y química de la superficie de los polirrotaxanos obviamente controla la unión de las proteínas séricas en sus coronas duras. Sin embargo, las identidades reales de las proteínas en la corona pueden ser muy similares. Esto indica que la estructura general de los polirrotaxanos puede ser lo suficientemente similar en la mayoría de los casos para promover el reclutamiento de proteínas similares en su superficie.

40 En resumen, se sintetizaron y caracterizaron cinco agentes de contraste de polirrotaxano basados en gadolinio HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD con proporciones relativas de la CD ensartadas controladas entre los compuestos en el intervalo de 40 a 50 % de SBE- $\beta$ -CD. Los resultados de DLS sugirieron que los polirrotaxanos están polidispersos con tamaños que oscilan entre 110 y 290 nm. Las mediciones de potencial zeta indicaron que los compuestos tienen una carga ligeramente negativa debido a la carga negativa de sulfonato de SBE- $\beta$ -CD. Esta carga negativa contribuye a mejorar  
45 significativamente su solubilidad en agua. Dispersión de relajación magnética nuclear (DRMN de  $^1\text{H}$ ) y la medición de la relajación molar reveló a 23 °C que todos los polirrotaxanos tenían una alta relajación de espín-espín ( $T_1$ ) y una tasa de relajación de red de espín ( $T_2$ ) en comparación con DOTAREM<sup>®</sup> comercial (Gd-DOTA). Los estudios de absorción y viabilidad de células de macrófagos demostraron una baja toxicidad de todos los agentes macromoleculares y una alta absorción celular mientras que DOTAREM<sup>®</sup> casi no mostró absorción celular. Las imágenes ponderadas de  $T_1$  *in vivo* adquiridas con 7 T en ratones Balb/c inyectados por vía intravenosa a razón de 0.05 mmol Gd/kg de peso corporal con las soluciones salinas de Gd-HP $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR mostraron un aumento en la intensidad del contraste para  
50 todos los polirrotaxanos con tiempos de circulación más largos en grupos de sangre que el de DOTAREM<sup>®</sup>. Un análisis de absorción de macrófagos revela que estos agentes de contraste macromoleculares pueden ser atractivos para la obtención de imágenes *in vivo* y el diagnóstico de varias enfermedades asociadas a macrófagos, como el cáncer. Además, un estudio de proteómica de los polirrotaxanos indica que la composición y la química de su superficie controlan la unión de las proteínas séricas en sus coronas duras; su estructura general puede ser lo suficientemente similar para promover el reclutamiento de proteínas similares en su superficie.  
55

60 Materiales. Copolímeros tribloque Pluronic F127 (EO 200, PO 65, PM = 12600), F68 (EO 153, PO 29, PM = 8350), L35 (EO 22, PO 16, Pm = 1900), L64 (EO 26, PO 30, PM = 2900) y L81 (EO 6, PO 43, PM = 2800) se adquirieron a través de Sigma-Aldrich y se secaron mediante destilación azeotrópica de benceno al vacío antes de su uso. La 2-

hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, con un grado de sustitución promedio de 6.8, carbonildiimidazol (CDI), trietilamina (TEA), tris(2-aminoetil)amina (TAEA), cloroformiato de colesterilo, también se adquirieron a través de Sigma-Aldrich y se utilizaron directamente. Se obtuvo 4-sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD o Captisol) a través de Cydex Pharmaceuticals (Lawrence, KS) con un grado promedio de sustitución de SBE de 6.0 - 7.1 y también se usó sin purificación adicional. El ácido tetraacético S-2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (p-SCN-Bn-DOTA) se obtuvo a través de Macrocyclics (Dallas, TX). Todos los disolventes eran de grado reactivo, adquiridos de fuentes comerciales, se secaron sobre  $\text{CaH}_2$ , se filtraron, se destilaron a presión reducida y almacenaron bajo argón antes de su uso. Las membranas de diálisis de celulosa se obtuvieron a través de Spectrum Labs y se sumergieron en agua desionizada durante al menos 30 minutos antes de su uso. se generó  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura (resistividad  $\approx 18.0 \text{ M}\Omega/\text{cm}^{-1}$ ) utilizando un sistema de agua ultrapura NANOpure.

Síntesis de polirrotaxanos plurónicos HP-P-CD/SBE- $\beta$ -CD protegidos en los extremos de bis-colesterol (HP-P-CD/SBE-P-CD-PR). Antes de la síntesis de los polirrotaxanos, todos los copolímeros de Pluronic se modificaron para obtener Pluronic  $\alpha,\omega$ -bis-tris(2-aminoetil)amina. A continuación, se llevó a cabo la síntesis de los polirrotaxanos de acuerdo con el procedimiento de ensartado de ciclodextrina heterogénea descrito anteriormente con ligeras modificaciones. Típicamente, 2 g de cada copolímero tribloque Pluronic de  $\alpha,\omega$ -bis-tris(2-aminoetil)amina seco se suspendieron en 70 mL de hexano y se dispersaron mediante baño de ultrasonido durante aproximadamente 5 min, antes de agitar hasta que la solución parecía homogénea. Se mezclaron HP- $\beta$ -CD y SBE- $\beta$ -CD con una relación molar del 30 % de SBE- $\beta$ -CD utilizando la relación de la unidad CD:PO = 1:2 para cada tipo de Pluronic y se molieron finamente durante 30 min. Las mezclas de ciclodextrina en polvo se añadieron a la suspensión de polímero antes de agitar vigorosamente durante 2 h. A continuación, las mezclas se sonicaron en baño durante 1 h a 20 °C, seguido de sonicación con sonda durante 10 min (Modelo W-350, 50 W, sonda de 1/2") para mejorar la dispersión de los copolímeros Pluronic. Se permitió que las mezclas se agitaran durante 72 h a 20 °C antes de eliminar el disolvente a presión reducida y los materiales resultantes se volvieron a disolver en 40 a 60 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco antes de añadir cloroformiato de colesterilo (12 equivalentes). Las mezclas de reacción se agitaron a 20 °C durante 24 h, se concentraron y luego se precipitaron en éter dietílico (700 mL). Para eliminar los reactivos sin reaccionar y las ciclodextrinas sin ensartar, los productos crudos se disolvieron en  $\text{CH}_3\text{OH}$  (300 mL) y se precipitaron en 500 mL de éter dietílico y luego se filtraron. Finalmente, los productos se purificaron mediante diálisis secuencial utilizando membranas de celulosa regenerada con corte de peso molecular de 12,000 - 14,000 y 6,000 - 8,000 en DMSO primero y se intercambiaron progresivamente con agua desionizada durante 5 días antes de la liofilización para generar polvos blancos de HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR-Chl. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, sonda criogénica, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 6.92 ppm (S, carbamato de H-NCO), 5.25 ppm (t, 1H, Chl-etileno H), 4.5 - 5.0 ppm (b,  $\text{C}_1$ -H de CD), 4.5 ppm (b, OH propilo de HP- $\beta$ -CD), 3.5 - 3.8 ppm (m,  $\text{C}_{3,5,6}$ -H de las CD), 3.5 ppm (m, PEG- $\text{CH}_2$ ), 2.6 - 2.8 ppm (m, 16H,  $\text{CH}_2$  de TAEA), 1.6 ppm (b,  $(\text{CH}_2)\text{-SO}_3^-$ ), 1.2 ppm (d,  $\text{CH}_3$ -HP- $\beta$ -CD), 1.0 ppm (d,  $\text{CH}_3$  de PPG), 0.8 - 0.6 ppm (m, Chl- $\text{CH}_3$ ).

Síntesis de polirrotaxano modificado con 1,8-diamino-3,6-dioxooctano (DADO-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR). El polirrotaxano seco (200 mg) de la etapa anterior se disolvió en 20 mL de DMSO y se agitó en atmósfera de argón. A estas mezclas, se añadió TEA (1.5 equivalentes de grupos OH) y las reacciones se agitaron durante 30 min antes de añadir un exceso de 1,1'-carbonildiimidazol y se dejó agitar durante 24 h. A continuación, se añadió lentamente a las soluciones un exceso de 1,8-diamino-3,6-dioxooctano y las mezclas se dejaron en agitación durante 24 h a 20 °C. Los productos se purificaron por diálisis usando membranas de celulosa regenerada con corte de peso molecular de 12,000 - 14,000 y 6,000 - 8,000 en DMSO y agua desionizada durante 3 días, luego se liofilizaron para generar el polvo blanco de los polirrotaxanos modificados con 1,8-diamino-3,6-dioxooctano (DADO-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, sonda criogénica, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 6.92 ppm (S, carbamato de H-NCO), 5.25 ppm (t, 1H, Chl-etileno H), 4.5 - 5.0 ppm (b,  $\text{C}_1$ -H de CD), 4.5 ppm (b, OH propilo de HP- $\beta$ -CD), 3.5 - 3.8 ppm (m,  $\text{C}_{3,5,6}$ -H de CD), 3.5 ppm (m, PEG- $\text{CH}_2$ ), 2.6 - 2.8 ppm (m, 16H,  $\text{CH}_2$  de TAEA), 1.8 ppm (b,  $\text{NH}_2$  de DADO), 1.6 ppm (b,  $(\text{CH}_2)\text{-SO}_3^-$ ), 1.2 ppm (d,  $\text{CH}_3$ -HP- $\beta$ -CD), 1.0 ppm (d,  $\text{CH}_3$  de PPG), 0.8 - 0.6 ppm (m, Chl- $\text{CH}_3$ ).

Síntesis de polirrotaxanos modificados con p-SCN-Bn-DOTA (DOTA-HP-p-CD/SBE-pCD-PR). Los HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR (150 mg) de la etapa anterior se disolvieron en 5 mL de DMSO y se agitó bajo atmósfera de Ar. A esta mezcla se le añadió p-SCN-Bn-DOTA (50 mg, 0.073 mmol) y se dejó en agitación durante 24 h a 20 °C. La reacción se detuvo y los productos se purificaron mediante diálisis para eliminar cualquier reactivo sin reaccionar utilizando membranas de celulosa regenerada con corte de peso molecular de 12,000 - 14,000 y 6,000 - 8,000 en DMSO, seguido de agua, antes de la liofilización para generar muestras en polvo de polirrotaxano modificado con p-SCN-Bn-DOTA (DOTA-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR). RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, sonda criogénica, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 13 ppm (Ben-NH-urea), 9.5 ppm (urea-NH-), 7.5 - 7.0 ppm (d, 4H-Ar-DOTA), 6.92 ppm (S, carbamato de H-NCO), 5.25 ppm (t, 1H, cloro-etileno H), 4.5 - 5.0 ppm (b,  $\text{C}_1$ -H de CD), 4.5 ppm (b, OH propilo de HP- $\beta$ -CD), 3.5 - 3.8 ppm (m,  $\text{C}_{3,5,6}$ -H de las CD), 3.5 ppm (m, PEG- $\text{CH}_2$ ), 2.6 - 2.8 ppm (m, 16H,  $\text{CH}_2$  de TAEA), 1.8 ppm (b,  $\text{NH}_2$  de DADO), 1.6 ppm (b,  $(\text{CH}_2)\text{-SO}_3^-$ ), 1.2 ppm (d,  $\text{CH}_3$ -HP- $\beta$ -CD), 1.0 ppm (d,  $\text{CH}_3$  de PPG), 0.8 - 0.6 ppm (m, Chl- $\text{CH}_3$ ).

Preparación de complejos de polirrotaxanos con Gadolinio ( $\text{Gd}^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR). La complejación con gadolinio se realizó de la siguiente manera: se disolvió  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 equivalentes de un DOTA) en  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) y se mezcló con las muestras de DOTA-HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ -CD-PR previamente disueltas en  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) y el pH de las soluciones se mantuvo alrededor de 5.5 - 6.5 usando soluciones de NaOH y HCl. Las mezclas de reacción se agitaron a 50 °C durante 48 h y los productos se dializaron frente a agua (pH 7) durante 3 días utilizando una membrana con corte de peso molecular de (6.0 - 8.0 kD). Para eliminar el gadolinio no quelado, las muestras se pasaron por una columna Sephadex G 25 y se utilizó naranja de xilenol para detectar trazas de iones  $\text{GD(III)}$  libres. No se debe observar

- ningún cambio de color (de amarillo a rosa o púrpura) con naranja de xileno en las soluciones de muestra de polirrotaxano después de la diálisis. Se utilizó un instrumento UV-visible (espectrofotómetro UV-Visible CARY 50 Bio) para estimar la absorbancia a dos longitudes de onda (435 y 578 nm). Los colores rosa y púrpura de los 50  $\mu\text{L}$  de soluciones acuosas de las muestras y 500  $\mu\text{L}$  de un tampón de acetato del colorante indicaron presencia de Gd libre.
- 5 Las fracciones recolectadas se liofilizaron para obtener los productos finales.
- Resonancia magnética nuclear, RMN. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se recogieron utilizando un Bruker AV-III-500-HD equipado con una criosonda. Los espectros se registraron a 25 °C usando DMSO- $d_6$  como disolvente a menos que se indique lo contrario, utilizando aproximadamente 15 mg de cada polirrotaxano disueltos en 1 mL de disolvente deuterado con DMSO.
- 10 Cromatografía de permeación en gel. Las masas absolutas de los agentes de contraste de polirrotaxano se obtuvieron de un cromatógrafo de la serie 1200 de Agilent Technologies equipado con una columna Shodex SB-803-HQ con DMSO como eluyente a un caudal 0.1 mL/min usando detecciones de dispersión de luz y RI. Se utilizaron como patrones Pullulan (PM 12,000 kD) y tres dextranos (PM 11,600, 48,600 y 667,800 kD). Las muestras se disolvieron en DMSO (2 mg/mL) y se eluyeron durante 150 min.
- 15 Análisis analítico por ultracentrifugación. Se utilizó la técnica AUC (Beckman Coulter optimer-XL1) para determinar el peso molecular de las moléculas de polirrotaxano. Se realizó un método de sedimentación por velocidad con una velocidad de 50000 rpm durante 20 h. Las muestras se disolvieron en DMSO a una concentración de 1 mg/mL y se introdujeron en celdas de 7.15 cm. La celda de referencia se llenó con DMSO puro.
- 20 Espectroscopia de masas de plasma acoplado inductivamente. Se utilizó ICP-MS (ICP-MS de cuadrupolo (Agilent Technologies 7500am, West Lafayette, IN) para analizar el contenido de gadolinio en los polirrotaxanos. Las muestras se digirieron con ácido nítrico al 2 % (grado TraceMetal, Fisher Scientific) y se diluyeron a partir de una solución estándar de 1 mg/mL con  $\text{HNO}_3$  al 2 % con gadolinio Certiprep ME 1 (SPX CertiPrep, Metuchen, NJ) utilizando un método de aditivos estándar y se introdujeron en una cámara de nebulización de temperatura controlada con un nebulizador MicroMist (Glass Expansion 4 Barlow's Landing Rd).
- 25 Medida del diámetro hidrodinámico y del potencial zeta superficial del  $\text{Gd}^{3+}$ -HP- $\beta$ -CD/SBE- $\beta$ CD-PR. Los tamaños, las distribuciones de tamaños y los potenciales zeta de los materiales se evaluaron mediante dispersión de luz dinámica utilizando un analizador de tamaño de partículas (Zetasizer Nano S, Malvern Instruments Ltd.) a 20 °C con un ángulo de dispersión de 90°. Se realizaron al menos 3 mediciones y se promediaron para cada muestra el potencial zeta así como la determinación del tamaño.
- 30 DRMN de  $^1\text{H}$ . Las curvas de velocidad de relajación longitudinal de todas las muestras se adquirieron en soluciones acuosas de aproximadamente 0.5 mM en agua no deuterada utilizando un relaxómetro de ciclo rápido de campo (FFC) Stelar SPINMASTER 1T (Stelar Mede, Pavía, Italia) de acuerdo con el método de FFC convencional que cubre 30 valores de campos magnéticos desde 0.24 mT hasta 0.97 T correspondientes al intervalo de frecuencia de protones Larmor de 0.010 - 40 MHz. Se utilizaron secuencias de adquisición estándar previamente polarizadas (PP/S) y no polarizadas (NP/S) a 30 °C. Las muestras se polarizaron en un campo magnético alto Bpol (25 MHz) hasta que la magnetización nuclear del núcleo de  $^1\text{H}$  alcanzó la saturación. Luego, el campo magnético se cambió al campo de detección Bacq (16 MHz) y la magnetización se midió mediante un pulso de 90° seguido por la adquisición de las curvas de decaimiento dependientes del tiempo.
- 35 Mediciones de relajividad. La tasa de relajación longitudinal y transversal de los agentes de contraste y las células de macrófagos J774 se midió utilizando un escáner Bruker BioSpec 7 T (Bindley Bioscience Center, West Lafayette, IN) 47/30 equipado con una bobina de volumen Bruker Biospin MRI GmbH, 86 mm de DI, funcionando a 300 MHz a 23 °C (RES 300 1 H 112/086 QNS TO AD). Las muestras de polirrotaxano se disolvieron en agua desionizada y se prepararon 5 soluciones (300  $\mu\text{L}$ ) con concentraciones de 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 0.80 y 1.0 mM de contenido de Gd. En el caso del experimento de absorción celular, las células lisadas de macrófagos se transfirieron a un recipiente eppendorf de 300  $\mu\text{L}$ . Los valores de  $T_1$  y  $T_2$  se midieron utilizando la secuencia de recuperación de inversión y la secuencia de múltiples cortes y múltiples ecos (MSME) respectivamente. Para cada imagen obtenida de las soluciones de las muestras, se utilizaron ecuaciones no lineales de regresión de magnetización,  $M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$  para  $T_1$  y  $M_{xy} = (e^{-t/T_2})$  para  $T_2$  ajustando las curvas por mínimos cuadrados. Los parámetros utilizados son los siguientes.  $r_1$ : tiempos de repetición,  $T_E = 50, 72, 100, 350, 750, 1250, 2500, 3500$  y 5000 ms, tiempo de eco,  $T_E = 22.22$  ms, FOV = 10 x 10 mm<sup>2</sup>, matriz = 128 x 128, espesor del corte = 1.0 mm, número de adquisición = 1.  $r_2$ :  $T_R = 2000$  ms,  $T_E = 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105$  ms, FOV = 20 x 20 mm<sup>2</sup>, matriz = 128 x 128, espesor de corte = 1 mm, número de adquisición = 1. Los valores de  $r_1$  y  $r_2$  se determinaron como las pendientes de las líneas para el gráfico de  $1/T_1$  y  $1/T_2$  contra las concentraciones de Gd, respectivamente, usando el mismo ROI.
- 40 Formación de imágenes de IRM *in vitro*. Las imágenes de RM de las soluciones de las muestras de polirrotaxano analizadas previamente durante el estudio de relajación y las células de macrófagos se adquirieron con el mismo instrumento escáner Bruker BioSpec 7 T (Bindley Bioscience Center, West Lafayette, IN) 47/30 equipado con una bobina de volumen Bruker BioSpin MRI GmbH, 86 mm de DI, operando a 300 MHz. Se recopilaron imágenes de eco de espín ponderadas para  $T_1$  (T1w) bajo los siguientes parámetros: TR/TE = 100/4 ms, FOV = 58 x 58 mm<sup>2</sup>, matriz =
- 45
- 50
- 55

256 × 256, espesor de corte = 2 mm, FA = 90°, número de adquisición = 1. Las imágenes obtenidas se trataron con ImageJ.

Formación de imágenes de IRM *in vivo*. Animales. Los estudios *in vivo* de los agentes de contraste de polirrotaxanos se realizaron con ratones BALBc hembra de 7 a 9 semanas de edad (20 g cada uno) siguiendo el protocolo (1112000342) aprobado por el Comité de uso y cuidado de animales de Purdue (PACUC). Los ratones (n = 3) se anestesiaron con isoflurano (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que se mezcló con 100 % de oxígeno mediante un instrumento SomnoSuite. Las condiciones de inducción se fijaron en 250 mL/min de oxígeno con isoflurano al 2.5 % mientras que los ratones se inmovilizaron en el escáner con 250 mL/min de oxígeno, isoflurano al 1.8%. La temperatura de los ratones se mantuvo mediante un sistema de lecho de baño de calentamiento de agua mientras que la tasa de respiración se controló mediante un sistema SA equipado con una almohadilla de aire insertada debajo de los ratones. Métodos. Se llevó a cabo una secuencia de eco de gradiente tridimensional ponderada de T<sub>1</sub> para escanear los ratones en un escáner Bruker BioSpec 7 T (Bindley Bioscience Center, West Lafayette, IN) 47/30 equipado con una bobina de volumen Bruker Biospin IRM GmbH, 86 mm de DI, que funciona a 300 MHz, e interconectado con un software ParaVision para recopilar imágenes coronales. Luego, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola con 200 µl de solución salina de la muestra a razón de 0.05 mmol/kg de peso corporal antes de adquirir imágenes posteriores a la inyección en 5 puntos de tiempo diferentes con la misma secuencia tridimensional ponderada de T<sub>1</sub> de alta resolución bajo los siguientes parámetros: TR/TE = 15/3.0 ms, FOV = 80 × 30 × 30 mm<sup>3</sup>, matriz = 384 × 192 × 32, espesor de corte = 30 mm sin espacio entre cortes, FA = 20°, número de adquisición = 3, resolución = 0.20 × 0.15 × 0.90 mm<sup>3</sup>. De manera similar, se adquirieron imágenes transversales ponderadas de T<sub>1</sub> bidimensionales en diferentes puntos de tiempo para revelar diferentes órganos vasculares bajo los siguientes parámetros: TR/TE = 500/1.5 ms, FOV = 50 × 50 mm<sup>2</sup>, matriz = 256 × 256, espesor de corte = 2 mm, FA = 30°, número de adquisición = 2, resolución = 0.20 × 0.20 mm<sup>2</sup>, espacio entre cortes = 1.0 mm. Análisis de imágenes. Para cuantificar los cambios en la intensidad de la señal de los tejidos, se dibujaron regiones de interés (ROI) en imágenes de diferentes órganos obtenidas de los escaneos ponderados de T<sub>1</sub> bidimensionales y se usó el software ParaVision para evaluar las intensidades medias. La relación contraste-ruido (CNR) se calculó para los tejidos utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{CNR} = \frac{\text{MSI (tejido)} - \text{MSI (músculo)}}{\text{DE (fondo)}}$$

Donde MSI significa intensidad de señal media y DE denota desviación estándar.

Viabilidad celular. Se realizaron estudios de viabilidad celular para examinar el potencial de toxicidad con PR en células J774 utilizando el ensayo de MTS. La viabilidad celular se midió en función de la cantidad de PR. Las células se cultivaron en medio DMEM completo suplementado con FBS al 10 % a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad relativa. Las células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) a densidades de 10,000 células/pocillo. Después de 24 h, el medio de cultivo se reemplazó con medio de cultivo sin suero que contenía concentraciones crecientes de PR y las células se incubaron durante 24 h antes de agregar el reactivo de MTS (15 µL) y se incubaron durante 2 h. A continuación, se midió la absorbancia utilizando un lector de microplacas (lector de placas SpectraMax Plus 384) a una longitud de onda de 492 nm. La viabilidad celular (%) en relación con las células de control cultivadas en medio sin PR se calculó como  $[A]_{\text{prueba}}/[A]_{\text{control}} \times 100 \%$ , donde  $[A]_{\text{prueba}}$  es la absorbancia de los pocillos con PR y  $[A]_{\text{control}}$  es la absorbancia de los pocillos de control (células no tratadas). Todos los valores de citotoxicidad se midieron por triplicado y se promediaron.

Estudios de absorción celular. Se utilizó un barrido de IRM para determinar la internalización celular de los compuestos. Este método es perfecto para estudiar la absorción celular de muestras que no se consideran catiónicas o no forman complejos con nucleótidos. Para ello, se utilizó la línea celular de macrófagos J774 para estudiar la absorción de los complejos sembrando 100,000 células por pocillo en placas de 24 pocillos e incubando durante 24 h antes del experimento. Los compuestos de PR se incubaron con las células a una concentración final de 0.1 mM durante 12 horas a 37 °C en medio sin suero. Después de 12 h, se retiró el medio gastado y las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron y lisaron. A continuación, estas células se recogieron y analizaron utilizando un escáner de eco de espín inverso en un escáner para animales pequeños Bruker 7 T Biospect (Bindley Bioscience Center, West Lafayette, IN). Los valores de las relajaciones T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> se recogieron a partir de imágenes de muestras registradas de las células contenidas en recipientes de plástico de 300 µL utilizando condiciones de escaneo similares a las empleadas para la formación de imágenes *in vitro* de soluciones de polirrotaxano.

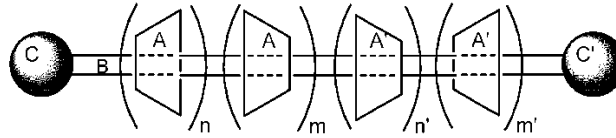
Proteómica de corona dura de proteína. Se adquirió suero humano normal a través de Complement Technology, Inc. (Tyler, TX) y se descongeló inmediatamente antes de su uso. Los PR (100 µg) se recogieron en PBS y se sonicaron durante 10 minutos antes de la incubación con suero humano sin diluir (1:1 v/v) durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 4000 × g y los sedimentos de PR se lavaron cuatro veces con 150 µL de PBS frío. Se realizaron tres incubaciones separadas para cada miembro de la familia de PR.

Los péptidos tripticos se separaron en un sistema nanoLC (LC Serie 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Los péptidos se cargaron en la columna de enriquecimiento Agilent 300SB-C18 (5 × 0.3 mm, 5 µm) para la concentración y la columna de enriquecimiento se cambió a la ruta de nanoflujo después de 5 min. Los péptidos se separaron con la columna analítica C18 de fase inversa ZORBAX 300SB-C18 (0.75 µm × 150 mm, 3.5 µm) de Agilent.

- La columna se conectó a la punta de emisión de New Objective y se acopló a la fuente de ionización por nanoelectroaspersión (ESI) del espectrómetro de masas de trampa iónica híbrida de alta resolución LTQ-Orbitrap XL. (Thermo Scientific). Los péptidos se eluyeron de la columna utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo/ácido fórmico al 0.1 % (fase móvil B). Durante los primeros 5 min, la columna se equilibró con 95 % de H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 0,1 % (fase móvil A), seguido del gradiente lineal de 5 % de B a 40 % de B en 65 min. a razón de 0.3 µL/min, luego de 40 % B a 100 % B en 10 minutos adicionales. La columna se lavó con 100 % de ACN/FA al 0.1 % y se equilibró con 95 % de H<sub>2</sub>O/FA al 0.1 % antes de inyectar la siguiente muestra (tiempo total del método = 95 min). Se realizó una inyección de blanco entre las muestras para evitar el arrastre. El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se operó en el modo de adquisición positiva dependiente de los datos donde cada escaneo de MS completo (potencia de resolución 30,000) fue seguido por ocho escaneos de MS/MS donde los ocho iones moleculares más abundantes fueron seleccionados y fragmentados por disociación inducida por colisión (CID) usando una energía de colisión normalizada del 35 %. La búsqueda en la base de datos se realizó utilizando MaxQuant para LFQ (Label Free Quantitation - LFQ). Para la búsqueda se utilizó la base de datos anotada Human (SwissProt). El conteo espectral inicial se realizó utilizando los resultados de búsqueda de la base de datos Mascot.
- Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que en el uso de dichos términos y expresiones se excluyan los equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, sino se reconoce que varias modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos divulgados en el presente documento, y que tales modificaciones y variaciones se considera que están dentro del alcance de esta invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

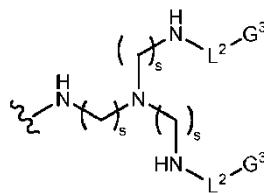
1. Un polirrotaxano que comprende la fórmula general:



5 o sales del mismo, donde:

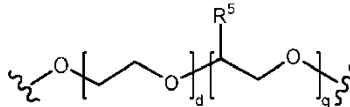
cada m y n es, independientemente, un número entero de 0 a 30, con la condición de que  $m + m' + n + n'$  sea de aproximadamente 4 a aproximadamente 30;

C y C' son iguales o diferentes y representan grupos de protección de los extremos de la fórmula:



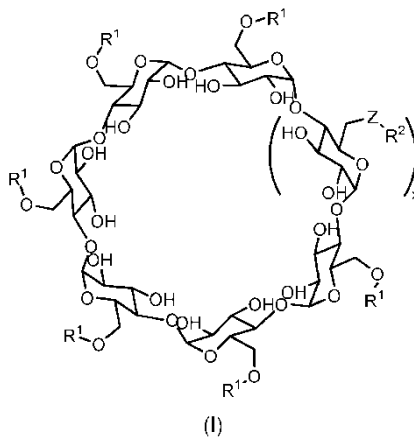
10 donde cada  $L^2$  es independientemente un enlace o acilo ( $C_1-C_6$ ); cada  $G^3$  es un grupo hidrocarbilo ( $C_6-C_{50}$ ) sustituido o no sustituido, interrumpido por 0 a 5 grupos elegidos entre -O-, -NH- y -S-, donde el grupo hidrocarbilo ( $C_6-C_{50}$ ) es estéricamente voluminoso; y cada s es independientemente un número entero de 1 a 6;

B representa:



15 a la que los grupos de protección de los extremos están unidos covalentemente a B a través de un grupo hidrocarbilo ( $C_1-C_6$ ) o B representa carbohidratos, polipéptidos, policarbonato, poliamida o polímeros de poliéster; donde  $R^5$  es metilo; d es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 800; y q es un número entero de aproximadamente 6 a aproximadamente 800; y

A y A' representan cada uno la molécula huésped macrocíclica de fórmula general (I):

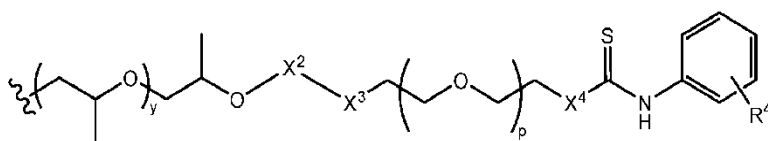


20 donde:

A y A' son diferentes;

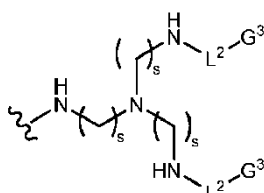
x es un número entero de 0 a 8; Z es O o NH;

25 cada  $R^1$  y  $R^2$  es, independientemente, hidrógeno, grupo hidrocarbilo ( $C_1-C_6$ ) sustituido o no sustituido o un grupo de fórmula (IIIc):



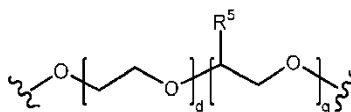
donde y es un número entero de 0 a 10; p es un número entero de 1 a 10; X<sup>2</sup> representa acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), un polipéptido de cadena corta, un carbohidrato de cadena corta, un poliéster o una poliamida; X<sup>3</sup> y X<sup>4</sup> son cada uno, independientemente, -O-, -NH-, un grupo carbamilo, un grupo heterocíclico, un disulfuro (-S-S-), amida o éster; y R<sup>4</sup> es un grupo reportero, con la condición de que al menos un grupo R<sup>2</sup> sea un grupo de fórmula (IIIc).

- 5 2. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde C y C' son iguales o diferentes y representan grupos de protección de los extremos de la fórmula:



donde cada L<sup>2</sup> es independientemente un acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).

- 10 3. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde cada G<sup>3</sup> es, independientemente, un grupo colesterilo, un grupo 2,4,6-trinitrofenilo, un radical ciclodextrina o un radical fluoresceína.
4. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde B representa:



a la que los grupos protectores de los extremos están unidos covalentemente a B a través de un grupo carbamilo, un grupo heterocíclico, un disulfuro (-S-S-), amida o éster.

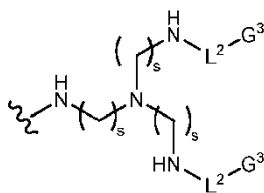
- 15 5. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde R<sup>1</sup> es un grupo hidrocarbilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido y R<sup>2</sup> es un grupo de fórmula (IIIc).
6. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde X<sup>2</sup> representa acilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).
7. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde m + m' + n + n' es de aproximadamente 5 a aproximadamente 20.
- 20 8. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde el grupo reportero es una fracción quelante.

9. El polirrotaxano de la reivindicación 1, donde el polirrotaxano es HPβCD/SBEβCD-F127 (donde F127 representa B donde d = 200 y q = 65); HPβCD/SBEβCD-F68 (donde F68 representa B donde d = 153 y q = 29); HPβCD/SBEβCD-L35 (donde L35 representa B donde d = 22 y q = 16); HPβCD/SBEβCD-L64 (donde L64 representa B donde d = 26 y q = 30); o HPβCD/SBEβCD-L81 (donde L81 representa B donde d = 6.25 y q = 43), y HPβCD es hidroxipropil-β-ciclodextrina y SBEβCD es 4-sulfobutiléter-β-ciclodextrina, donde:

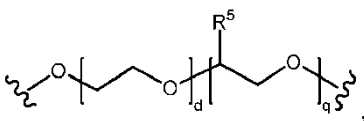
el polirrotaxano tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 20,000 g/mol a aproximadamente 50,000 g/mol según se determina por análisis de GPC;

HPβCD es un huésped macrocíclico de fórmula (I) donde cada R<sup>1</sup> es H, Z es O y R<sup>2</sup> es un grupo de fórmula (IIIc), donde y es 0; X<sup>2</sup> es C(O)O; X<sup>3</sup> y X<sup>4</sup> son cada uno -NH-; p es 2; y

- 30 R<sup>4</sup> es DOTA; y los grupos C y C' de la fórmula:



donde cada s es 2; cada L<sup>2</sup> C(O); y cada G<sup>3</sup> representa un grupo colesterilo, está unido covalentemente al grupo B de la fórmula:



donde las variables d y q se definen como anteriormente, para cada polirrotaxano, a través de un grupo C(O).

10. Una composición farmacéutica que comprende el polirrotaxano de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 11. Un polirrotaxano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar en el tratamiento de Niemann-Pick tipo C (NPC).
12. Un polirrotaxano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso como agente para la obtención de imágenes en un sujeto que lo necesite.

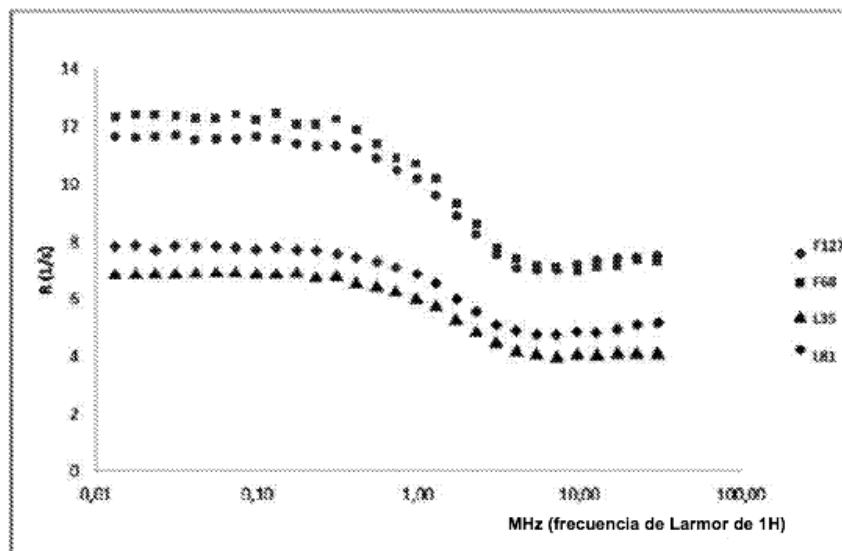


FIG. 1

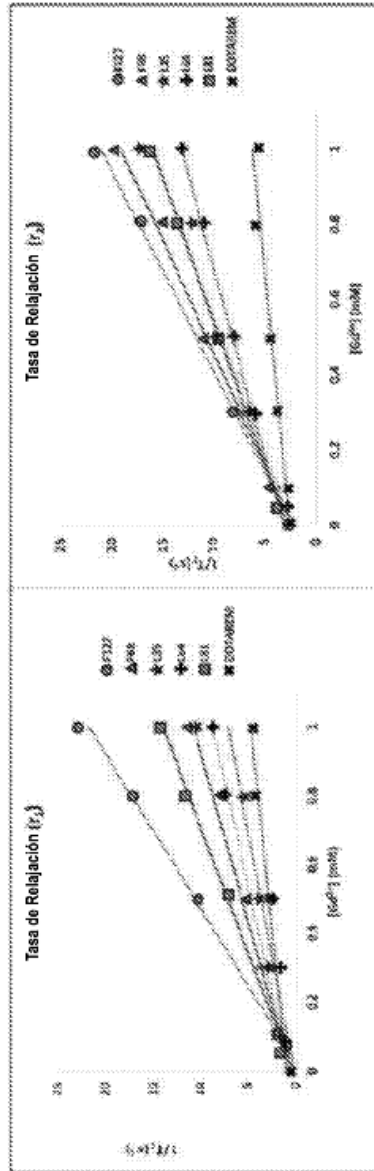


FIG. 2

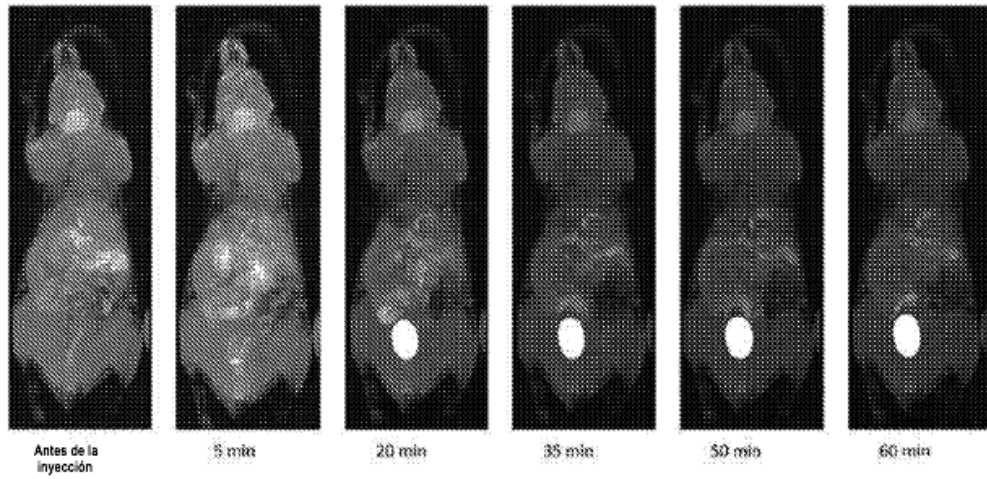


FIG. 3A

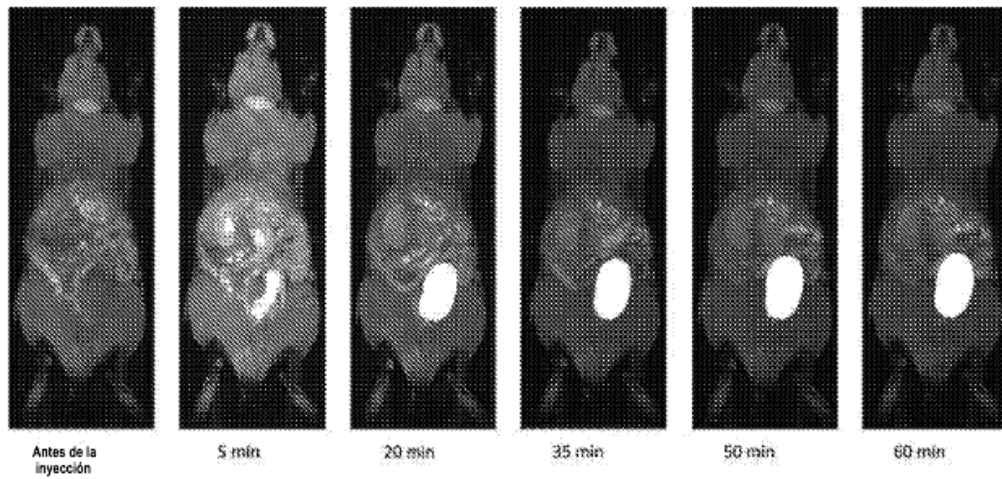


FIG. 3B

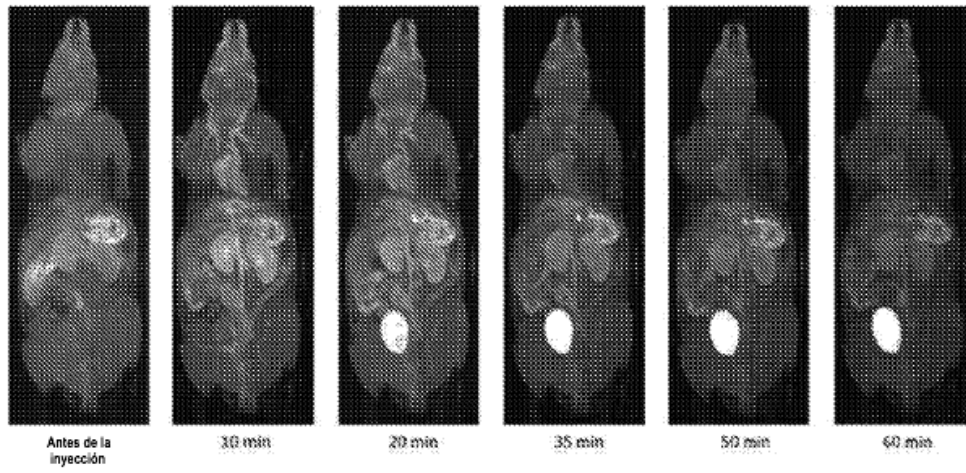


FIG. 3C

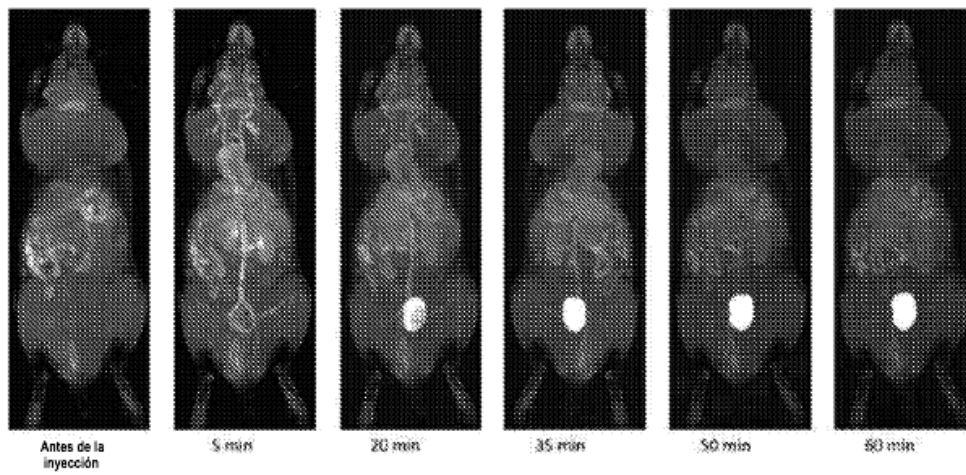


FIG. 3D

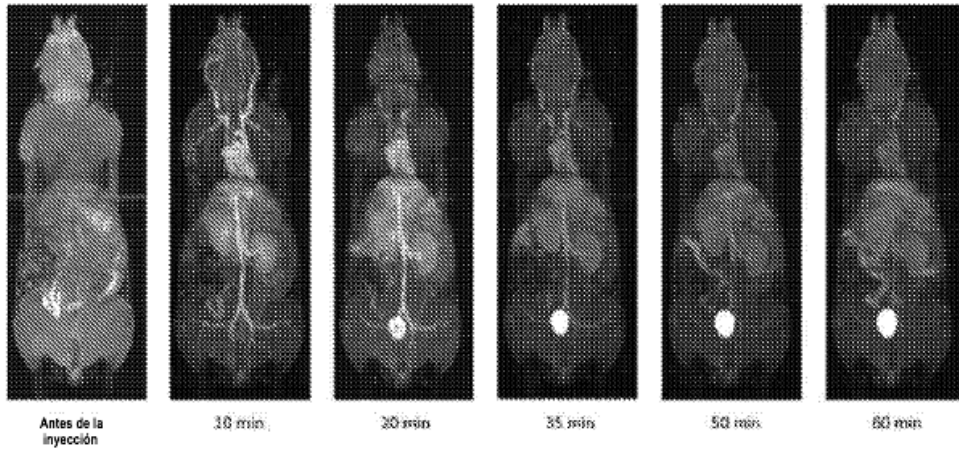


FIG. 3E

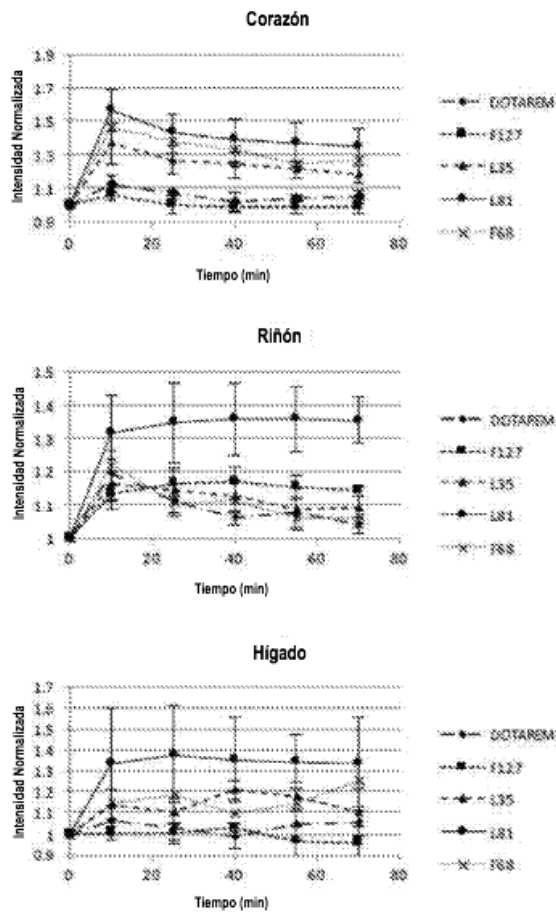


FIG. 4

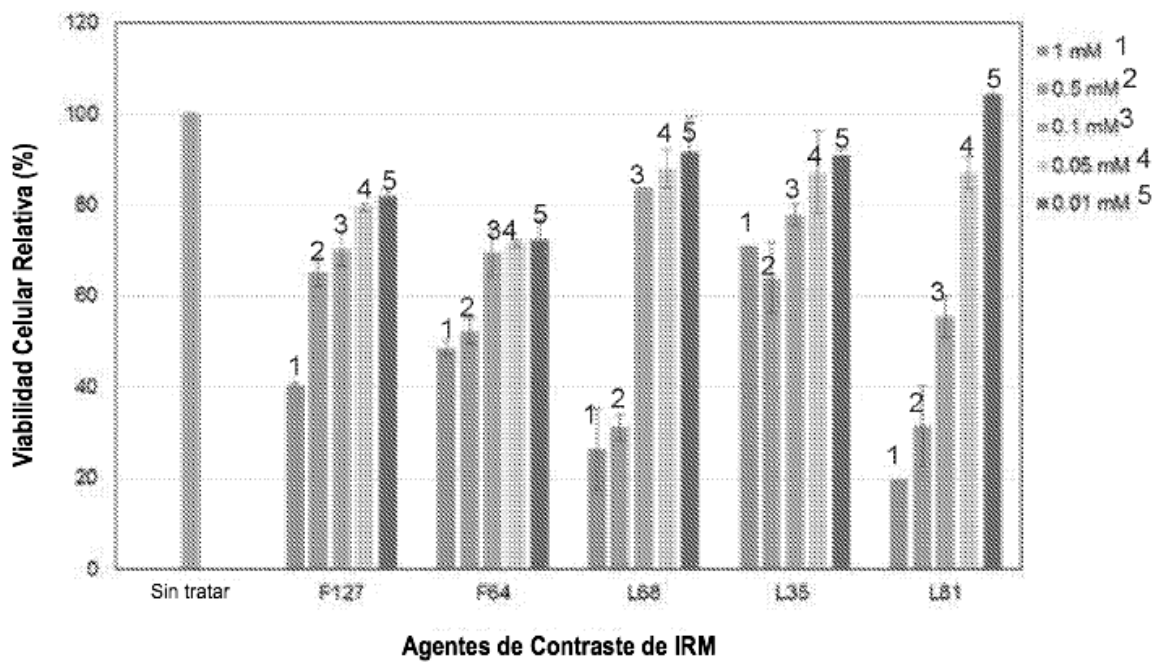


FIG. 5

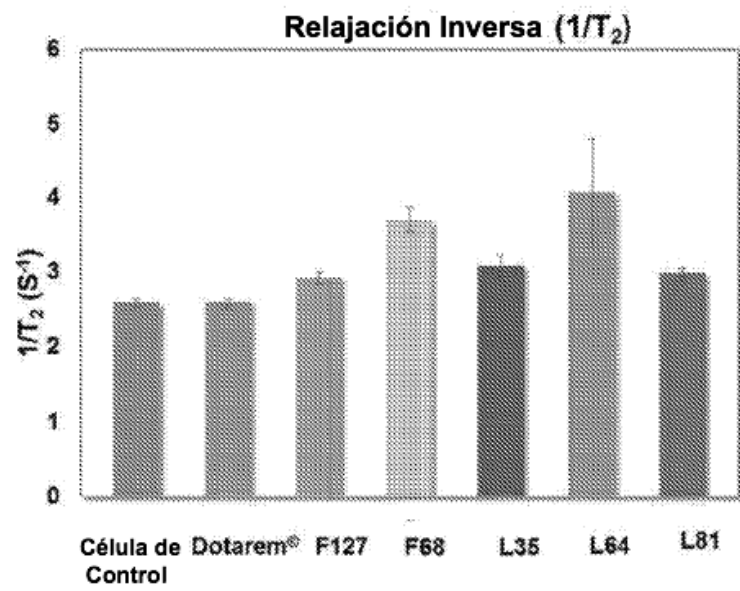
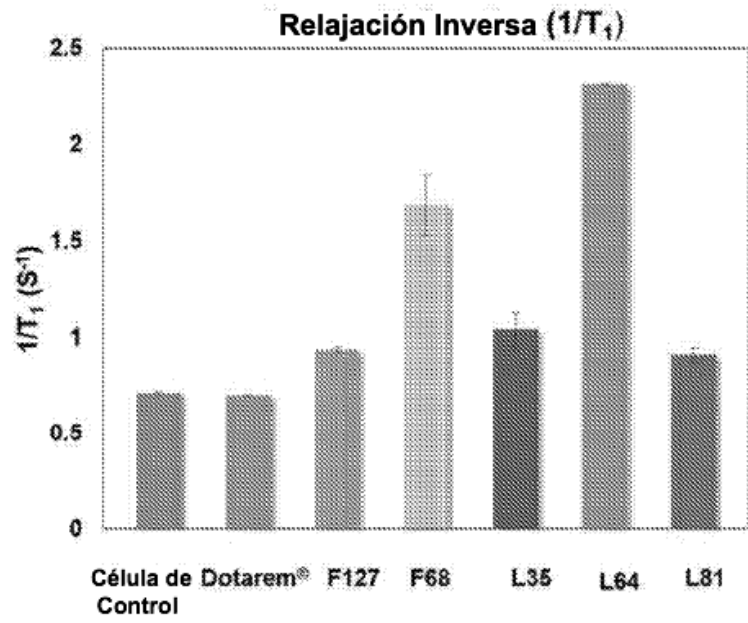


FIG. 6

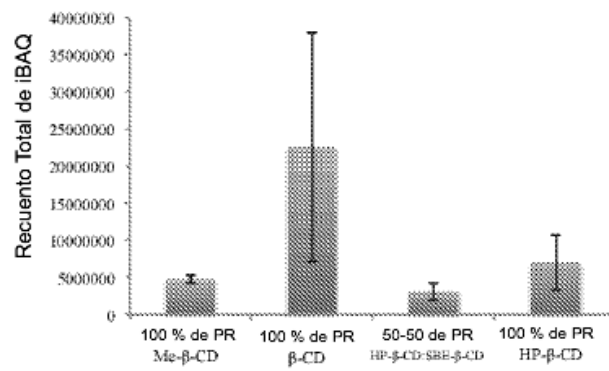


FIG. 7

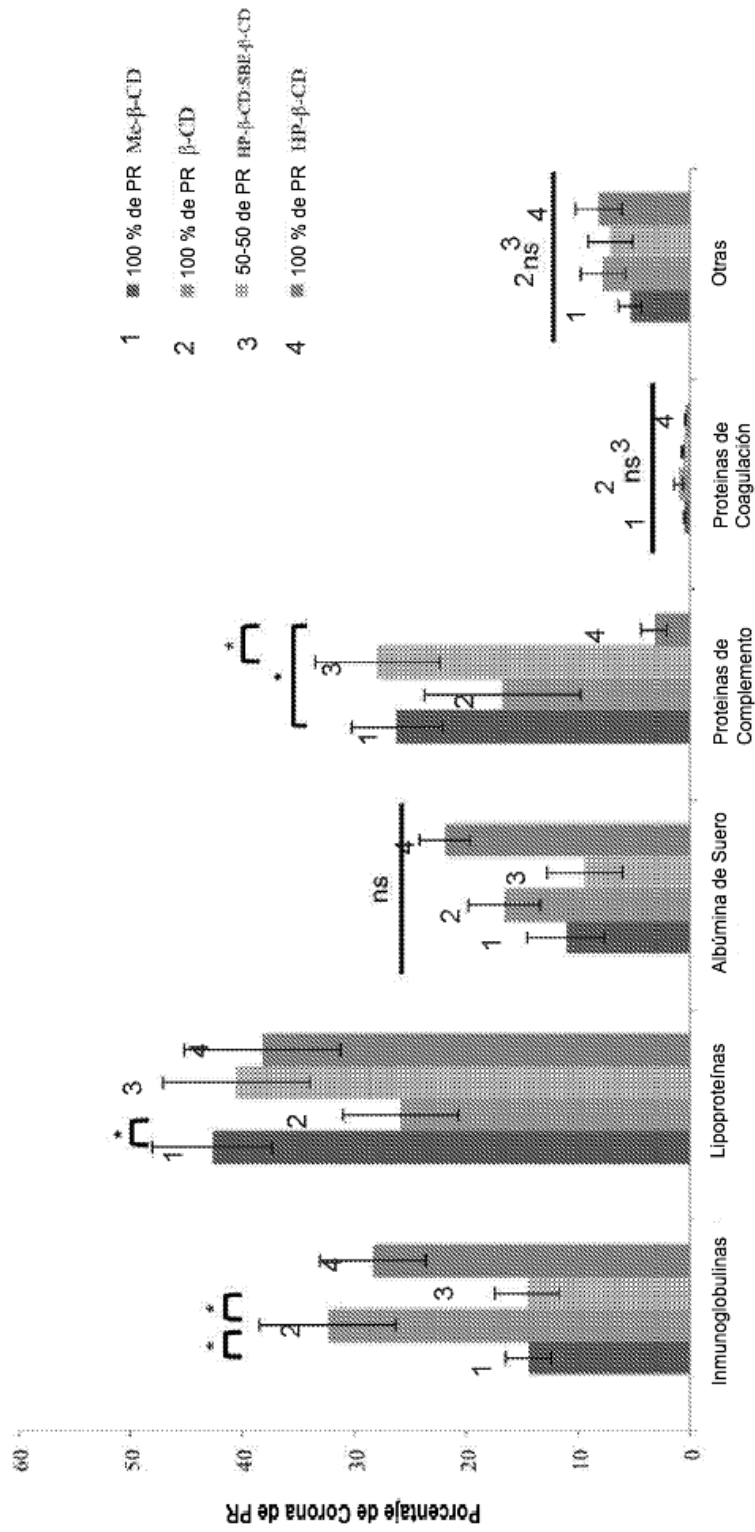


FIG. 8