

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 150**

51 Int. Cl.:

**C07D 495/10** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2007.01)  
**C08G 65/48** (2006.01)  
**C08G 64/30** (2006.01)  
**C08G 63/64** (2006.01)  
**C08J 3/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2015 PCT/CN2015/079998**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15180655**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2015 E 15798938 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 3150611**

54 Título: **Monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, y método de preparación del mismo**

30 Prioridad:

**28.05.2014 CN 201410231697**

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

**15.11.2017**

73 Titular/es:

**BRIGHT GENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)  
Building C25 No.218, Xinghu Street Bio-Bay  
Suzhou Industrial Park  
Suzhou, Jiangsu 215123, CN**

72 Inventor/es:

**MENG, FENGHUA;  
ZOU, YAN y  
ZHONG, ZHIYUAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 642 150 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

Monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, y método de preparación del mismo

## Campo técnico

- 5 La presente descripción hace referencia a un monómero de carbonato cíclico, y a la preparación y aplicación de un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres.

## Antecedentes de la invención

- Los monómeros de carbonato cíclico tienen propiedades únicas. Por ejemplo, pueden sintetizarse de forma sencilla en forma de productos con un elevado rendimiento y una elevada pureza; y pueden ser iniciados mediante pequeñas moléculas o macromoléculas para obtener un policarbonato bio-degradable. Los polímeros de los monómeros de carbonato cíclico tienen un comportamiento extraordinario. Por ejemplo, generalmente tienen biocompatibilidad favorable, y pueden degradarse *in vivo*; los productos de degradación pueden ser absorbidos en el cuerpo humano, o ser excretados a través de las vías fisiológicas habituales. Al igual que ocurre con los poliésteres alifáticos, son ampliamente utilizados en diversas áreas de la biomedicina, por ejemplo en suturas quirúrgicas, dispositivos de fijación ortopédica, materiales de andamiaje (scaffold) para la ingeniería biológica de tejidos, soportes para liberación controlada de fármacos, etc. Entre estos, los polímeros sintéticos bio-degradables han recibido mucha atención, ya que tienen una baja inmunogenicidad, y sus comportamientos, como el comportamiento ante la degradación y el rendimiento mecánico, pueden controlarse de forma conveniente. Los polímeros bio-degradables utilizados habitualmente se obtienen a través de polimerización por apertura de anillo de monómeros de carbonato como el carbonato de trimetileno cíclico (TMC, por sus siglas en inglés), o monómeros de éster cíclico como glicólido (GA), láctido (LA), caprolactona (CL), etc. Los polímeros bio-degradables han sido aprobados por la agencia americana de regulación de fármacos y alimentos o FDA (del inglés "Food and Drug Administration").

## Problemas técnicos

- 25 Sin embargo, los monómeros de carbonato cíclico o éster cíclico en la técnica anterior, por ejemplo TMC, GA, LA, CL y similares, tienen una estructura simple y carecen de grupos funcionales que puedan ser modificados. Por lo tanto, la post-modificación de los polímeros preparados a partir de los mismos es habitualmente difícil, por tanto los requerimientos médicos son difícilmente satisfechos. Por ejemplo, los soportes de fármacos o los recubrimientos modificados de la superficie basados en estos polímeros de estos monómeros de carbonato convencionales, tienen aspectos débiles serios relacionados con una pobre estabilidad. Mejorar su estabilidad *in vivo* se ha convertido en un problema urgente a resolver.

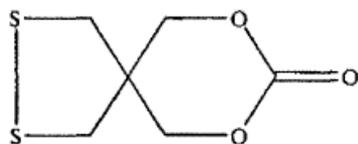
Además, en la técnica anterior, durante el proceso de preparación y/o polimerización por apertura de anillo de monómeros de carbonato cíclico, debido a que hay grupos activos en la estructura, en la mayoría de los casos se requieren las etapas de protección y desprotección, lo que hace complicado el proceso de preparación.

## Compendio de la descripción

- 35 Solución al problema

La presente descripción pretende proporcionar un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres.

Para este propósito, la realización de la presente descripción incluye: un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, representado por la siguiente fórmula:



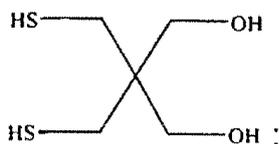
- El método para la preparación del mencionado monómero de carbonato cíclico incluye las siguientes etapas: en un disolvente polar, hacer reaccionar dibromoneopentil-glicol con hidrosulfuro sódico monohidrato para obtener el Compuesto A; a continuación, oxidar el Compuesto A en aire para obtener el Compuesto B; finalmente, en atmósfera de nitrógeno y en disolventes a base de éter cíclico, hacer reaccionar el Compuesto B con cloroformiato de etilo para obtener el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres.

En la realización mencionada, la relación molar de dibromoneopentil-glicol con respecto a hidrosulfuro sódico monohidrato es de (2,5~10): 1; y la relación molar del Compuesto B con respecto al cloroformiato de etilo es de 1:(2~4).

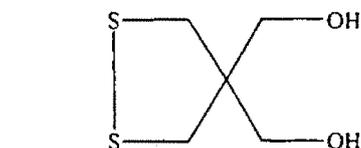
En una realización preferida, el método para la preparación del monómero de carbonato cíclico mencionado que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres comprende:

- 5 (1) Disolver hidrosulfuro sódico monohidrato en un disolvente polar; lentamente añadir dibromoneopentil-glicol gota a gota con un embudo de adición compensador de presión; mantener la temperatura de reacción a 50 °C durante 48 horas para obtener el Compuesto A:

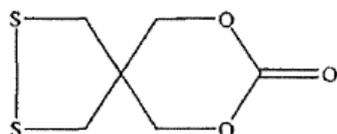
dicho Compuesto A está representado por la siguiente fórmula:



- (2) oxidar el Compuesto A en aire para obtener el Compuesto B, dicho compuesto B está representado por la siguiente fórmula:



- (3) En atmósfera de nitrógeno, disolver el Compuesto B y el cloroforniato de etilo en un disolvente a base de éter cíclico, a continuación añadir lentamente trietilamina gota a gota con un embudo de adición compensador de presión; controlar la temperatura de reacción con un baño de agua helada durante 4 horas para obtener un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, donde dicho monómero de carbonato cíclico está representado por la siguiente fórmula:
- 15



En una realización preferida, dicho disolvente polar es N,N-dimetilformida (DMF); dicho disolvente a base de éter es tetrahidrofurano.

- 20 En una realización preferida, el Compuesto A se disuelve en primer lugar en un disolvente a base de éter, a continuación se oxida en aire para obtener el Compuesto B; de ese modo se incrementa la tasa de oxidación del Compuesto A. El disolvente a base de éter puede ser tetrahidrofurano, 1,4-dioxano. Para simplificar el proceso de reacción y simplificar la condición de reacción, el disolvente para disolver el Compuesto A en la etapa (2) es compatible con el disolvente para disolver el Compuesto B en la etapa (3).

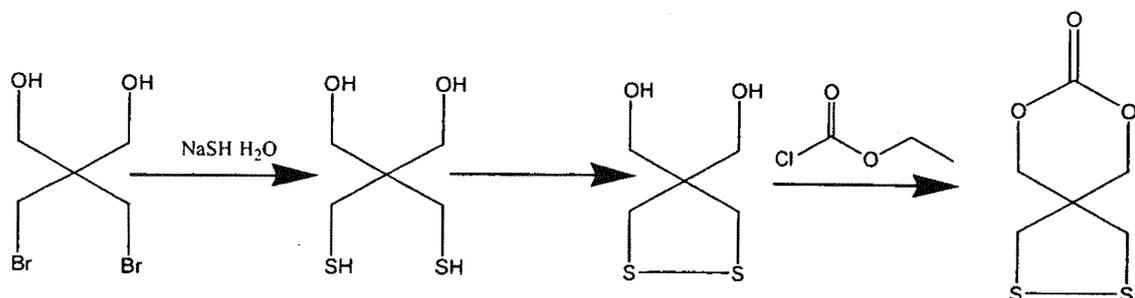
- 25 En una realización preferida, se realiza un tratamiento de purificación después de completar la etapa (1) y la etapa (3); en detalle:

- (1) Purificación del Compuesto A: cuando la reacción se completa, la mezcla resultante se somete a destilación bajo presión reducida para separar el disolvente, y el residuo obtenido se diluye con agua destilada, a continuación se extrae con acetato de etilo; finalmente, la fase orgánica se evapora con un evaporador rotatorio, y se obtiene el Compuesto A de color amarillo y viscoso;

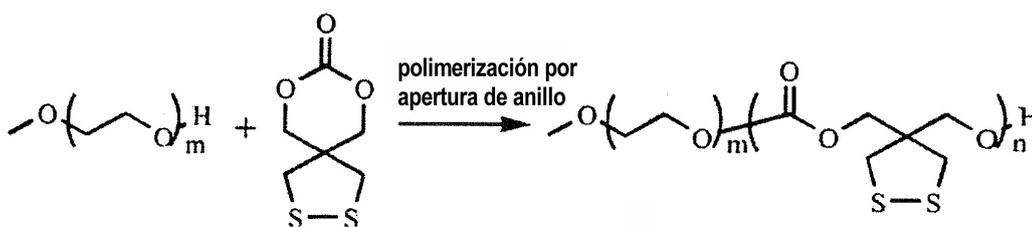
- 30 (2) Purificación del monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres: se realiza la filtración después de que la reacción se completa; el filtrado se concentra con un evaporador rotatorio, a continuación es recristalizado con éter etílico para obtener un cristal amarillo, que es el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres.

- 35 La mencionada destilación bajo presión reducida, extracción, evaporación con evaporador rotatorio, concentración con evaporador rotatorio y recristalización, pertenece todo a la técnica anterior. Los expertos en la técnica pueden seleccionar el método según su deseo. En la presente descripción, se prefiere que cuando se lleve a cabo la purificación del Compuesto A, se realice cuatro veces la extracción con acetato de etilo; cuando se lleva a cabo la purificación del carbonato cíclico, la recristalización con éter etílico se realiza 3~5 veces.

El proceso mencionado anteriormente para la preparación del monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, se ilustra de la siguiente forma:



5 El mencionado monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres puede someterse a polimerización por apertura de anillo para obtener un policarbonato donde la cadena lateral contiene un anillo de cinco miembros con dos azufres. Debido a que el grupo anular de cinco miembros con dos azufres no afecta a la polimerización por apertura de anillo, no se requieren los procesos de protección y desprotección. Por ejemplo, en diclorometano, utilizando polietilenglicol como iniciador y utilizando bis[bis(trimetilsilil)amida] de zinc como catalizador, el monómero de carbonato cíclico mencionado forma un polímero de bloque mediante polimerización por apertura de anillo, donde la fórmula de reacción se muestra a continuación:



15 el monómero de carbonato cíclico anterior puede además tener una copolimerización por apertura de anillo con otros monómeros de carbonato cíclico y éster cíclico, para preparar copolímeros aleatorios y de bloques; dichos otros carbonatos cíclicos incluyen carbonato de trimetileno cíclico (TMC), dichos otros monómeros de éster cíclico incluyen caprolactona ( $\epsilon$ -CL), láctido (LA) o glicólido (GA).

20 El carbonato funcional con cadena lateral que contiene un anillo de cinco miembros con dos azufres, puede formar una reticulación química estable bajo catálisis por una cantidad catalítica de un reductor como ditioneitol o glutatión, pero puede des-reticularse rápidamente en el entorno reductor intracelular. Por lo tanto, el carbonato funcional con una cadena lateral que contiene un anillo de cinco miembros con dos azufres tiene un valor práctico excelente, por ejemplo, puede ser utilizado para la preparación de soportes de fármacos que son estables en la circulación, que pueden liberar rápidamente los fármacos en las células diana.

#### Efectos ventajosos de la tecnología

Debido a la práctica de la mencionada realización, la presente descripción tiene las siguientes ventajas sobre la técnica anterior:

- 25 1. La presente descripción describe por primera vez un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, que puede ser preparado convenientemente con una alta eficacia, con tan solo dos recipientes (tres etapas), sin los procesos de protección y desprotección de la técnica anterior.
- 30 2. La presente descripción describe un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, con el que puede obtenerse un policarbonato funcional con una cadena lateral que contiene un anillo de cinco miembros con dos azufres mediante polimerización por apertura de anillo, donde los procesos de protección y desprotección de la técnica anterior no se requieren, ya que el grupo anular de cinco miembros con dos azufres no afecta la polimerización por apertura de anillo del monómero de carbonato cíclico.
- 35 3. La preparación del monómero de carbonato cíclico descrito en la presente descripción es sencilla. A través de la conveniente polimerización por apertura de anillo de los monómeros de carbonato cíclico, se obtiene un polímero de carbonato caracterizado por su sensibilidad a la reticulación reducida y reversible; el polímero podría además ser autoensamblante, utilizándose de este modo en sistemas de liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos y chips biológicos, mostrando un valor ventajoso para su aplicación en el área de los biomateriales.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un espectro de una RMN del monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres en el Ejemplo 1.

5 La Figura 2 es un espectro de masa del monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres en el Ejemplo 1.

La Figura 3 es un espectro de absorción ultravioleta del monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres en el Ejemplo 1.

La Figura 4 es un espectro de RMN del copolímero de bloques PEG5k-*b*-PCDC2.8k en el Ejemplo 3.

La Figura 5 es un espectro de RMN del copolímero de bloques PEG5k-P(CDC2.5k-*co*-CL3.9k) en el Ejemplo 4.

10 La Figura 6 es un gráfico que muestra la toxicidad de las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k en células Raw264.7 y MCF-7 en el Ejemplo 6.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el resultado de la liberación *in vitro* de las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k que porta doxorubicina, en el Ejemplo 7.

15 La Figura 8 es un gráfico que muestra la toxicidad de las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k que porta la doxorubicina en células Raw264.7, en el Ejemplo 7.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la circulación en sangre *in vivo* de las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargado con doxorubicina en ratones, en el Ejemplo 8.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la distribución biológica de las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargado con doxorubicina para los ratones con presencia de melanoma en el Ejemplo 9.

20 La Figura 11 es un gráfico curvilíneo que muestra que las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargado con doxorubicina inhiben el crecimiento tumoral en ratones con presencia de melanoma, en el Ejemplo 10.

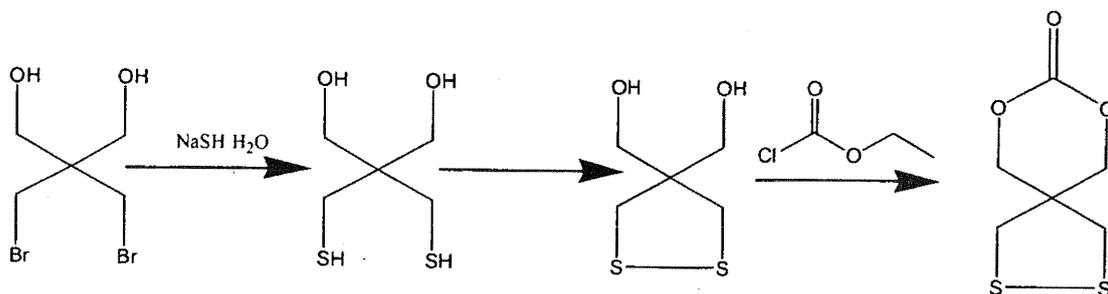
La Figura 12 es un gráfico curvilíneo que muestra el cambio de peso corporal de los ratones en el Ejemplo 10.

La Figura 13 es un gráfico curvilíneo que muestra la supervivencia de los ratones en el Ejemplo 10.

## 25 Descripción de las realizaciones

La presente descripción se describirá en más detalle en referencia a los ejemplos y dibujos.

Ejemplo 1: Síntesis de un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres (CDC).



30 1. Se disolvió hidrosulfuro sódico monohidrato (28,25g, 381,7 mmol) en 400 ml de N,N-dimetilformida (DMF), se calentó a 50 °C hasta que se disolvió completamente, y se añadió al mismo dibromoneopentil-glicol (20 g, 76,4 mmol) gota a gota. La reacción se dejó continuar durante 48 h. La mezcla de reacción se destiló bajo presión reducida para separar el disolvente DMF, y a continuación se diluyó con 200 ml de agua destilada, y se extrajo cuatro veces con 250 ml de acetato de etilo. Finalmente, la fase orgánica se evaporó con un evaporador rotatorio, y se obtuvo un Compuesto A de color amarillo y viscoso con un rendimiento del 70%.

35 2. El Compuesto A disuelto en 400 ml de tetrahidrofurano (THF) se colocó al aire durante 24h. Los grupos sulfhidrido intramoleculares se oxidaron en enlaces de azufre-azufre, y de este modo se obtuvo el Compuesto B, con un rendimiento de >98%.

3. Bajo protección de nitrógeno, se disolvió el Compuesto B (11,7 g, 70,5 mmol) en THF seco (150 ml), se agitó hasta que se disolvió completamente, y a continuación se enfrió a 0 °C. Se añadió cloroformiato de etilo (15,65 ml, 119,8 mmol). A continuación se añadió gota a gota Et<sub>3</sub>N (22,83 ml, 120,0 mmol). Después de finalizar la adición, el sistema se dejó reaccionar adicionalmente en un baño de agua helada durante 4h. Cuando se completó la reacción, el Et<sub>3</sub>N·HCl producido se separó mediante filtración. El filtrado se concentró con un evaporador rotatorio. Finalmente, se realizó la recristalización varias veces utilizando éter etílico, para obtener un cristal de color amarillo, es decir, el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres (CDC), con un rendimiento del 64%.

La Figura 1 es un espectro de RMN del producto CDC anterior, <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.14 (s, 4H), 4.51 (s, 4H). Análisis elemental: C: 41,8 %, H: 4,20%, O: 24,3% (En teoría: C: 41,67%, H: 4,17%, O: 25%, S: 33,3%). Análisis de espectrometría de masa del monómero CDC: MS: 192,5 (peso molecular teórico: 192), véase la Figura 2. La Figura 3 muestra los espectros ultravioleta de las soluciones del producto monómero CDC mencionado, en tetrahidrofurano con diversas concentraciones. El anillo de cinco miembros con azufre-azufre en el monómero tiene absorción a 330 nm, mientras que la intensidad de absorción aumenta junto con el aumento de la concentración de monómero.

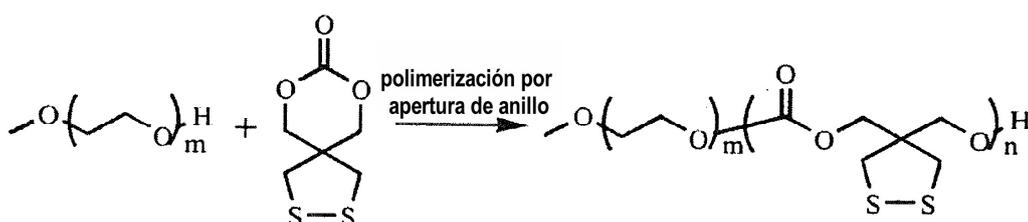
Ejemplo 2: Síntesis de un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres (CDC)

1. Se disolvió hidrosulfuro sódico monohidrato (28,25g, 381,7 mmol) en 400 ml de dimetil sulfóxido (DMSO), se calentó a 40 °C hasta que se disolvió completamente, y se añadió dibromoneopentil-glicol (20 g, 76,4 mmol) gota a gota. La reacción se dejó continuar durante 48 h. La mezcla de reacción se destiló bajo presión reducida para separar el disolvente DMSO, y a continuación se diluyó con 200 ml de agua destilada, y se extrajo cuatro veces con 250 ml de acetato de etilo. Finalmente, la fase orgánica se evaporó con un evaporador rotatorio, y se obtuvo un Compuesto A de color amarillo y viscoso con un rendimiento del 42%.

2. El Compuesto A disuelto en 400 ml de 4-dioxano se colocó al aire durante 24h. Los grupos sulfhidrido intramoleculares se oxidaron en enlaces de azufre-azufre, y de este modo se obtuvo el Compuesto B, con un rendimiento de >98%.

3. Bajo protección de nitrógeno, se disolvió el Compuesto B (11,7 g, 70,5 mmol) en 1,4-dioxano seco (150 ml), se agitó hasta que se disolvió completamente, y a continuación se enfrió a 0 °C. Se añadió cloroformiato de etilo (15,65 ml, 119,8 mmol). A continuación se añadió gota a gota Et<sub>3</sub>N (22,83 ml, 120,0 mmol). Después de finalizar la adición, el sistema se dejó reaccionar adicionalmente en un baño de agua helada durante 4h. Cuando se completó la reacción, el Et<sub>3</sub>N·HCl producido se separó mediante filtración. El filtrado se concentró con un evaporador rotatorio. Finalmente, se realizó la recristalización varias veces utilizando éter etílico, para obtener un cristal de color amarillo, es decir, el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres (CDC), con un rendimiento del 32%.

Ejemplo 3 Síntesis de un polímero dibloque PEG5k-*b*-PCDC2.8k

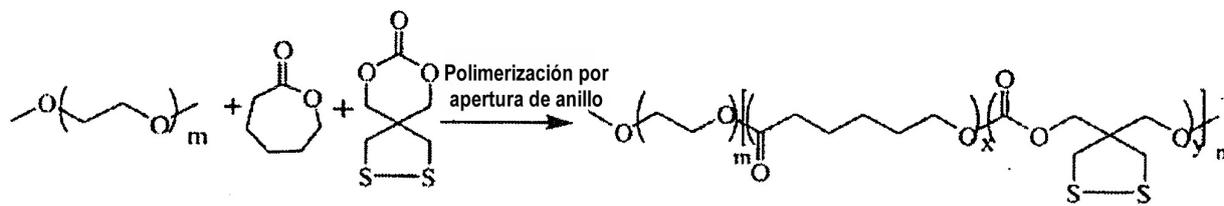


En la fórmula, m=114, n=14,6.

En entorno de nitrógeno, se añadieron 0,3 g (1,56 mmol) de como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres (CDC) y 2 ml de diclorometano en un reactor sellado. A continuación, se añadieron 0,5 g (0,1 mmol) de polietilenglicol con un peso molecular de 5.000, y una solución de 1 ml del catalizador bis[bis(trimetilsilil)amida] de zinc en diclorometano (0,1 mol/L). A continuación, el reactor se selló herméticamente y se extrajo de la caja seca, y se introdujo en un baño de aceite a 40 °C. La reacción se dejó continuar durante 1 día, y se terminó con ácido acético glacial, y se precipitó en éter etílico helado. Finalmente, después de la filtración y secado al vacío, se obtuvo el producto polímero de carbonato cíclico PEG5k-*b*-PCDC2.8k.

La Figura 4 es un espectro de RMN del polímero de carbonato cíclico mencionado: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.08 (s, -CCH<sub>2</sub>), 3.30 (m, -OCH<sub>3</sub>), 4.05 (s, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>2</sub>), 4.07 (s, -OCH<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>O-), 4.31 (m, -CCH<sub>2</sub>).

## Ejemplo 4 Síntesis del polímero dibloque PEG5k-P(CDC2.5k-co-CL3.9k)



En la fórmula  $m=114$ ,  $x=21,9$ ,  $y=13,0$ ,  $n=34,9$ .

5 En entorno de nitrógeno, se disolvieron 0,28 g (1,46 mmol) de un monómero CDC y 0,4 g (3,51 mmol) de caprolactona ( $\epsilon$ -CL) en 3 ml de diclorometano, y se añadieron a un reactor sellado. A continuación, se añadieron 0,5 g (0,1 mmol) de polietilenglicol con un peso molecular de 5.000, y una solución de 1 ml del catalizador bis[bis(trimetilsilil)amida] de zinc en diclorometano (0,1 mol/L). A continuación, el reactor se selló herméticamente, se extrajo de la caja seca, y se introdujo en un baño de aceite a 40 °C. La reacción se dejó continuar durante 1 día, y se terminó con ácido acético glaciar, y se precipitó en éter etílico helado. Finalmente, después de la filtración y secado al vacío, se obtuvo el producto polímero de carbonato cíclico PEG5k-P(CDC2.5k-co-CL3.9k).

10 La Figura 5 es un espectro de RMN del mencionado polímero:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.40 (m,  $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.65 (m,  $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 2.30 (t,  $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.08 (s,  $-\text{CCH}_2$ ), 3.30 (m,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.03 (t,  $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 4.05 (s,  $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_2-$ ), 4.07 (s,  $-\text{OCH}_2\text{CCH}_2\text{O}-$ ), 4.31 (m,  $-\text{CCH}_2$ ); peso molecular determinado por GPC: 14,0 kDa, distribución del peso molecular: 1,56.

## 15 Ejemplo 5: Preparación de nanopartículas micelares del polímero PEG5k-b-PCDC2.8k

Las nanopartículas micelares del polímero se prepararon mediante diálisis. El polímero PEG5k-b-PCDC2.8k se disolvió en N,N-dimetilformida (2 mg/ml), a continuación se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de la solución y se añadieron gota a gota a 800  $\mu\text{l}$  de una solución tampón de fosfatos (10 mM, pH 7,4, PB), y se introdujo en una bolsa de diálisis; la diálisis se realizó durante la noche, mientras que el fluido se reemplazó en cinco ocasiones. El medio para la diálisis fue un PB (tampón de fosfatos) (10 nM, pH 7,4). Las nanopartículas del polímero finalmente obtenidas tuvieron una concentración de 0,2 mg/ml.

## Ejemplo 6: reticulación, des-reticulación y citotoxicidad de las nanopartículas del polímero PEG5k-b-PCDC2.8k

25 La reticulación de las nanopartículas se realizó con adición de una cantidad catalítica de ditioneitol (DTT). Se introdujo nitrógeno en la solución acuosa de las nanopartículas del polímero durante 10 min para extraer el aire tanto como fuera posible. A continuación, se añadió 10  $\mu\text{l}$  de ditioneitol (DTT) disuelto en dd- $\text{H}_2\text{O}$  (0,007 mg,  $4,67 \times 10^{-5}$  mmol, número molar de los grupos funcionales de ácido lipico: 10%) a la solución de nanopartículas (1 ml, 0,25 mg/ml,  $3,21 \times 10^{-5}$  mmol) en un reactor sellado. La mezcla se selló, se agitó a temperatura ambiente y se dejó reaccionar durante 1 día. El tamaño medido de las partículas fue de 150 nm, lo que fue un 15% menos que el tamaño de las partículas no reticuladas. Después 100 veces de dilución, no hubo casi cambio alguno en la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas reticuladas. Las nanopartículas resultaron estables en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, puede observarse que la reticulación con dos azufres puede mejorar la estabilidad de las nanopartículas hasta un grado considerable.

35 El enlace azufre-azufre puede romperse fácilmente bajo la acción de reductores tales como el glutatión (GSH). Bajo condiciones de protección con nitrógeno y a 37 °C, las nanopartículas reticuladas se gasificaron con nitrógeno durante 10 min, a continuación se añadió GSH hasta que su concentración final en la solución de nanopartículas del polímero alcanzó 10mM. El tamaño de partícula de las nanopartículas reticuladas se rompió con el trascurso del tiempo, lo que indica que el anillo con dos azufres en el polímero se rompería en presencia de grandes cantidades de sustancias reductoras. Existe también una elevada concentración de la sustancia reductora GSH en el citoplasma. Por lo tanto, los soportes de nano-fármacos preparados son estables en la circulación, pero pueden disociarse rápidamente y liberar el fármaco una vez que son adquiridos por las células a través de la endocitosis.

45 La citotoxicidad de las nanopartículas micelares reticuladas se sometió a ensayo con el método del MTT. Las células utilizadas fueron células MCF-7 (células de cáncer de mama humano) y células Raw 264.7 (macrófagos de ratón). Las células MCF-7 o Raw 264.7 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de  $1 \times 10^4$  células/ml, 100  $\mu\text{l}$  por cada pocillo. Las células se cultivaron hasta que estuvieron adheridas a los recipientes de cultivo, a continuación para el grupo experimental, se añadieron los medios que contenían nanopartículas del polímero en diversas concentraciones. Además, se asignaron los pocillos de ensayo en blanco libres de células y de ensayo en blanco libres de medio. Se proporcionaron pocillos en paralelo por cuadruplicado. Después de 24 h de incubación en la incubadora, se sacaron las placas de 96 pocillos, y se añadió 10  $\mu\text{l}$  de MTT (5,0 mg/ml). Después de otras 4 h de incubación, se añadió 150  $\mu\text{l}$  de DMSO en cada pocillo para disolver el cristal formado. Se determinó el valor de

absorción (A) a 492 nm con un lector de placas. Se realizó un ajuste de cero con los pocillos de ensayo en blanco libres de medio. Se calculó la tasa de supervivencia celular.

$$\text{Tasa de supervivencia celular (\%)} = \frac{A_T}{A_C} \times 100\%$$

5 En la fórmula,  $A_T$  es la absorción a 490 nm del grupo experimental, y  $A_C$  es la absorción a 492 nm del grupo de ensayo en blanco de control. Las concentraciones del polímero fueron 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg/ml respectivamente. La Figura 6 muestra el resultado de citotoxicidad de las nanopartículas. Puede observarse a partir de la Figura 6 que, cuando la concentración de las nanopartículas del polímero aumentó de 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml, la tasa de supervivencia de las células Raw 264.7 y las células MCF-7 fue aún mayor que el 85%, lo que indica que las nanopartículas del polímero PEG5k-b-PCDC2.8k tienen una biocompatibilidad favorable.

10 Ejemplo 7: transporte del fármaco, liberación *in vitro* y citotoxicidad de las nanopartículas micelares reticuladas de PEG5k-b-PCDC2.8k

15 El fármaco utilizado fue la doxorubicina. Debido a que el fármaco anticancerígeno doxorubicina es una sustancia sensible a la fluorescencia, el procedimiento al completo se protegió de la luz. En primer lugar, la sal de clorhidrato de doxorubicina se retiró mediante el siguiente procedimiento: se disolvió 1,2 mg (0,002 mmol) de doxorubicina en 225  $\mu$ l de DMSO, a continuación se añadió 0,58 ml de trietilamina (m = 0,419 mg, 0,004 mmol) y se agitó durante 12 h. El sobrenadante se aspiró. La concentración de la solución de doxorubicina en DMSO fue de 5,0 mg/ml. Las nanopartículas del nano-polímero PEG5k-b-PCDC2.8k se disolvieron en N,N-dimetilformida (DMF). La solución de doxorubicina en DMSO y la solución de las nanopartículas del polímero PEG5k-b-PCDC2.8k en DMF se mezclaron cuidadosamente a una relación predeterminada del fármaco con respecto a la masa del polímero. Bajo agitación, se 20 añadió lentamente dd-H<sub>2</sub>O (15 s/d), cuyo volumen era de cuatro veces la mezcla. Cuando la adición gota a gota se completó, la mezcla se sometió a diálisis con agua destilada.

25 La reticulación de las nanopartículas micelares cargadas con el fármaco también se realizó de acuerdo al método de reticulación descrito en el Ejemplo 5. La solución de las nanopartículas del polímero (100  $\mu$ l) cargadas con doxorubicina y reticuladas se sometió a liofilización, y a continuación se disolvió en 3,0 ml de DMSO, y se midió por espectrofotómetro fluorescente. Se calculó la tasa de encapsulación en referencia a la curva estándar de doxorubicina.

Se calculó el contenido de carga del fármaco (DLC) y la eficacia de carga del fármaco (DLE) de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\text{Contenido de carga del fármaco (\% en peso)} = (\text{peso del fármaco} / \text{peso del polímero}) \times 100\%$$

30 Eficacia de carga del fármaco (%) = (peso del fármaco cargado / peso total del fármaco alimentado) x 100%

La tabla 1 muestra el resultado del cálculo anterior. Puede observarse que las nanopartículas del polímero PEG5k-b-PCDC2.8k tienen un efecto de encapsulación altamente eficaz sobre el fármaco anticancerígeno de pequeña molécula doxorubicina.

35 Tabla 1 Resultado del contenido de carga del fármaco y eficacia de carga del fármaco en las nanopartículas micelares reticuladas cargadas con doxorubicina

Polímero	Relación de alimentación (% en peso)	Contenido de carga del fármaco (% en peso)	Eficacia de carga del fármaco (%)	Tamaño (nm)	Distribución del Tamaño de partícula
PEG5k-b-PCDC2.8k	5	4,0	83,3	150,3	0,17
	10	7,4	80,0	162,1	0,22
	15	9,1	68,2	173,2	0,19

40 El experimento de liberación de doxorubicina se realizó en un agitador termostático a 37 °C bajo agitación a 200 rpm. La comparación de la liberación del fármaco se realizó con dos grupos paralelos, cada grupo con muestras duplicadas. Grupo 1: se liberaron nanopartículas del polímero reticulado cargado con doxorubicina en PB (10 mM, pH 7,4) que simuló el entorno reductor intracelular mediante la adición de glutatión 10 mM (GSH); Grupo 2: la liberación de nanopartículas del polímero cargado con doxorubicina reticulado en PB (10 mM, pH 7,4); la concentración de las nanopartículas del polímero cargado con el fármaco fue de 25 mg/l; se tomaron 0,5 ml de la solución y se introdujeron en una bolsa de diálisis (MWCO: 12.000-14.000) para su liberación, se añadieron a cada

tubo los correspondientes disolventes para diálisis (25 ml). En el intervalo de tiempo pre-determinado, se extrajo 5,0 ml del medio al exterior de la bolsa de diálisis para el ensayo, mientras los tubos se complementaron con 5,0 ml del medio correspondiente. La concentración del fármaco en la solución se determinó con un espectrofotómetro de fluorescencia EDINBURGH FLS920. La Figura 7 muestra la relación entre la tasa de liberación acumulada de doxorubicina y el tiempo. Puede observarse a partir de la figura que, después de añadir la sustancia reductora glutatión (GSH) que simula las células cancerígenas, la liberación fue significativamente más rápida que en condiciones en las que el componente GSH no fue añadido. Ello sugiere que en presencia de la sustancia reductora GSH 10mM, las nanopartículas reticuladas cargadas con el fármaco son capaces de liberar dicho fármaco de forma efectiva.

Se realizó el ensayo de citotoxicidad de las nanopartículas reticuladas de PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargadas con DOX en células Raw264.7 y MCF-7 con el método del MTT. Se utilizaron como control nanopartículas no reticuladas portadoras del fármaco y los fármacos libres. Como ejemplo, se sembraron células Raw264.7 ( $1 \times 10^4$  células/ml) en placas de 96 pocillos, a razón de 100  $\mu$ l por pocillo. Las células se cultivaron hasta que quedaron adheridas a los recipientes de cultivo. A continuación, para los grupos experimentales, se añadieron respectivamente las soluciones que contenían nanopartículas reticuladas cargadas con doxorubicina a razón de 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ g/ml, la solución de nanopartículas no reticuladas y cargadas con doxorubicina, y un medio fresco que contenía doxorubicina libre. Además, se proporcionaron pocillos de control libres de células y pocillos de ensayo en blanco libres de medio. Los pocillos se proporcionaron por cuadruplicado. Después de 48h de incubación en la incubadora, se extrajeron las placas de 96 pocillos, a continuación se añadió a las mismas 10  $\mu$ l de MTT (5,0 mg/ml). Después de otras 4 h de incubación, se añadió 150  $\mu$ l de DMSO en cada pocillo para disolver el cristal formado. El valor de absorción (A) a 492 nm se determinó con un lector de placas. Se realizó un ajuste de cero con los pocillos de ensayo en blanco libres de medio. Se calculó la tasa de supervivencia celular. En referencia a la Figura 8, puede observarse a partir del resultado del experimento que, la concentración media letal de las nanopartículas reticuladas cargadas con doxorubicina en células Raw264.7 es 4,89  $\mu$ g/ml. Por lo tanto, las nanopartículas reticuladas de PEG5k-*b*-PCDC2.8k portadoras de DOX pueden liberar fármacos en las células de forma efectiva y destruir las células cancerígenas.

Ejemplo 8: Determinación de la circulación en sangre *in vivo* de nanopartículas reticuladas de PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargadas con un fármaco en ratones.

Se utilizaron en el experimento ratones C57BL/6 negros con un peso corporal de aproximadamente 18~20 g, de 4~6 semanas de edad (The Experimental Animal Center, The Shanghai Institutes for Biological Sciences of the Chinese Academy of Sciences). Los ratones se pesaron, y se agruparon de forma equitativa en base a su peso corporal. Se inyectaron en los ratones nanopartículas portadoras de fármaco y fármacos libres a través de las venas de la cola, donde la dosis de DOX fue de 10mg/kg. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 10  $\mu$ l) en los puntos de tiempo de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h. El peso exacto de la sangre se determinó a través de un método de pesada por diferencia, a continuación se añadieron 100  $\mu$ l de Triton (concentración: 1 %) y 500  $\mu$ l de DMF (que contenía DTT 20mM, HCl 1 M). La muestra se sometió a extracción, seguido de centrifugación (20.000 rpm, 20 min). A continuación, se recogió el sobrenadante, y se determinó la cantidad de DOX en cada punto de tiempo mediante fluorescencia.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la circulación en sangre *in vivo* de nanopartículas reticuladas cargadas con doxorubicina del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k en ratones. El eje horizontal representa el punto de tiempo, mientras que el eje vertical presenta la cantidad de DOX por gramo de sangre en función de la cantidad total de DOX inyectada (ID%/g). Puede observarse a partir del gráfico que la DOX libre tiene un tiempo en circulación corto; la DOX puede determinarse apenas después de 2h. Sin embargo las nanopartículas reticuladas portadoras del fármaco aún tienen 4 ID %/g después de 24 h. Por tanto, puede calcularse que la vida media de las nanopartículas reticuladas portadoras de fármaco en ratones es de 4,67 horas, mientras que la vida media de la DOX libre es únicamente de 0,21 horas. Por lo tanto, las nanopartículas reticuladas portadoras del fármaco son estables en los ratones, y tienen un tiempo de circulación relativamente prolongado.

Ejemplo 21: distribución biológica de las nanopartículas reticuladas de PEG5k-*b*-PCDC2.8k portadoras de fármaco para ratones con presencia de melanoma.

Se utilizaron ratones C57BL/6 negros con un peso corporal de aproximadamente 18~20 g, de 4~6 semanas de edad en el experimento; se inyectaron  $1 \times 10^6$  células de melanoma B16 por vía subcutánea. Después de dos semanas, cuando el tamaño de los tumores era 100~200 mm<sup>3</sup>, se inyectaron nanopartículas cargadas con fármaco y DOX libre en los ratones a través de las venas de la cola (la dosis de DOX fue 10 mg/kg). Después de 6, 12 y 24 horas, se realizó la eutanasia a los ratones. Se extrajo, se lavó y se pesó el tumor, y tejido del corazón, hígado, bazo, pulmón y riñón. A continuación, se añadió 500  $\mu$ l de Triton al 1%, las muestras se trituraron con un homogeneizador, se extrajeron después de añadir 900  $\mu$ l de DMF (que contenían DTT 20mM, HCl 1M). Después de la centrifugación (20.000 rpm, 20 min), se recogió el sobrenadante, y se determinó la cantidad de DOX en cada punto de tiempo mediante fluorescencia.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el resultado de la distribución biológica de las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargadas con doxorubicina para los ratones con presencia de melanoma. El eje

horizontal representa el tejido de órganos, mientras que el eje vertical representa la cantidad de DOX por gramo de tumor o tejido contra la cantidad total de DOX inyectada (ID%/g). Las cantidades acumuladas de nanopartículas portadoras de fármaco en el tumor a las 6, 12 y 24 h son 3,12, 2,93, 2,52 ID%/g respectivamente, lo que es 3~12 veces mayor que aquellas de DOX libre (1,05, 0,52 y 0,29 ID%/g, respectivamente). Esto indica que mediante el efecto del EPR, las nanopartículas reticuladas cargadas con fármaco se acumulan más en los sitios del tumor, y pueden sostenerse durante un periodo de tiempo más prolongado.

Ejemplo 22: el experimento de tratar ratones con presencia de melanoma con nanopartículas reticuladas de PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargadas con fármaco.

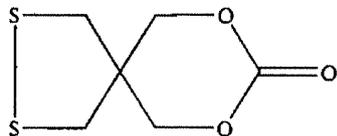
Se utilizaron en el experimento ratones C57BL/6 negros con un peso corporal de aproximadamente 18~20 g, de 4~6 semanas de edad. Los ratones se pesaron y se agruparon de forma equitativa en base a su peso corporal, a continuación se inyectaron  $1 \times 10^6$  células de melanoma B16 por vía subcutánea. Después de una semana, cuando el tamaño de los tumores era de 30~50 mm<sup>3</sup>, se inyectaron nanopartículas cargadas con fármaco y DOX libre en los ratones a través de las venas de la cola en el día 0, 2, 4, 6, y 8, en el que la cantidad de DOX en las nanopartículas portadoras de fármaco fue de 10, 20, 30 mg/kg, mientras que la dosis de DOX libre fue de 10 mg/kg. Desde el día 0 al 15, se pesó cada día el peso corporal de los ratones en cada grupo. El tamaño del tumor se midió de forma precisa con la escala de Vernier, donde el método para calcular el volumen de los tumores fue:  $V=(L \times W \times H)/2$ , (donde L correspondía a la longitud del tumor, W correspondía al ancho del tumor, y H correspondía al grosor del tumor). Se observó la supervivencia de los ratones de forma continuada hasta el día 46.

La Figura 11 es un gráfico curvilíneo que muestra que las nanopartículas reticuladas del polímero PEG5k-*b*-PCDC2.8k cargadas con doxorubicina inhiben el crecimiento tumoral en ratones con presencia de melanoma; la Figura 12 es un gráfico curvilíneo que muestra el cambio de peso corporal de los ratones; la Figura 13 es un gráfico curvilíneo que muestra la supervivencia de los ratones. A partir de las figuras puede observarse que, a la concentración de DOX de 30 mg/kg, después de un tratamiento de 16 días con nanopartículas portadoras de DOX, los tumores resultaron claramente inhibidos. Sin embargo, aunque el DOX puede también inhibir la expansión tumoral, tuvo graves efectos secundarios tóxicos en los ratones. Incluso aunque la concentración de DOX en las nanopartículas cargadas con fármaco alcance 30 mg/kg, el peso corporal de los ratones casi no se modificó, lo que indica que las nanopartículas cargadas con fármaco no tuvieron efectos secundarios en los ratones. Mientras tanto, el peso corporal de los ratones en el grupo con DOX disminuyó un 23% en 7 días, lo que indica que el DOX tuvo graves efectos secundarios en los ratones. A la concentración de DOX de 30 mg/kg, y en el grupo en que los ratones fueron tratados con nanopartículas portadoras de DOX durante 46 días, todos los ratones sobrevivieron, mientras que todos los ratones tratados con DOX murieron en el día 10 del tratamiento; además, en el grupo de control donde se administró PBS, todos los ratones murieron en el día 35. Por lo tanto, las nanopartículas cargadas con fármaco pueden inhibir el crecimiento tumoral de forma efectiva, y no tienen ningún efecto tóxico en los ratones; además, pueden prolongar la vida de los ratones portadores de tumor.

Los resultados anteriores indican que el polímero preparado a partir del monómero de la presente descripción tiene una biocompatibilidad favorable. Cuando se utiliza como un soporte de fármaco, puede aumentar el tiempo de circulación *in vivo* de los fármacos anti-cancerígenos, aumentan la relación de acumulación del fármaco en el sitio del tumor, y evitan que el fármaco dañe los tejidos normales. Puede destruir de forma efectiva las células tumorales, mientras que tiene un efecto mínimo sobre las células normales.

## REIVINDICACIONES

1. Un monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres, en donde el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres tiene la siguiente estructura química:



5

2. Un método para preparar el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres según la reivindicación 1, en donde el método comprende las siguientes etapas: hacer reaccionar dibromoneopentil-glicol con hidrosulfuro sódico monohidrato en un disolvente polar para obtener el Compuesto A; a continuación oxidar el Compuesto A en aire para obtener el Compuesto B; finalmente, en atmósfera de nitrógeno y en un disolvente a base de éter cíclico, hacer reaccionar el Compuesto B con cloroformiato de etilo para obtener el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres.

10

3. El método para preparar el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres según la reivindicación 2, en donde la relación molar de dibromoneopentil-glicol con respecto a hidrosulfuro sódico monohidrato es de (2,5~10):1; y la relación molar del Compuesto B con respecto al cloroformiato de etilo es de 1:(2~4).

15

4. El método para preparar el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres según la reivindicación 2, en donde para preparar el Compuesto A, la temperatura de extracción es de 50 °C, y el tiempo de reacción es de 48 h; para preparar el Compuesto B, el tiempo para la oxidación del Compuesto A es de 24 h; para preparar el monómero de carbonato cíclico, la temperatura de reacción se mantiene con un baño de agua helada, y el tiempo de reacción es de 4 h.

20

5. El método para preparar el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres según la reivindicación 2, en donde el disolvente polar es N,N-dimetilformida (DMF); y el disolvente a base de éter cíclico es tetrahidrofurano o 1,4-dioxano.

25

6. El método para preparar el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres según la reivindicación 2, en donde el Compuesto A se disuelve en primer lugar en un disolvente a base de éter, y a continuación se oxida en aire para obtener el Compuesto B.

7. El método para preparar el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres según la reivindicación 6, en donde el disolvente a base de éter es tetrahidrofurano o 1,4-dioxano.

30

8. El método para preparar el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres según la reivindicación 2, en donde el método además comprende un tratamiento de purificación como el siguiente:

(1) purificación del Compuesto A: cuando se completa la reacción, la mezcla de reacción se somete a destilación bajo presión reducida para separar el disolvente, a continuación se diluye con agua destilada, y se extrae con acetato de etilo; finalmente, la fase orgánica se evapora con un evaporador rotatorio, y se obtiene el Compuesto A de color amarillo y viscoso;

35

(2) purificación del monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres: se realiza la filtración después de que la reacción se completa; el filtrado se concentra con un evaporador rotatorio, y a continuación se recristaliza con éter etílico para obtener un cristal amarillo, que es el monómero de carbonato cíclico que contiene como grupo funcional un anillo de cinco miembros con dos azufres.

40

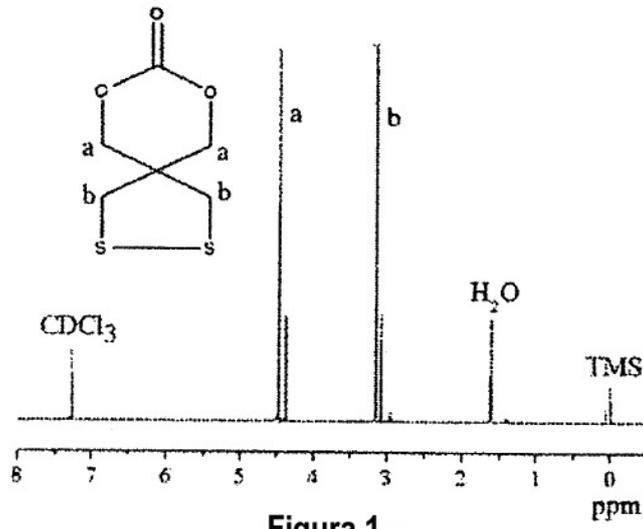


Figura 1

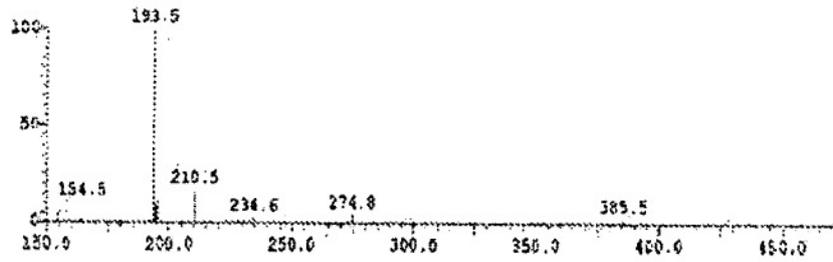


Figura 2

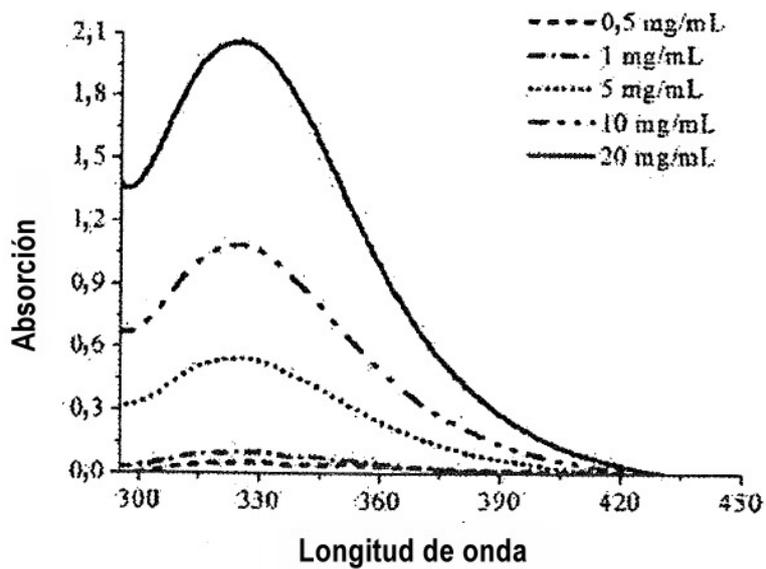


Figura 3

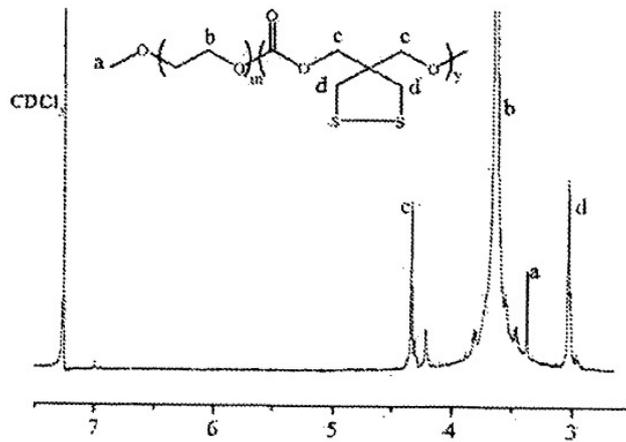


Figura 4

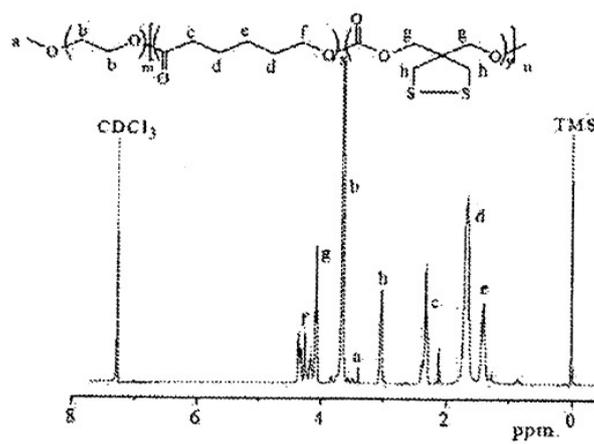


Figura 5.

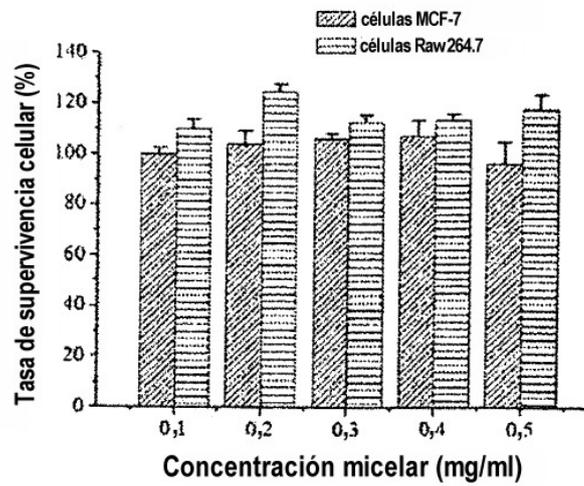


Figura 6

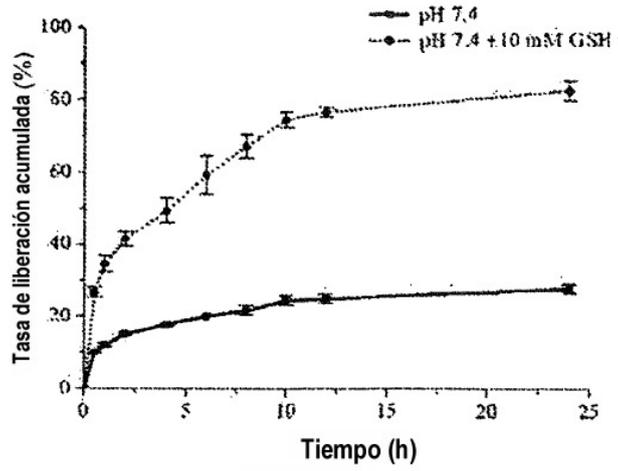


Figura 7

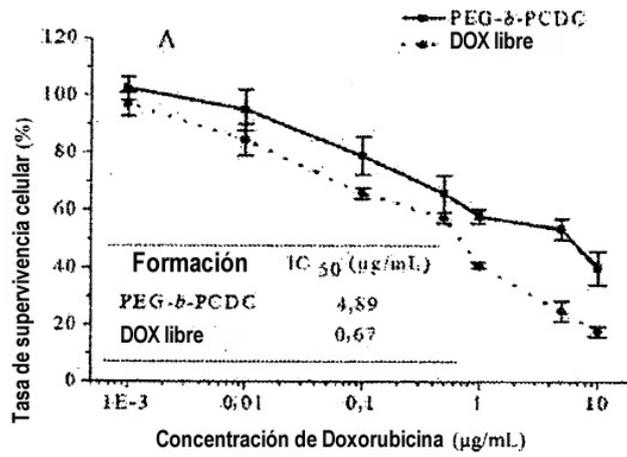


Figura 8

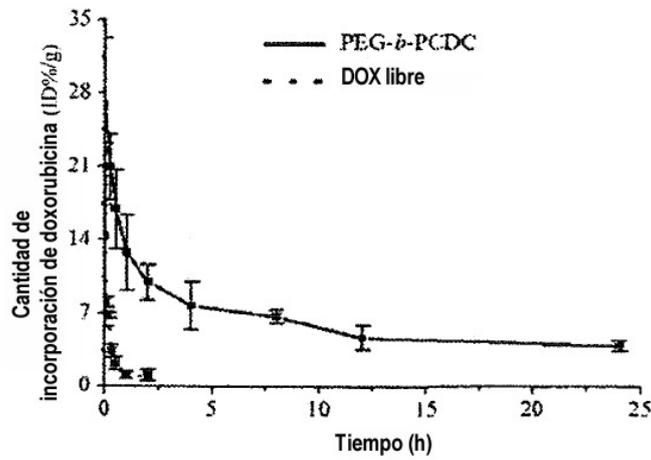


Figura 9

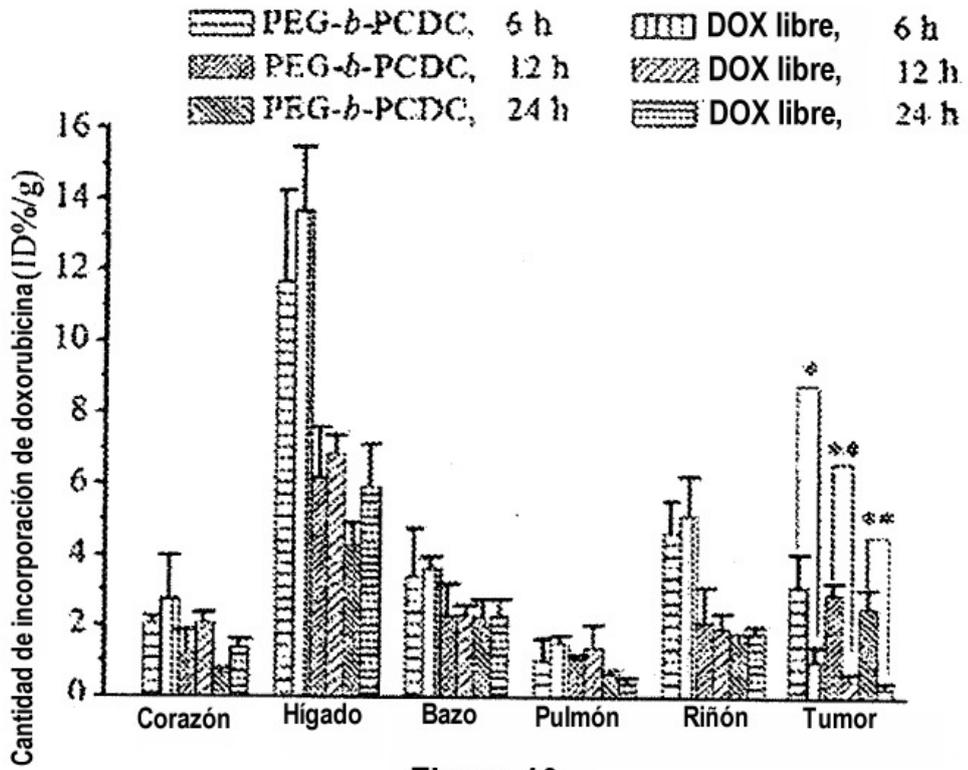


Figura 10

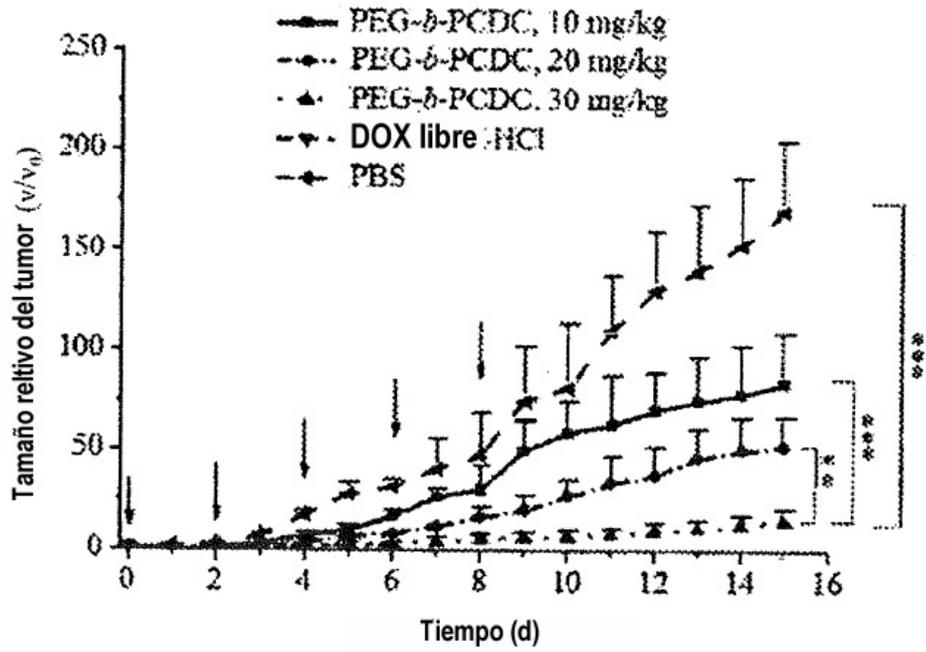


Figura 11

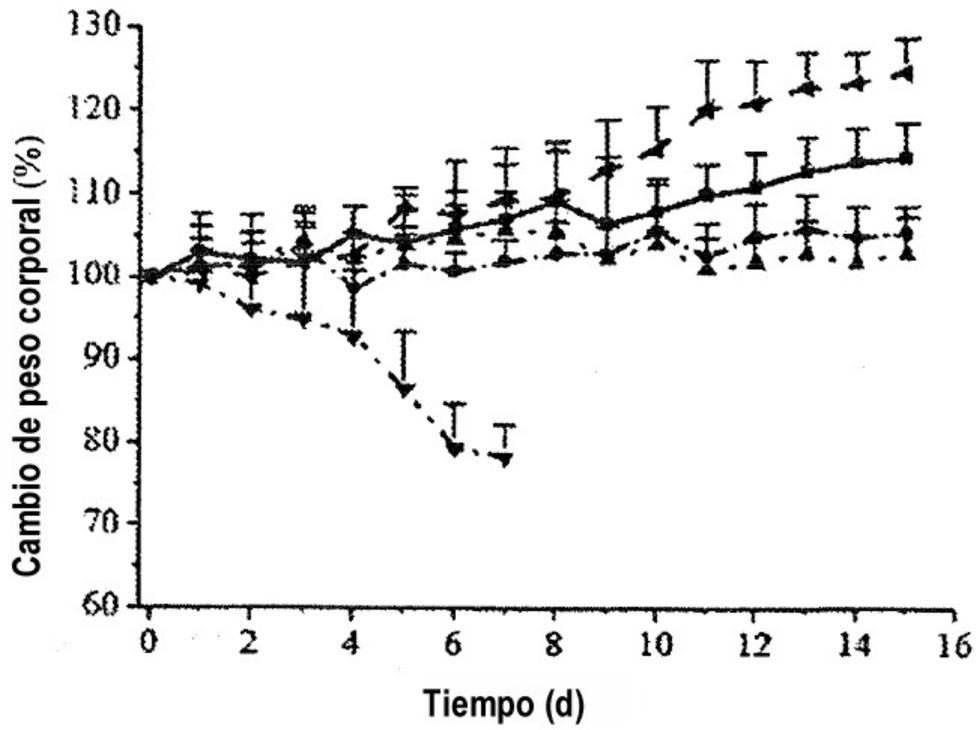


Figura 12

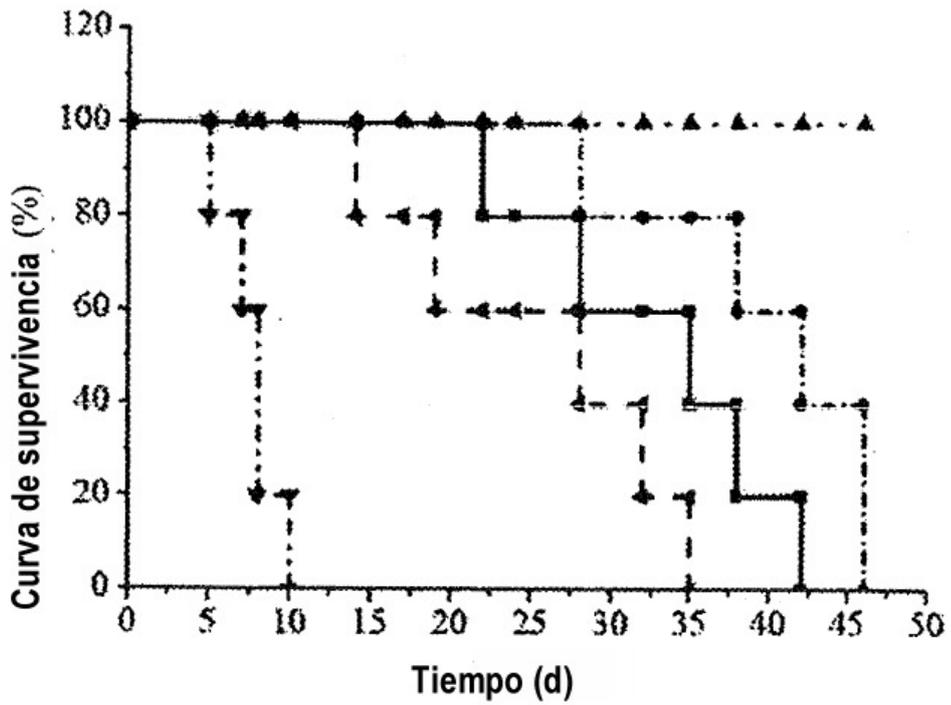


Figura 13