(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 786 309**

(51) Int. CI.:

A61K 47/60 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/KR2015/002488**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15137777**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15760898 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3118244**

(54) Título: **Nuevos compuesto de polifosfaceno cationico, compuesto de conjugado de fármacos de polifosfacenos y procedimiento para preparar los mismos**

(30) Prioridad:

14.03.2014 KR 20140030564
11.03.2015 KR 20150034030

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

(73) Titular/es:

CNPHARM CO., LTD. (100.0%)
B-455 Ewha Womans University, Jonghap Science Museum, 52 Ewhayeodae-gil, Seodaemun-gu
Seoul 120-750, KR

(72) Inventor/es:

SOHN, YOUN SOO;
JUN, YONG JOO y
AVAJI, PRAKASH GOUDA

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Nuevos compuesto de polifosfaceno cationico, compuesto de conjugado de fármacos de polifosfacenos y procedimiento para preparar los mismos

Campo técnico

La presente invención se refiere a polímeros vehículos de polifosfaceno catiónicos lineales biocompatibles y altamente selectivos a tumores y sus conjugados de fármacos anticancerígenos, y un procedimiento de preparación de los mismos.

Antecedentes de la técnica

La mayoría de los fármacos anticancerígenos actualmente en uso clínico para quimioterapia son compuestos monoméricos con un bajo peso molecular inferior a 1000 Da. Es bien sabido que tales fármacos anticancerígenos monoméricos de bajo peso molecular causan graves toxicidades y efectos secundarios debido a su no selectividad a las células tumorales y al tejido cuando se inyectan por vía intravenosa, y además, su corta vida media de menos de unas pocas horas durante la circulación sanguínea limita su eficacia sostenible Por lo tanto, las tecnologías clave más importantes para vencer en el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos son la tecnología de focalización tumoral para la administración selectiva de fármacos anticancerígenos al sitio del tumor y la tecnología de liberación oportuna del componente activo de los fármacos anticancerígenos en el sitio del tumor. Se han realizado muchos esfuerzos para superar tales límites en el mundo durante las últimas décadas, y como resultado, se ha descubierto que los sistemas de administración de fármacos poliméricos son una de las formas más eficientes y prácticas para lograr un avance, desde el cual surgió un nuevo campo llamado "terapia polimérica" (R. Haag, F. Kratz, Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 1198-1215).

La mayoría de los polímeros empleados como sistemas de administración de fármacos son polímeros orgánicos sintéticos o naturales. Se intentaron numerosos polímeros naturales y sintéticos como sistemas de administración de fármacos para la terapia polimérica, pero solo se encontró que un número limitado de sistemas de administración de fármacos eran útiles, ya que, además de las propiedades de focalización tumoral y la cinética de liberación mencionadas anteriormente, muchos requisitos tales como la solubilidad en agua, la biodegradabilidad, la auto-toxicidad, la compatibilidad con el fármaco cargado deben ser satisfechos para la terapia polimérica del cáncer.

Los presentes inventores descubrieron hace décadas que, en contraste con los polímeros orgánicos mencionados anteriormente, se diseñó una nueva clase de polímeros híbridos orgánicos/inorgánicos injertando varios grupos orgánicos en la cadena principal de polímeros inorgánicos que consiste en átomos alternos de nitrógeno y fósforo llamados fosfacenos (Y. S. Sohn y col. Macromolecules, 1995, 28, 7566), que se han desarrollado intensamente como sistemas de administración de fármacos para la terapia contra el cáncer. En la etapa inicial, se introdujeron varios poli(etilenglicol) (PEG) hidrófilos y oligopéptidos hidrófobos en la cadena principal del fosfaceno para obtener polifosfacenos anfifílicos que proporcionan sistemas de administración de fármacos termosensibles. También se descubrió que tales polifosfacenos anfifílicos se autoensamblan en varias nanoestructuras como micelas termosensibles e hidrogeles útiles para la administración de fármacos en solución acuosa, pero también se observó una disminución de la solubilidad en agua y cierta toxicidad debido a algunos oligopéptidos hidrofóbicos injertados en la cadena principal de polifosfaceno. En general, se sabe que tales polímeros anfifílicos exhiben una temperatura de solución crítica más baja (LCST) a la cual el polímero comienza a precipitar de su solución acuosa cuando se calienta lentamente. Por lo tanto, el sistema de administración de fármacos de polímero anfifílico debe exhibir una LCST más alta que la temperatura corporal para inyección intravenosa para evitar su precipitación durante la circulación sanguínea.

Con respecto a los fármacos hidrofóbicos anticancerígenos, la familia de los taxanos, incluidos el paclitaxel y el docetaxel, es una de las más utilizadas para la quimioterapia eficaz de un amplio espectro de cánceres, incluidos los cánceres de mama, de ovario y de pulmón de células no pequeñas. Dado que estos agentes anticancerígenos de taxano son solo ligeramente solubles en agua (<1 µg/ml), no pueden inyectarse directamente, sino que deben formularse utilizando tensioactivos como Polysorbate 80 o Cremophore EL y etanol para inyección intravenosa. Sin embargo, dichos agentes anticancerígenos de taxano formulados exhiben varios efectos adversos, incluyendo neurotoxicidad y neutropenia debido al propio agente e hipersensibilidad debido al sistema disolvente, lo que limita su uso clínico más amplio. Por lo tanto, durante la última década se han realizado una gran cantidad de investigaciones en diversos campos para superar tales efectos adversos, y entre ellos, la nanotecnología que utiliza diversas morfologías estructurales está progresando más activamente. En particular, las micelas poliméricas compuestas de la cubierta externa hidrófila y el núcleo hidrófobo pueden permitirse solubilizar los fármacos anticancerígenos hidrófobos como el taxano mediante la encapsulación de las moléculas de fármaco hidrófobas en el núcleo de micelas hidrófobas. Además, las moléculas del fármaco taxano pueden conjugarse mediante enlaces químicos con el poli(etilenglicol) hidrófilo para solubilizarse, que ahora se encuentran en ensayos clínicos.

Se espera que dichos profármacos poliméricos compuestos de fármacos anticancerígenos de pequeño peso molecular conjugados con los sistemas de administración de fármacos poliméricos extiendan su tiempo de circulación sanguínea y proporcionen propiedades de focalización tumoral mediante un efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR) (H. Maeda y col. J. Control. Lanzamiento 65(2000) 271-284) junto con la liberación controlada del fármaco, lo que resulta en la máxima eficacia del fármaco y toxicidad mínima. Según los informes recientes, el tamaño de partícula del polímero debe estar en el intervalo de 50-200 nm para exhibir propiedades de focalización tumoral por efecto EPR (V. P. Torchilin, J. Control. Lanzamiento 73(2001)137-172). Además, según el estudio del administración de genes, se informó que los polímeros catiónicos pueden penetrar fácilmente las células tumorales aniónicas (N. P. Gabrielson, D. W. Park, J. Control. Lanzamiento 136 (2009)54-61). Sin embargo, Poliglumex compuesto de paclitaxel conjugado a poli(ácido glutámico) actualmente en fase clínica III es fuertemente catiónico, pero se sabe que está más acumulado en otros órganos que en el tejido tumoral, lo que retrasa su comercialización (S. Wallace; C. Li, Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (2008) 886-898).

[Documento de la técnica anterior]

[No patente documento 1] R. Haag, F. Kratz, Angew. Chem. Int. Ed. 45(2006)1198-1215)

US2013/0324490 describe conjugados de poli(organo)fosfacenos y fármacos anticancerígenos.

Descripción

Problema técnico

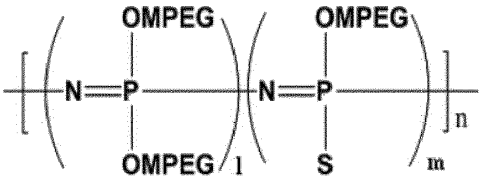
Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una nueva clase de compuestos de polifosfaceno catiónicos para la administración de fármacos y sus compuestos conjugados de fármacos anticancerígenos con excelente selectividad tumoral y propiedades de liberación de fármacos fáciles en el sitio del tumor, y un procedimiento de preparación de los mismos.

Los presentes inventores han estado buscando sistemas de administración de fármacos clínicamente más eficientes que ofrezcan una excelente selectividad tumoral y propiedades de liberación de fármacos fáciles bajo los antecedentes técnicos mencionados anteriormente y finalmente descubrieron que los polifosfacenos injertados con un PEG hidrófilo como grupo solubilizante y uno seleccionado de un aminoácido multifuncional, un oligopéptido que implica un aminoácido o un amino-alcohol lineal como grupo espaciador para conjugarse con un fármaco anticancerígeno hidrófobo exhibe una excelente selectividad tumoral debido a sus propiedades catiónicas y a su larga circulación sanguínea. Los presentes inventores han descubierto además que cuando los fármacos anticancerígenos hidrófobos se conjugan con el polímero vehículo de polifosfaceno mencionado anteriormente usando un enlazador escindible con ácido, se obtienen fármacos anticancerígenos poliméricos inteligentes con excelente selectividad tumoral y propiedades de liberación controlada en el sitio del tumor por degradación ácida.

Solución Técnica

Para realizar la tarea anterior, la presente invención proporciona los polifosfacenos lineales representados por la siguiente fórmula química 1.

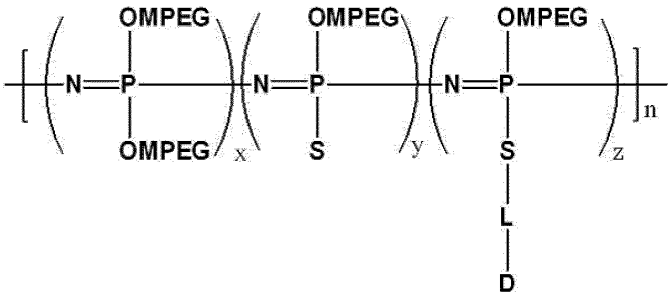
[Fórmula química 1]



donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; l es igual a 0 ~ 0,9; m es igual a 0,1 ~1 y l + m es igual a 1.

La presente invención también proporciona los conjugados de fármacos polifosfaceno-anticancerígenos representados por la siguiente fórmula química 2.

[Fórmula química 2]



donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino -butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; L es un enlazador para conectar el grupo espaciador del polímero y la molécula D del fármaco que lleva un grupo hidroxilo o amina; x e y están independientemente en el intervalo de 0 ~ 0,5; z está en el intervalo de 0 ~ 1; y x + y + z = 1.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco representados por la fórmula química 2 que comprende las etapas (a) a (d):
(a) preparar un producto intermedio de polifosfaceno PEGilado sometiendo un material de partida hexaclorociclotrifosfaceno a polimerización térmica para obtener un poli(diclorofosfaceno) lineal y, a continuación, hacer reaccionar el poli(diclorofosfaceno) lineal con la sal sódica de metoxi poli(etilenglicol),
(b) preparar un polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo haciendo reaccionar el producto intermedio de polifosfaceno PEGilado con un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en éster de lisina, éster de oligopéptido que contiene lisina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol, y amino-hexanol,
(c) preparar un precursor enlazador de fármaco haciendo reaccionar moléculas de fármaco que llevan grupo funcional OH o NH_2 con un enlazador apropiado,
(d) conectar el precursor enlazador de fármaco obtenido de la Etapa (c) al grupo espacial del polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo obtenido de la Etapa (b).

Alternativamente, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco representados por la siguiente fórmula química2que comprende las etapas (a) a (d):
(a) preparar un producto intermedio de polifosfaceno PEGilado sometiendo un material de partida hexaclorociclotrifosfaceno a polimerización térmica para obtener un poli(diclorofosfaceno) lineal y, a continuación, hacer reaccionar el poli(diclorofosfaceno) lineal con la sal sódica de metoxi poli(etilenglicol),
(b) preparar un polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo haciendo reaccionar el producto intermedio de polifosfaceno PEGilado con un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en éster de lisina, éster de oligopéptido que contiene lisina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol, y amino-hexanol,
(c) conectar un grupo enlazador al grupo espacial del polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo obtenido de la etapa (b),
(d) conectar moléculas de un fármaco con OH o NH_2 grupo funcional al grupo enlazador que está conectado al polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo obtenido de la etapa (c).

Efectos Ventajosos

Los compuestos catiónicos lineales de polifosfaceno de la presente invención exhiben una alta selectividad tumoral, y se encontró que los compuestos conjugados lineales de polifosfaceno-fármaco de la presente invención se acumularon en los tejidos tumorales con una selectividad mucho mayor en comparación con la de otros órganos principales como el hígado y riñón en contraste con los productos conjugados convencionales de polímero orgánico-fármaco. Además, los presentes compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco lineales son estables sin liberar el fármaco conjugado en sangre y órganos neutros, pero se liberan fácilmente en el microambiente ácido tumoral, dando como resultado la máxima eficacia del fármaco y la mínima toxicidad. Por lo tanto, los compuestos de polifosfaceno lineales catiónicos y sus compuestos conjugados de fármacos anticancerígenos de la presente invención son nuevos materiales muy prometedores para la comercialización.

Descripción de los dibujos

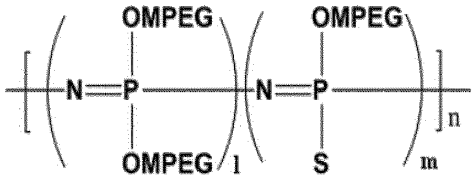
La figura 1 muestra la distribución del tamaño de partícula de un compuesto de polifosfaceno catiónico del Ejemplo 1. (El diámetro medio = 3,0 nm)
La figura 2 muestra el potencial zeta medido para el compuesto de polifosfaceno catiónico del Ejemplo 1.

La figura 3 muestra la distribución del tamaño de partícula del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo 14 (El diámetro medio = 60 nm).
La figura 4 muestra la concentración crítica de micelas (CMC) del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo 14 medido por el procedimiento de fluorescencia de pireno.
La figura 5 muestra la degradación dependiente del tiempo del producto conjugado de polifosfaceno-paclitaxel del ejemplo 20 a pH ácido 5,4 y pH neutro 7,4.
La figura 6 (a) muestra imágenes de fluorescencia NIR Ex vivo de las biodistribuciones dependientes del tiempo (12 h, 24 h, 48 h, 72 h después de la inyección) del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel marcado con Cy del Ejemplo 14 en órganos principales (1: hígado; 2: pulmón; 3: riñón; 4: bazo; 5: tumor; 6: músculo) de los ratones inoculados con células tumorales de pulmón de células no pequeñas A549, (b) muestra las imágenes de fluorescencia NIR dependientes del tiempo de sangre (WB) y plasma (PL).
La figura 7 muestra las biodistribuciones dependientes del tiempo (24 h y 48 h después de la inyección) en los órganos principales (1: hígado; 2: pulmón; 3: bazo; 4: riñón; 5: tumor; 6: corazón) de producto conjugado polifosfaceno-docetaxel marcado con Cy del Ejemplo 14 que se inyecta IV a los ratones inoculados con células tumorales SCC7.
La figura 8 muestra la intensidad de fluorescencia dependiente del tiempo de cada órgano de los ratones tratados en la figura 7, que se compara con la de cada órgano de los ratones no tratados con fármaco.
La figura 9 muestra los perfiles de concentración plasmática media de docetaxel después de la inyección IV entre los resultados del estudio farmacocinético del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo 14 (■) y Taxotere (◆) como referencia usando la rata Sprague-Dawley.
La figura 10 muestra los resultados de los ensayos de xenoinjerto del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo 14 usando ratón desnudo BALB/C y línea celular de tumor gástrico MKN-28.
La figura 11 muestra los cambios en el peso corporal del ratón durante el período de ensayos de xenoinjerto (40 días) en la figura 10.
La figura 12 muestra los resultados de los ensayos de xenoinjerto del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo 14 usando la línea celular A549 de carcinoma de células no pequeñas de ratón BALB/C.

Mejor modo de la invención

Se proporcionan la constitución y la acción más detallada de la presente invención. La presente invención es realizada en la siguiente descripción, pero no se limita a la misma. La constitución y la acción detalladas de la presente invención se ejemplifican como a continuación. Con el fin de lograr el propósito mencionado anteriormente, se proporcionan compuestos de polifosfaceno representados por la siguiente fórmula química 1.

[Fórmula química 1]

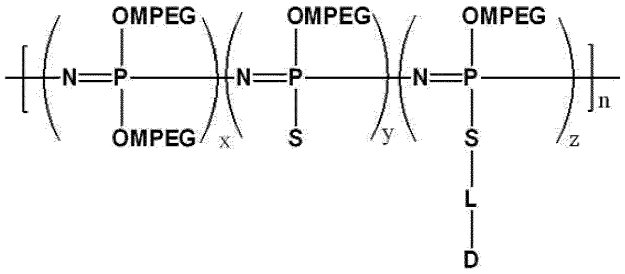


donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino -butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; l es igual a 0 ~0,9; m es igual a 0,1 ~1 y l + m es igual a 1.

Los compuestos de polifosfaceno mencionados anteriormente de la presente invención implican una lisina hidrófila y multifuncional o un oligopéptido hidrófilo que contiene lisina como grupo lateral junto con el MPEG hidrófilo como otro grupo lateral que exhibe una temperatura inferior de solución crítica (LCST) de más de 100°C, que está muy por encima de la temperatura corporal en contraste con los polifosfacenos anfifílicos convencionales que muestran una LCST mucho más baja cerca de la temperatura corporal. Además, los compuestos de polifosfaceno de la presente invención exhiben una vida media en sangre notablemente prolongada con una toxicidad sistémica más baja, y más sorprendente es que los compuestos de polifosfaceno en sí mismos muestran claramente altas propiedades de focalización tumoral probablemente debido a sus propiedades catiónicas y a la circulación sanguínea prolongada a pesar de sus pequeños tamaños de partícula (diámetro medio <6 nm). El ejemplo representativo de un oligopéptido hidrofílico es la glicil lisina.

La presente invención también proporciona los productos conjugados de fármacos polifosfaceno-anticancerígenos representados por la siguiente fórmula química 2.

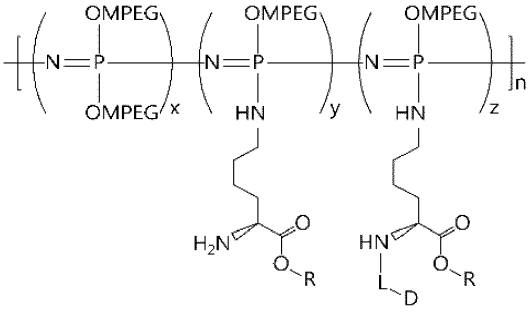
[Fórmula química 2]



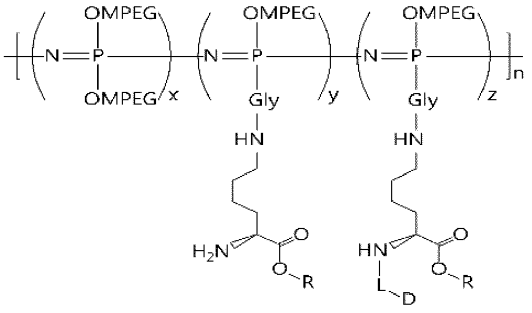
donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; L es un enlazador para conectar el grupo espaciador del polímero y la molécula D del fármaco que lleva un grupo hidroxilo o amina; x e y están independientemente en el intervalo de 0 ~ 0,5; z está en el intervalo de 0 ~ 1; y x + y + z = 1.

Para la realización de la presente invención, S representa lisina o un dipéptido o tripéptido que contiene lisina pero no está limitado a los mismos. Para otra realización de la presente invención, S representa un amino-etanol y amino-propanol pero no está limitado a los mismos. Se desea que la molécula de fármaco D sea agentes anticancerígenos hidrófobos tales como docetaxel, paclitaxel, camptotecina y (trans- (±)-1,2-diaminociclohexano)platino(II) pero no está limitada a los mismos. La realización de la presente invención según la fórmula química 2 mencionada anteriormente puede estar representada por una de las siguientes fórmulas químicas 3 a 5.

[Fórmula química 3]

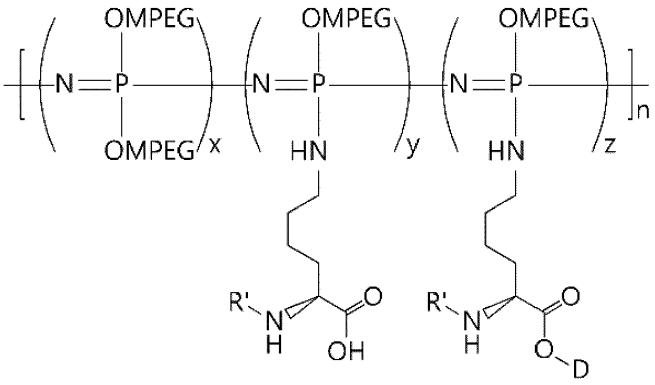


[Fórmula química 4]



En las fórmulas químicas 3 y 4, n es independientemente un número entero de 3 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; D representa docetaxel, paclitaxel, camptotecina o (trans-(±)-1,2-diaminociclohexano)platino(II); R es un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico C_{1-6} u OCH_2Bz; x e y están independientemente en el intervalo de 0 a 0,5; z es mayor que 0 y menor que 1,0; x + y + z = 1.

[Fórmula química 5]



Donde n es un número entero de 3 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; D representa docetaxel, paclitaxel o camptotecina; R' representa t-Boc o CBZ; x e y están independientemente en el intervalo de 0 a 0,5; z es mayor que 0 y menor que 1,0; x + y + z = 1.

Los componentes constitucionales de la presente invención se explican a continuación.

[Compuestos vehículos de polifosfaceno]

Los compuestos de polifosfaceno vehículos de fármacos de la presente invención son un polímero híbrido inorgánico/orgánico único compuesto por una cadena principal de polímero inorgánico que consiste en átomos de nitrógeno y fósforo alternos, injertados con dos grupos orgánicos, un poli(etilenglicol) hidrófilo para la circulación sanguínea prolongada y otro hidrófilo. lisina multifuncional, oligopéptido que contiene lisina o amino-alcohol lineal como grupo espacial para la conjugación con fármacos anticancerígenos hidrófobos. Los presentes inventores han descubierto que el grupo de la lisina o los péptidos que contienen lisina injertados en la cadena principal de polifosfaceno pueden proporcionar propiedades catiónicas de los compuestos de polifosfaceno dependiendo del valor de pKa del aminoácido, que puede controlarse mediante el aminoácido empleado como grupo espaciador. El poli(etilenglicol) empleado en esta invención es metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular en el intervalo de 300 ~2000 y su contenido está determinado por su relación molar con respecto al grupo espacial determinado por x, y y x según las propiedades requeridas, tales como la solubilidad, la morfología y la biodegradabilidad del fármaco producto conjugado final. El peso molecular de los compuestos de polifosfaceno puede controlarse por el número de unidades repetitivas n pero también por el peso molecular del PEG. En comparación con los polímeros orgánicos lineales ramificados, los compuestos de polifosfaceno lineal con dos grupos secundarios orgánicos de la presente invención tienen un peso molecular más alto, pero un volumen de hidratación menor, lo que da como resultado una densidad atómica más alta y una mejor selectividad tumoral.

[Fármacos anticancerígeno]

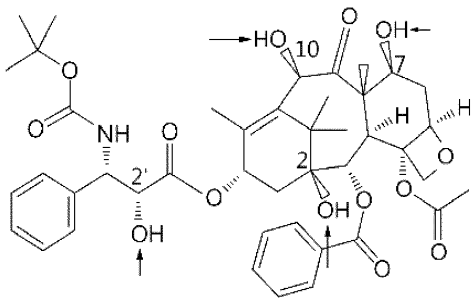
El componente de fármaco activo anticancerígeno a conjugar con los compuestos de polifosfaceno ramificado de la presente invención debe tener al menos un grupo funcional de hidroxilo (OH^-) o amina (NH_2) y, de forma más deseable, fármacos anticancerígenos hidrofóbicos como taxanos, camptotecina y fármacos de platino (II), pero no se limita a los mismos. Además de estos fármacos anticancerígenos moleculares pequeños, cualquier molécula de fármaco anticancerígeno que lleve al menos un grupo funcional hidroxilo o amina puede conjugarse con los presentes polímeros vehículos de polifosfaceno usando un sistema espaciador y enlazador apropiado empleado en la presente invención. Se demostrará que los ejemplos de la presente invención muestran dos tipos de fármacos anticancerígenos que exhiben una reactividad disminuida por impedimento estérico.

Los compuestos conjugados de polifosfaceno-taxano mencionados anteriormente preparados por conjugación química de las moléculas de fármaco de taxano hidrofóbico con el polímero vehículo de polifosfaceno hidrófilo son una nueva clase de profármaco polimérico para inyección intravenosa, y su peso molecular puede controlarse de 3000 a 300.000 Da, pero hemos descubierto que la fracción de 30.000 a 100.000 Da era óptima para la biocompatibilidad y eficacia de los fármacos conjugados. Los polímeros vehículos de polifosfaceno hidrófilos de la presente invención no pueden formar micelas poliméricas en medios acuosos, pero se encontró que su producto conjugado unido químicamente por moléculas de taxano hidrofóbico se autoensamblan en micelas poliméricas fuertes con un diámetro medio en el intervalo de 20-100 nm, que exhiben propiedades sobresalientes de focalización tumoral por efecto EPR junto con una circulación sanguínea prolongada debido a la capa externa de PEG de las micelas, como se mencionó anteriormente. Finalmente, para la máxima eficacia del fármaco junto con la mínima toxicidad sistémica del producto conjugado de polifosfaceno-taxano, se empleó un enlazador escindible con ácido (pH = 4-7), aconítico anhídrido para unir las moléculas de taxano del componente del fármaco anticancerígeno al polifosfaceno vehículo de manera que las moléculas de fármaco taxano fuertemente citotóxicas no se liberan significativamente del producto conjugado de

polifosfaceno-taxano durante su circulación en el sistema sanguíneo neutro (pH = 7,2), sino que se liberan fácilmente en el sitio del tumor que se encuentra en el microambiente ácido del tumor.

La molécula del fármaco docetaxel, como se muestra en la siguiente fórmula química 6, tiene cuatro grupos hidroxilo en las posiciones 2, 7, 10 y 2', pero se sabe que el grupo hidroxilo 2' es el más activo y, por lo tanto, la molécula del fármaco estaba unida al grupo de ácido carboxílico del enlazador aconítico anhídrido por esterificación para hacer un precursor, que a continuación reacciona para formar un enlace amida con el grupo amina del aminoácido del grupo espaciador o amino-etanol del polímero vehículo de polifosfaceno. En el caso de paclitaxel, se puede aplicar el mismo esquema de reacción. Debería señalarse aquí dos razones importantes para el empleo de un aconítico anhídrido multifuncional como un enlazador para la conjugación de moléculas de fármaco taxano con los compuestos de polifosfaceno de la presente invención. Es bien sabido que cuando se introducen moléculas de fármaco estéricamente impedidas para la conjugación a los vehículos de fármacos poliméricos por esterificación, el rendimiento del producto no solo es muy bajo, sino que también pueden resultar isómeros estéricamente diferentes. En el estudio preliminar se descubrió que cuando se introdujo docetaxel directamente en el aconítico anhídrido unido a los polímeros vehículos de polifosfaceno, no solo se requirió un tiempo de reacción prolongado de más de 24 horas, sino que también se obtuvieron algunos isómeros estéricamente diferentes. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que cuando el docetaxel se hizo reaccionar primero con el enlazador aconítico anhídrido para preparar un precursor, que se hizo reaccionar con los polímeros vehículos de polifosfaceno de la presente invención, se pudieron lograr tanto un alto rendimiento del producto como la pureza del producto conjugado final de polifosfaceno-docetaxel.

[Fórmula química 6]



La presente invención implica series de camptotecina de los siguientes compuestos ejemplificados, pero no se limita a los mismos, incluidos todos los derivados farmacéuticamente activos, particularmente irinotecan, topotecan y belotecan.

[Espaciador (S)]

En la presente invención, se introduce un grupo espacial multifuncional en el polímero vehículo de polifosfaceno para conectarlo químicamente al aconítico anhídrido enlazador para la conjugación con fármacos anticancerígenos. El grupo espaciador debe contener un grupo de amina primaria para conectarse al grupo enlazador mencionado anteriormente y otro grupo de amina o alcohol primario para injertar en la cadena principal de polifosfaceno y es uno seleccionado de los grupos de aminoácidos multifuncionales de lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, y estos aminoácidos que contienen oligopéptidos o amino-alcoholes lineales. Los aminoácidos mencionados anteriormente se clasifican como aminoácidos básicos, y cuando dicho aminoácido básico se introduce en la cadena principal de polifosfaceno, se pueden proporcionar propiedades catiónicas a los compuestos de polifosfaceno en un intervalo de pH específico dependiendo de su valor de pKa del aminoácido. El grupo espacial puede ser no solo un aminoácido único sino también una combinación de más de dos aminoácidos. Por ejemplo, se puede emplear glicil lisina (Gli-Lis), alanil lisina (Ala-Lis) o un tripéptido. Además, para un determinado aminoácido o péptido multifuncional, el grupo éster carboxílico puede hidrolizarse para conjugación directa con moléculas de fármaco sin enlazador. Tal ejemplo representativo es la lisina, que se ilustrará en los Ejemplos.

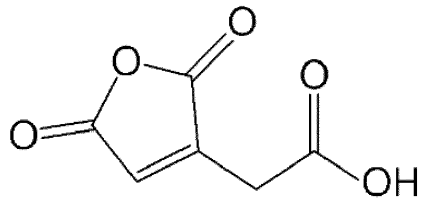
[Enlazador]

Es bien sabido que la eficacia del fármaco de los conjugados poliméricos del fármaco es críticamente dependiente de la cinética de liberación de las moléculas activas del fármaco del vehículo polimérico. En la presente invención, las moléculas activas del fármaco se conjugaron con los polímeros vehículos de polifosfaceno mediante unión amida (-CONH-) o unión éster (-COO-) mediante selecciones apropiadas del grupo espacial y el aconítico anhídrido del enlazador dependiendo de las estructuras moleculares de sistemas de fármacos y vehículos, que es diferente del procedimiento convencional útil solo para las moléculas de fármacos que llevan un grupo de amina primaria. Así, la presente invención proporciona un nuevo y mejorado sistema espaciador-enlazador para la introducción de un enlazador escindible con ácido para la conjugación de fármacos.

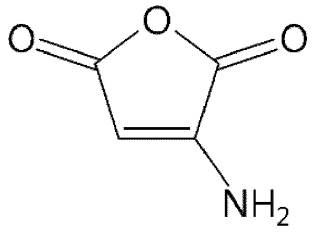
Las reacciones de conjugación mencionadas anteriormente pueden realizarse en condiciones generales de reacción de acoplamiento en cualquier solvente orgánico inerte a las reacciones de conjugación que incluyen diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, 1,4-dioxano, dimetilformamida y tetrahirofurano. Sin embargo, debido a la inestabilidad de los productos intermedios de reacción que se formarán durante la introducción del enlazador, todas las reacciones se realizaron en disolventes secos y bajo atmósfera de argón seco a baja temperatura (-10 ~0°C) para aumentar la eficiencia de la reacción. En particular, el enlazador *cis*-aconítico anhídrido se sabe que experimenta su reacción de apertura del anillo anhídrido en solución básica, dando como resultado isómeros, y por lo tanto, en lugar del catalizador básico DMAP (dimetilaminopiridina), DPTS (dimetilaminopiridina/ácido p-toluenosulfónico) se empleó como catalizador para realizar la reacción en estado neutral. Los fármacos representativos apropiados para la preparación de los compuestos conjugados de polifosfaceno son oligopéptidos, polipéptidos, fármacos monoméricos, anticuerpos, nucleótidos, lípidos y cualquier otro material que contenga -OH o NH_2 grupo funcional.

Los enlazadores utilizables en la presente invención se enumeran en la siguiente fórmula química 7 a 11, pero la fórmula química 7 es la más preferida.

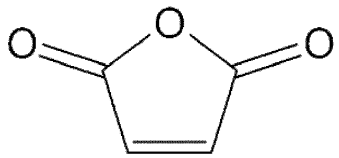
[Fórmula química 7]



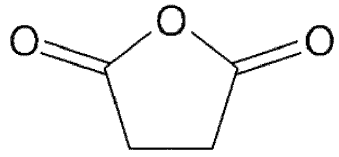
[Fórmula química 8]



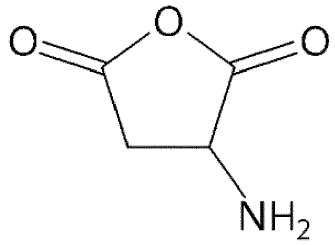
[Fórmula química 9]



[Fórmula química 10]

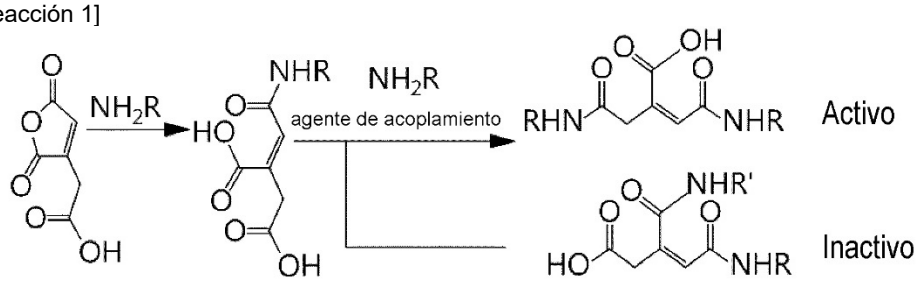


[Fórmula química 11]



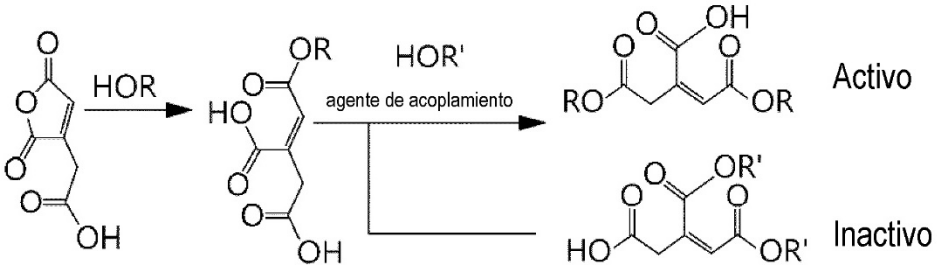
En caso de aconítico anhídrido escindible con ácido (pH = 5,5) de la fórmula química anterior 7 empleada como un enlazador, los fármacos conjugados de polímero pueden prepararse según el siguiente esquema de reacción 1.

[Esquema de reacción 1]



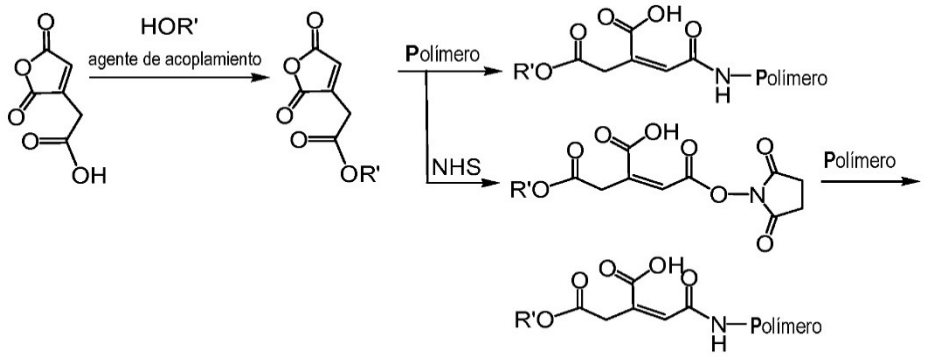
Sin embargo, en este esquema de reacción se forma un isómero inactivo incapaz de liberar el resto del fármaco, y dependiendo del sitio de conjugación, la velocidad de liberación del fármaco y la eficacia del fármaco son difíciles de controlar. En particular, en caso de que los enlaces espaciador/enlazador y enlazador/fármaco sean enlaces amida, se puede formar un isómero (esquema de reacción 1 inactivo) difícil de liberar moléculas del fármaco por hidrólisis, lo que da como resultado una baja eficacia del fármaco. En el caso de que el esquema de reacción 2 muestre que ambos enlaces espaciador/enlazador y enlazador/fármaco son enlaces éster, también puede producirse una forma inactiva, aunque la hidrólisis por enzimas puede ser viable. Además, en el caso de que el anillo anhídrido se abra usando el grupo OH de la molécula del fármaco, el agente nucleofílico debe usarse en un gran exceso, particularmente para el fármaco con impedimento estérico. En el caso de los fármacos taxanos de la presente invención, se requirió aproximadamente un exceso de 20 veces para completar la reacción. En tal caso, se encontró que el rendimiento del producto del producto conjugado final de polifosfaceno-fármaco era inferior al 5%, lo que no es comercialmente factible.

[Esquema de reacción 2]



En contraste con los esquemas de reacción 1 y 2 anteriores que parten de la reacción de apertura del anillo aconítico anhídrido, el siguiente esquema de reacción 3 descubierto en la presente invención muestra que en lugar de la reacción de apertura del anillo aconítico anhídrido, su grupo carboxílico reaccionó con el grupo hidroxilo de una molécula de fármaco (HOR') para formar un enlace éster que produce un precursor de fármaco. Este precursor se conjugó a continuación con el polímero vehículo del fármaco (RNH_2) mediante la reacción de apertura del anillo anhídrido usando el grupo amina espaciador del polímero vehículo. La reacción de apertura del anillo aconítico anhídrido también se puede realizar usando un exceso de NHS (N-hidroxisuccinimida) como se muestra en el esquema de reacción anterior. Esta ruta sintética ofrece importantes ventajas sobre los procedimientos mencionados anteriormente. En primer lugar, se pueden evitar los isómeros inactivos que se muestran en los esquemas de reacción 1 y 2 anteriores, lo que da como resultado un rendimiento mucho mayor del fármaco conjugado final, y la pureza del fármaco conjugado, así como la eficacia del fármaco podrían controlarse razonablemente.

[Esquema de reacción 3]



La presente invención también proporciona procedimientos sintéticos detallados de los compuestos de polifosfaceno lineales y compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco. A este respecto, se demostrarán los ejemplos concretos de los grupos de fármaco, espaciador y enlazador, pero la presente invención no se limita a tales ejemplos.

Los compuestos lineales de polifosfaceno de la presente invención se sintetizan injertando un poli(etilenglicol) (PEG) hidrófilo y una lisina multifuncional que tiene dos grupos amina primaria y un grupo carboxilo, oligopéptidos que contienen lisina o amino-etanol a la cadena principal de diclorofosfaceno (-N=PCl_2-). La lisina multifuncional, los oligopéptidos que contienen lisina o el amino-alcohol lineal de los compuestos de polifosfaceno preparados de esta manera pueden usarse como un grupo espacial para conjugarse con fármacos anticancerígenos hidrófobos como taxano, complejo de platino(II) o camptotecina usando un enlazador tal como aconítico anhídrido para producir nuevos conjugados de polifosfaceno-fármaco lineales escindibles con ácido.

Los compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco lineales de la presente invención exhibieron una selectividad tumoral sobresaliente por acumulación selectiva en el tejido tumoral, y se descubrió que controlando el valor x, y y z de la fórmula química 2 mencionada anteriormente, altamente soluble en agua, podrían prepararse fármacos anticancerígenos largamente circulantes en la sangre y con excelente focalización en tumores.

En la presente invención, el grupo espaciador seleccionado entre los oligopéptidos que contienen lisina, arginina, glutamina, asparagina o tirosina mencionados anteriormente es deseablemente oligopéptido que contiene lisina y glicina, por ejemplo, dipéptido y tripéptido y más deseablemente glicilisina, pero no está limitado a los mismos. En los oligopéptidos mencionados anteriormente, se desea que la lisina se ubique en la posición terminal para conjugarse con el fármaco anticancerígeno de taxano. El grupo espacial seleccionado de los amino-alcoholes lineales es deseablemente amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol y aminoheanol, y más deseablemente amino-etanol y amino-propanol.

En la presente invención, las moléculas de fármaco anticancerígeno de taxano (D) se conjugan con el polímero vehículo de polifosfaceno a través del grupo lisina amina o carboxilo, y en caso de que el grupo carboxilo se use para la conjugación, el grupo amina debe bloquearse mediante un grupo de bloqueo tal como t-Boc, FMOC o CBZ. En la fórmula química 2 mencionada anteriormente, L es un enlazador para conectar el fármaco anticancerígeno (D) y el grupo espaciador del polímero vehículo (S) y es anhídrido cis-aconítico, anhídrido succinílico o anhídrido maleico y deseablemente anhídrido cis-aconítico . Los componentes del fármaco anticancerígeno (D) ejemplificados en la presente invención son la familia de taxanos, la familia de camptotecina y los complejos de platino que incluyen docetaxel, paclitaxel, camptotecina, topotecan, irinotecan, belotecan, oxaliplatino, pero no se limita a estos fármacos.

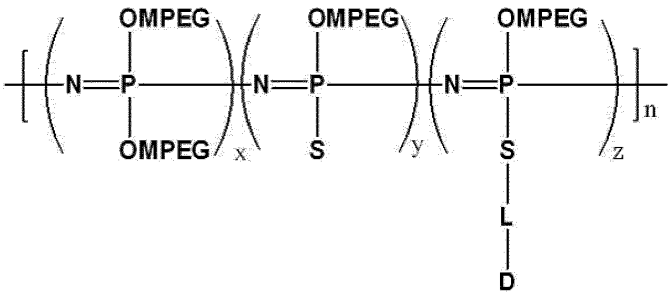
Los conjugados de polifosfaceno-fármaco de la presente invención tienen una distribución estrecha de peso molecular en el intervalo de 3.000 - 300.000 y deseablemente en el intervalo de 30.000 - 100.000 y son altamente solubles en agua al autoensamblarse en micelas poliméricas con un diámetro medio en el intervalo de 20 ~200 nm dependiendo de la hidrofobicidad de las moléculas del fármaco (D). Como se mencionó anteriormente, tales micelas poliméricas ensambladas a partir de los conjugados de fármaco-polifosfaceno de la presente invención exhiben una excelente selectividad tumoral atribuida a su efecto EPR.

Los compuestos conjugados de polifosfaceno y polifosfaceno-taxano se pueden preparar mediante las siguientes reacciones sintéticas de cuatro etapas.

(a) El material de partida hexaclorociclotrifosfaceno se convierte por polimerización térmica en poli(diclorofosfaceno) lineal, (N = PCl_2)$_n$, que a continuación reacciona con sal de sodio de poli(etilenglicol) para obtener un polifosfaceno intermedio, [N=PCl(MPEG)] n;

(b) El producto intermedio de polifosfaceno anterior se hace reaccionar con uno seleccionado del grupo que consiste en éster de lisina, oligopéptido que contiene lisina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, aminopenanol y amino-hexanol para preparar polímeros vehículos de polifosfaceno catiónico hidrófilo;
(c) Un fármaco anticancerígeno que contiene hidroxilo (OH) o amina primaria (NH_2) el grupo reacciona con un grupo enlazador, por ejemplo, aconítico anhídrido, para preparar un precursor; y
(d) Finalmente, el precursor de la etapa (c) se hace reaccionar con el polímero vehículo de polifosfaceno de la etapa (e) para obtener el compuesto conjugado de polifosfaceno final de fórmula química 2.

[Fórmula química 2]



donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metil poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; L es un enlazador para conectar el grupo espaciador del polímero y la molécula D del fármaco que lleva un grupo hidroxilo o amina; x e y están independientemente en el intervalo de 0 ~ 0.5; z está en el intervalo de 0 ~ 1; y x + y + z = 1.

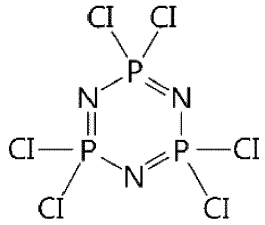
En otra realización de la presente invención, el fármaco anticancerígeno que contiene hidroxilo (OH) o amina primaria (NH_2) puede ser uno seleccionado del grupo de docetaxel, paclitaxel, camptotecina y (trans-(±)-1,2-diaminociclohexano)platino(II), pero no se limita a estos fármacos.
Además, las cuatro reacciones escalonadas mencionadas anteriormente para preparar conjugados de polifosfaceno-fármaco pueden someterse a una pequeña modificación dependiendo de la estructura de las moléculas de fármaco a conjugar. Por ejemplo, en el caso del complejo de platino(II), en lugar de la preparación del precursor por reacción de un fármaco con el enlazador en la etapa (c) seguido de la reacción del precursor al vehículo polimérico en la etapa (d), el grupo enlazador se hace reaccionar al vehículo polímero en la etapa (c), y a continuación el fármaco se une al grupo enlazador conectado al polímero vehículo en la etapa (D).

Todos los siguientes procedimientos de reacción sintética deben realizarse bajo atmósfera inerte cuidadosamente controlada utilizando argón o nitrógeno seco y solventes completamente secos. Los procedimientos sintéticos detallados se describen a continuación.

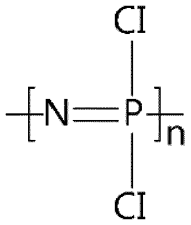
Etapa (a)

Hexaclorociclotrifosfaceno, $(N=PCl_2)_3$, que se muestra en la fórmula química 12, se sometió a polimerización térmica según el procedimiento de la bibliografía (Youn Soo Sohn y col. Macromolecules, 1995, 28, 7566) para obtener poli(diclorofosfaceno) $(N=PCl_2)_n$ con un peso molecular promedio de 10^4~10^5 como se representa en la fórmula química 13.

[Fórmula química 12]



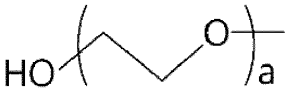
[Fórmula química 13]



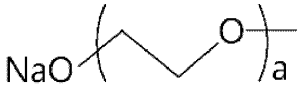
Donde n representa el grado de polimerización en el intervalo de 3 a 300.

El monometoxi poli(etilenglicol) de fórmula química 14 se secó usando una mezcla azeotrópica de tolueno y agua y a continuación reaccionó con metal de sodio para convertirlo en sal de sodio de fórmula química 15, que a continuación reaccionó con poli(diclorofosfaceno) de fórmula química 13 en presencia de trietilamina para completar la PEGilación de polifosfaceno de fórmula química 15.

[Fórmula química 14]



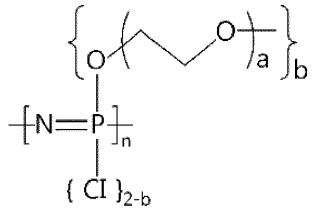
[Fórmula química 15]



En las fórmulas químicas anteriores 14 y 15 a es el grado de polimerización de PEG y es de 7 a 22.

A continuación, se describe un procedimiento más detallado para la preparación de polifosfaceno PEGilado. El hexaclorociclotrifosfaceno $(N=PCl_2)_3$ de fórmula química 12 y cloruro de aluminio anhidro de 3 a 10% se mezclan homogéneamente en la caja de guantes y a continuación se sellan en un Pyrex de muestras al vacío. La muestra se calentó a 230 - 250ºC con rotación en una cámara de calentamiento durante 3 - 5 h para obtener un líquido viscoso transparente de poli(diclorofosfaceno). Mientras tanto, el monometoxi poli(etilenglicol) de fórmula química 14 se hace reaccionar con 1,2- 1,5 metal de sodio equivalente en un disolvente orgánico anhidro no reactivo, como tetrahidrofurano (THF), benceno y tolueno para obtener una sal de sodio de fórmula química 15. A una solución de un poli(diclorofosfaceno) molar de fórmula química 13 disuelta en el mismo disolvente se le añadieron 0,5 - 1,8 equivalentes de la sal de sodio de fórmula química 15 preparada anteriormente. El disolvente de la reacción puede ser cualquier disolvente no reactivo pero deseablemente tetrahidrofurano, benceno, tolueno y cloroformo. La solución de sal sódica de fórmula química 15 se debió agregar lentamente durante 2 a 8 h a la solución de poli(diclorofosfaceno) enfriada a menos de 0°C, y a continuación la mezcla de reacción se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 6 a 24 h para obtener producto intermedio polifosfaceno PEGilado de fórmula química 16.

[Fórmula química 16]

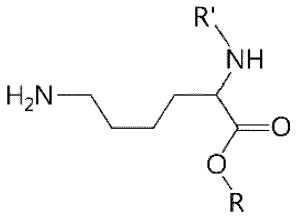


Donde n es el grado de polimerización de polifosfaceno en el intervalo de 3 a 300, a es el grado de polimerización de metoxi poli(etilenglicol) en el intervalo de 7 a 22, y b es la fracción molar sustituida de metoxi poli(etileno)glicol) en el intervalo de 0,5 a 1,8.

Etapa (b)

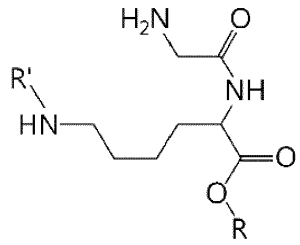
Para sustituir el resto (2-b) átomos de cloro del polifosfaceno PEGilado de fórmula química 16 con un grupo espacial para la conjugación del fármaco, 1,5 - 1,8 equivalentes de éster de lisina o éster de oligopéptido que contiene lisina disuelto junto con 6 equivalentes de trietilamina en cualquier disolvente orgánico no reactivo, deseablemente, se añade lentamente tetrahidrofurano, cloroformo o diclorometano a la solución intermedia de polifosfaceno PEGilado anterior de fórmula química 16 y a continuación se calienta a reflujo a 40 - 60ºC durante 12 h a 3 días. Como un éster de lisina se pueden usar los derivados de lisina de fórmula química 17 y como un éster de oligopéptido que contiene lisina se pueden usar los derivados de fórmula química 18. En la fórmula química, la glicina puede ser sustituida por leucina, isoleucina, fenilalanina y valina.

[Fórmula química 17]



Donde R es un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico C_{1-6}, o OCH_2Bz y R' es un grupo protector de amina, t-Boc (tert-butoxicarbonilo), Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo) o CBZ (carbozeniloxi).

[Fórmula química 18]

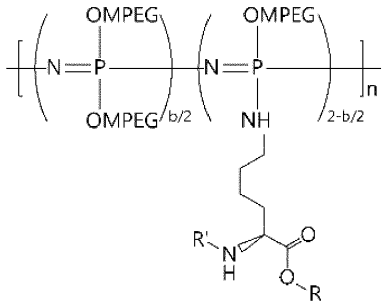


Donde R es un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico C_{1-6} grupo alquilo, o OCH_2Bz, y R' es un grupo protector de amina, t-Boc (tert-butoxicarbonilo), Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo) o CBZ (carbozeniloxi).

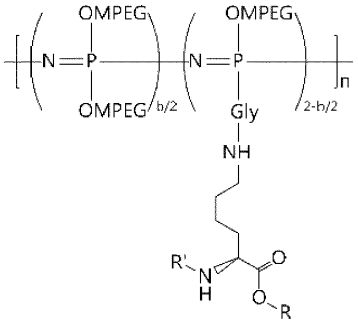
En la presente invención, R puede ser metilo, etilo, n-propilo, n-butilo o t-butilo, pero no está limitado a ellos.

La solución de reacción mencionada anteriormente se centrifugó o filtró para eliminar el precipitado del subproducto (Et_3NHCl o NaCl) y el filtrado se sometió a concentración. Se añadió etanol al concentrado seguido de concentración al vacío para eliminar completamente los disolventes orgánicos. El producto oleoso se disolvió en una pequeña cantidad de etanol (100 ml) y a continuación se añadió una gran cantidad de agua (900 ml) para recristalización a baja temperatura, y a continuación se sometió a ultrafiltración de membrana usando membranas con diferentes tamaños de poro para fraccionar los polímeros en peso molecular de 50.000 a 100.000. La solución de polifosfaceno fraccionado se sometió a liofilización para obtener compuestos de polifosfaceno de fórmula química 19 y fórmula química 20 con un rendimiento de aproximadamente 40 - 50%.

[Fórmula química 19]



[Fórmula química 20]



En las fórmulas químicas 19 y 20, n es el grado de polimerización de polifosfacenos que varía de 3 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; b tiene un valor de 0,5 - 1,8; R es un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico C_{1-6}, o OCH_2Bz; y R' es un grupo protector de amina, t-Boc (tert-butoxicarbonilo), Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo) o CBZ (carbozeniloxi).

Etapa (c)

No es difícil conjugar una molécula de fármaco con un grupo funcional con los compuestos de polifosfaceno que llevan un grupo espacial multifuncional preparado en la Etapa (b), pero no es fácil conjugar una molécula de fármaco que tiene grupos multifuncionales como el taxano al polímero vehículo polifosfaceno multifuncional en un modo de unión deseado que sea clínicamente útil. En otras palabras, se requiere que el producto conjugado fármaco-polifosfaceno anticancerígeno exhiba fuertes propiedades de focalización tumoral y cinética de liberación del fármaco, además de propiedades fisicoquímicas satisfactorias. En particular, se sabe que la cinética de liberación del fármaco del producto conjugado polimérico es críticamente importante para la eficacia del fármaco y, por lo tanto, el papel del enlazador de la presente invención es muy importante. En concreto, el grupo enlazador no solo debería poder conectar fácilmente el grupo funcional de la molécula del fármaco (OH, NH_2) a los grupos funcionales del polímero vehículo de polifosfaceno (COOH, NH_2), sino que también puede permitir que el fármaco conjugado libere fácilmente moléculas de fármaco en el sitio del tumor focalizado.

Se ha descubierto en la presente invención que *cis*-aconítico anhídrido de fórmula química 7 es el mejor enlazador para la conjugación de taxano con el polímero vehículo de polifosfaceno en ambos aspectos de la cinética sintética y de liberación de fármacos, particularmente cuando el enlazador reacciona primero con taxano para preparar un precursor, que a continuación se une al grupo espacial de polifosfacenos. El precursor del fármaco de taxano se prepara de la manera siguiente.

Docetaxel (1,0 mmol, 803 mg) y *cis*-aconítico ácido anhídrido (2,0 mmol, 312 mg) se mezclan en atmósfera de argón y se disuelven en THF o diclorometano. La solución mezclada se enfría hasta el punto de congelación y a continuación DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida) (2,0 mmol, 0,252 g) y DPTS (4-(N,N'-dimetilamino)piridinio-4-toluenosulfonato) (2,0 mmol, 0,58 g) se agregan para realizar la reacción de esterificación entre el grupo ácido carboxílico del ácido aconítico enlazador y el grupo 2'-hidroxi de docetaxel durante 12 h. Después de confirmar la finalización de la reacción por TLC, se agregan cantidades en exceso de NHS (N-hidroxisuccinimida) y DIPEA (diisopropiletilamina) para abrir el anillo anhídrido del ácido aconítico sin reaccionar. Se sabe que el anillo aconítico anhídrido se abre fácilmente mediante un grupo hidroxilo y amina en solución básica. Después de agitar durante 12 h, la mezcla de reacción se enfría a 0ºC durante 3 h, y a continuación se filtra al vacío para eliminar el precipitado. El filtrado se somete a destilación al vacío para eliminar todos los disolventes orgánicos para obtener una mezcla oleosa, que se disuelve en etanol (50 ml). Se agrega una gran cantidad en exceso de agua (500 ml) a esta solución de etanol para recristalización durante 3 h en

el refrigerador. El líquido sobrenadante se elimina para obtener un producto aceitoso que se disuelve completamente en 300 ml de diclorometano. Esta solución de diclorometano se lava con solución de sal saturada tres veces y a continuación la capa orgánica recogida se seca con $NaHCO_3$ anhidro y a continuación se sometió a evaporación al vacío para obtener el precursor con un rendimiento del 95%.

Etapa (d)

Para el polímero vehículo polifosfaceno mencionado anteriormente preparado en la etapa (b), se conjuga un fármaco anticancerígeno hidrófobo tal como taxano para obtener un nuevo producto conjugado de polifosfaceno-taxano representado por la fórmula química 2. Hay dos formas diferentes de conjugar las moléculas de taxano con el polímero vehículo de polifosfaceno: una es que la molécula de taxano está unida por medio del ácido aconítico a la lisina amina del vehículo de polifosfaceno por unión amida y otra es la esterificación del grupo carboxilo de lisina del vehículo de polifosfaceno con grupo 2'-hidroxilo de la molécula de taxano. Por lo tanto, la etapa (d) se realiza en dos procedimientos diferentes.

En el procedimiento de unión amida, el grupo protector (t-Boc) del polímero vehículo de polifosfaceno mencionado anteriormente de fórmula química 19 o fórmula química 20 debe eliminarse por reacción con una mezcla de ácido trifluoroacético y cloruro de metileno (2:1) por 6 h seguido de neutralización, lavado con agua y a continuación liofilización. Tal polímero vehículo de polifosfaceno no bloqueado se hace reaccionar durante 12 h con un precursor de fármaco, taxano-NHS aconítico (N-hidroxisuccinimidilo) preparado por reacción del aconítico anhídrido enlazador con el fármaco tal como taxano seguido de la adición de exceso de NHS (N-hidroxisuccinimida) y DIPEA (diisopropiletilamina). La mezcla de reacción resultante se somete a evaporación al vacío para concentración durante 12 h y a continuación se disuelve en etanol. La solución final se somete a evaporación al vacío (37°C, 5 mm bar) para eliminar todo rastro de solventes y DIPEA. El producto residual de polímero conjugado se disuelve en 50 ml de etanol y a continuación se agregan 950 ml de agua destilada a la solución de etanol para recristalización en el refrigerador. Después de 3 h, la mezcla de la solución se filtra al vacío para recoger el producto conjugado de polímero final, que se lava varias veces con solución de etanol al 30% y a continuación agua destilada usando ultramembrana hasta que se detecta menos del 0,1% de taxano sin reaccionar por espectroscopía UV. La solución conjugada de polifosfaceno-taxano purificada se liofiliza para obtener el producto final de fórmula química 3 o 4.

En el procedimiento de unión de éster, el éster de lisina terminal del grupo espaciador del polímero vehículo de polifosfaceno se puede hidrolizar a la forma de ácido carboxílico usando un álcali y a continuación se puede realizar la esterificación con el grupo 2'-hidroxilo de taxano. Por ejemplo, el polímero vehículo de polifosfaceno de fórmula química 19 se disuelve en metanol y a continuación una cantidad en exceso de KOH o NaOH (150 ~ 200%) se agrega a la misma para obtener la sal de potasio o sodio de lisina del polímero vehículo. El disolvente de metanol se elimina por evaporación al vacío y la sal metálica resultante se disuelve en agua destilada (100 ml). Se agrega cloruro de metileno o cloroformo (300 ml) a esta solución, que se acidifica mediante la adición lenta de un ácido orgánico. Cuando el pH de la capa de agua se reduce a 4 - 3, el polímero vehículo de polifosfaceno en forma ácida se extrae en la capa orgánica agitando las dos capas de disolvente. Dicho procedimiento de extracción se repite tres veces y la solución de capa orgánica recogida se seca con bicarbonato de sodio anhidro. La filtración y la evaporación al vacío de la solución seca da un vehículo de polímero de polifosfaceno con un grupo terminal de lisina hidrolizada. El polímero vehículo de polifosfaceno resultante que lleva lisina hidrolizada y docetaxel equivalente se disuelven en tetrahidrofurano y a continuación se añaden N,N'diciclohexilcarbodiimida y trietilamina para la reacción de esterificación. La finalización de la reacción se confirma por TLC usando una mezcla de solvente ($CHCl_3$: $MeOH_3$ = 10:1), y a continuación la mezcla de reacción se somete a destilación al vacío para concentrar la mezcla de reacción, seguido por fraccionamiento en ultramembrana de peso molecular de 30 a 100 kDa del producto conjugado final de polifosfaceno-docetaxel de fórmula química 5.

En lo sucesivo, la constitución y la acción de la presente invención se describirán con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y demostraciones, pero la presente invención no se limita a los mismos. En los siguientes ejemplos, el análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno para los compuestos de la presente invención se realizó usando el analizador Perkin-Elmer C, H y N. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y nitrógeno se midieron usando el espectrómetro de RMN Varian Gemini-500. Las distribuciones del tamaño de partícula de los polímeros vehículos de polifosfaceno y sus conjugados de fármacos se midieron usando Malvern Zeta-sizer (Nano-ZS).

Modo de la invención

Síntesis de compuestos de polifosfaceno (sistemas de administración de fármacos)

Ejemplo 1. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,5}(LisEt)_{0,5}]_n$

Hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 11,54 g, 100 mmol) y cloruro de aluminio anhidro ($AlCl_3$, 7,5% en peso) se mezclan homogéneamente en la caja de guantes y a continuación se someten a polimerización térmica a 250°C durante 5 h según el procedimiento de la bibliografía (Sohn Y. S. y col. Macromolecules 1995, 28, 7566) para obtener poli(diclorofosfaceno) ($[NPCl_2]_n$) Mientras tanto, se hace reaccionar metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular

promedio de 550 (MPEG550) (82,5 g, 150 mmol) con sodio metálico (4,9 g, 200.4 mmol) a 120°C durante 6 h en solvente de tolueno seco bajo atmósfera de argón para obtener sal de sodio de MPEG550. Al poli(diclorofosfaceno) anterior disuelto en tetrahidrofurano (100 ml) en un recipiente de vidrio se agrega lentamente durante 60 minutos la solución de sal sódica de MPEG550 preparada en baño de hielo (0°C). Después de 1 h, se retira el baño de hielo y a continuación la mezcla de reacción se somete a reacción adicional a temperatura ambiente durante 12 h para obtener una solución intermedia de polifosfaceno PEGilado. En un recipiente separado, se agrega lentamente éster etílico de Boc-lisina (N-Boc-LisEt, 20,5 g, 75,0 mmol) neutralizado por trimetilamina seca en cloroformo seco (200 ml) a la solución intermedia de polifosfaceno PEGilado anterior y la mezcla de reacción se hace reaccionar adicionalmente a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se filtra para eliminar los precipitados de subproductos resultantes ($NEt_3 \cdot HCl$ o NaCl) y el filtrado se somete a evaporación al vacío para concentrar la solución, que se disuelve en etanol seguido de evaporación al vacío. Finalmente, el residuo se disuelve en agua destilada, que se filtra para eliminar cualquier material insoluble, y el filtrado se somete a diálisis usando ultra membrana (CE, MWCO = 3000) para eliminar la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da. El polímero de polifosfaceno fraccionado se lava con agua destilada más de 5 veces y a continuación se liofiliza. El polímero de polifosfaceno resultante se disuelve en una solución de diclorometano (200 ml) que contiene ácido trifluoroacético al 30% (v/v), que se agita durante 6 h para eliminar el grupo de bloqueo (t-Boc) del polímero para obtener el polímero de polifosfaceno desbloqueado $[NP(MPEG550)_{1,5}(LisEt)_{0,5}]_n$ con un rendimiento del 65% (3,37 g). Después de confirmar la lisina amina no bloqueada por RMN de protones, la solución de polímero se neutralizó con tri-etil amina, seguido de destilación al vacío para eliminar el disolvente orgánico. Al polímero resultante se le añadió una solución acuosa de bicarbonato de sodio para disolver el polímero por completo, que se desaló y a continuación se fraccionó usando ultramembranas con corte de peso molecular a 3k Da, 30 k Da, 100 k Da. El rendimiento global de recuperación fue del 90%. Composición: $C_{83}H_{170}N_4O_{41}P_2$ Datos de análisis elemental (%): C (51,66); H (8,59); N (2,83). Valor teórico: (51,33); H (8,82); N (2,88). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25(s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 2,49 (br, 1,00H, suucinil-CH_2), 2,90 (br, 1,00H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 4,50H, MPEG550-OCH_3), 3,65 (br, 66,0H, MPEG550-OCH_2CH_2), 4,4(s, 1H, Lisina-CH. Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 2. Síntesis de $[NP(MPEG750)_{1,5}(LisEt)_{0,5}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1, el producto deseado del compuesto de polifosfaceno del título se preparó usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 11,54 g, 100 mmol), metoxipoliol (etilenglicol) con un peso molecular promedio de 750 (MPEG750, 112,5 g, 150 mmol), trimetilamina (80,0 ml, 600 mmol) y Boc-LisEt, (20,5 g, 75 mmol) con un rendimiento del 74%. Composición: $C_{107}H_{218}N_4O_{53}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (51,30); H (8,99); N (2,36). Valor teórico: (52,01); H (8,89); N (2,27). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25 (s, 1,50H, Lis-OCH_2CH_3), 1,39-1,98 (br, 3,00H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 4,50H, MPEG750-OCH_3), 3,65 (br, 98,0H, MPEG750- OCH_2CH_2), 4,01(bs, 6H, MPEG750-CH_2), 4,45(m, 0,5H, Lis-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 3. Síntesis de $[NP(MPEG1000)_{1,5}(LisEt)_{0,5}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1, el producto deseado del compuesto de polifosfaceno del título se preparó usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 11,54 g, 100 mmol), metoxipoliol (etilenglicol) con un peso molecular promedio de 1000 (MPEG1000, 150 g, 150 mmol), trimetilamina (80,0 ml, 600 mmol) y Boc-LisEt, (20,5 g, 75 mmol) con un rendimiento del 74%. Composición: $C_{143}H_{290}N_4O_{71}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (53,01); H (8,70); N (2,36). Valor teórico: (52,62); H (8,96); N (1,72). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25(s, 1,50H, Lis-OCH_2CH_3),1,39-1,98 (br, 3,00H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 4,50H, MPEG1000-OCH_3), 3,65 (br, 130,0H, MPEG1000-OCH_2CH_2), 4,45(m, 0,5H, Lis-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 4. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,25}(LisEt)_{0,75}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1, el producto deseado del compuesto de polifosfaceno del título se preparó usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 11,54 g, 100 mmol), metoxipoliol (etilenglicol) con un peso molecular promedio de 550 (MPEG550, 69,0 g, 126 mmol), trimetilamina (80,0 ml, 600 mmol) y Boc-LisEt (27,4 g, 100 mmol)) con un rendimiento del 74%. Composición: $C_{74,5}H_{153}N_5O_{35,5}P_2$ Datos de análisis elemental (%): C (50,87); H (9,02); N (4,31). Valor teórico: (51,14); H (8,82); N (4,14). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25(s, 2,25H, Lis-OCH_2CH_3), 1,39-1,98 (br, 4,50H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1,5H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 3,75H, MPEG550-OCH_3), 3,65 (br, 82,5H, MPEG550-OCH_2CH_2), 4,45(m, 0,7H, Lis-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 5. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,0}(LisEt)_{1,0}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1, el producto deseado del compuesto de polifosfaceno del título se preparó usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 11,54 g, 130 mmol), metoxipoliol (etilenglicol) con un peso molecular promedio de 550 (MPEG550, 55,0g, 100 mmol), trimetilamina (80,0 ml, 600 mmol) y Boc-LisEt (35,6 g, 100 mmol)) con un rendimiento del 74%. Composición: $C_{66}H_{136}N_6O_{30}P_2$ Datos de análisis elemental (%): C (50,29); H (8,95); N (5,51). Valor teórico: (50,95); H (8,81); N (5,40). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25 (s, 3,00H, Lis-OCH_2CH_3), 1,39-1,98 (br, 6,00H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 2,0H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 3,0H, MPEG550-OCH_3), 3,65 (br, 66,0H, MPEG550-OCH_2CH_2), 4,45(m, 1,0H, Lis-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 6. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,5}(GliLisEt)_{0,5}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1, el producto deseado del compuesto de polifosfaceno del título se preparó usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 11,54 g, 100 mmol), metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular medio de 550 (MPEG550, 82,5 g, 150 mmol), trimetilamina (80,0 ml, 600 mmol) y Gli(N^{ε}-BocLisEt (24,8 g, 90 mmol) con 74% de rendimiento. Composición: $C_{85}H_{173}N_5O_{42}P_2$ Datos de análisis elemental (%): C (50,75); H (8,82); N (3,61). Valor teórico: (51,06); H (8,72); N (3,50). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25 (s, 3,00H, Lis-OCH_2CH_3), 1,39-1,98 (br, 6,00H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 2,0H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 3,0H, MPEG750-OCH_3), 3,65 (br, 66,0H, MPEG500-OCH_2CH_2), 3,92 (bs, 2H, Gli-CH_2), 4,45 (m, 1,0 H, Lis-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 7. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,5}(N^{\alpha}\text{-BocLis})_{0,5}]_n$

Según el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, la forma éster del compuesto de polifosfaceno del título, $[NP(MPEG550)_{1,5}(N^{\alpha}\text{-BocLisEt})_{0,5}]_n$ se preparó (rendimiento del 75%) usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 11,54 g, 100 mmol), metoxipoliol (etilenglicol) con un peso molecular promedio de 550 (MPEG550, 82,5 g, 150 mmol), trimetilamina (80,0 ml, 600 mmol) y N^{ε}-BocLisEt (20,5 g, 75 mmol). Este derivado sintético (10 g, 10 mmol) y NaOH (0,4 g, 10 mmol) se disolvieron en metanol y a continuación se sometieron a hidrólisis a temperatura ambiente durante 4 h. La hidrólisis completa se confirmó usando RMN de protones, y a continuación la solución se sometió a evaporación al vacío para obtener un polímero en estado sólido, que se disolvió en agua destilada y se acidificó a pH = 3 mediante ácido orgánico. Esta solución de polímero ácido se extrajo con cloroformo o diclorometano tres veces. La capa orgánica se secó usando bicarbonato de sodio anhidro y a continuación se sometió a evaporación al vacío para obtener el compuesto del título (95% de rendimiento). Composición: $C_{86}H_{174}N_4O_{43}P_2$ Datos de análisis elemental (%): C (51,02); H (8,94); N (2,91). Valor teórico: (51,28); H (8,71); N (2,78). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,32(s, 4.5H, Boc-CH_3), 1,39-1.98 (br, 6,00H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 2,0H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 3,0H, MPEG550-OCH_3), 3,65 (br, 66,0H, MPEG550-OCH_2CH_2), 4,45(m, 1,0H, Lis-CH).

Ejemplo 8. Síntesis de $[NP(MPEG550)(AE)]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1, se preparó un compuesto intermedio de polifosfaceno PEGilado usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 2,0 g, 5,72 mmol), el cloruro de aluminio catalítico ($AlCl_3$, 7,0% en peso), metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular promedio de 550 (MPEG550, 9,48 g, 17,2 mmol) y metal de sodio (0,59 g, 25,7 mmol). Mientras tanto, se hicieron reaccionar 2-amino-etanol (AE, 1,30 g, 21,3 mmol) e hidruro de sodio (0,61 g, 25,4 mmol) en tetrahidrofurano seco (50 ml) a temperatura ambiente durante 5 h para obtener un precipitado amarillo de sal de sodio de 2-amino-etanol, que se lavó a fondo con éter etílico y a continuación se disolvió en sulfóxido de dimetilo (50 ml). La solución resultante se añadió al producto intermedio de polifosfaceno PEGilado mencionado anteriormente, y la mezcla de reacción se hizo reaccionar adicionalmente durante 24 h a 50°C. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el subproducto cloruro de sodio y el filtrado se sometió a diálisis usando membrana de celulosa (MWCO: 3,5 kDa) y liofilización para obtener un nuevo polímero vehículo de polifosfaceno con un rendimiento del 70%. Composición: $C_{27}H_{57}N_2O_{14}P\cdot H_2O$ Datos de análisis elemental (%): C (47,38); H (8,61); N (3,95). Valor teórico: (47,45); H (8,64); N (4,10). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 3,26 (s, 3H, OCH_3 de MPEG), 3,50-3,52(m, 4H, $(CH_2)_2$ de amino etanol), 3,54-3,81 (brm, 46H, CH_2 de MPEG), 3,83-4,10 (brm, 2H, -P-O-CH_2- de MPEG). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -2.66 (O-P-O).

Ejemplo 9. Síntesis de $[NP(MPEG750)(AE)]_n$

Según el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 8, el producto deseado del compuesto de polifosfaceno del título se preparó usando hexaclorociclotrifosfaceno ($[NPCl_2]_3$, 2,0 g, 5,72 mmol), cloruro de aluminio catalítico ($AlCl_3$, 7,0% en peso), metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular promedio de 750 (MPEG750, 12,9 g, 17,2 mmol), sodio metálico (0,59 g, 25,7 mmol), 2-amino-etanol (1,30 g, 21,3 mmol) e hidruro de sodio (0,61 g, 25,4 mmol) con 78% de rendimiento. Composición: $C_{35}H_{73}N_2O_{18}P\cdot H_2O$. Datos de análisis elemental (%): C (48,02); H (8,96); N (3,55). Valor teórico: (48,89); H (8,73); N (3,26). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 3,41 (s, 3H, OCH_3 de MPEG), 3,49-3,53 (m, 4H, $(CH_2)_2$ de amino etanol), 3,57-3,83 (brm, 62H, CH_2 de MPEG), 3,83-4,05 (brm, 2H, -P-O-CH_2- de MPEG). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -3.95 (O-P-O).

Síntesis del precursor fármaco-enlazador anticancerígeno

Ejemplo 10. Síntesis de éster 2'-aconítico docetaxel NHS

Aconítico anhídrido (3,12 g, 20 mmol), docetaxel (8,03 g, 10 mmol) y un catalizador DPTS (dimetilaminopiridina/ácido p-toluenosulfónico) (6,0 g, 20 mmol) se secaron al vacío durante 4 h y se enfriaron a -10°C y a continuación fue completamente disuelto en tetrahidrofurano seco (100 ml). A esta solución se le añadió lentamente DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida) (2,5 g, 20 mmol) disuelto también en tetrahidrofurano seco. La solución de reacción mixta se hizo reaccionar durante 6 h a -10°C y a continuación durante 6 a 12 h a 0°C. El progreso de la reacción se controló por TLC usando una mezcla disolvente de diclorometano: metanol (95:5) hasta que no se detectó docetaxel libre. Después de la finalización confirmada de la reacción, se añadió una cantidad en exceso de NHS (N-hidroxisuccinimida) (11,5 g, 100 mmol) y un gran exceso de DIPEA básica (diisopropil etil amina) a la solución de reacción anterior y la

mezcla de reacción se hizo reaccionar adicionalmente durante 12 h. La mezcla de reacción se sometió finalmente a evaporación al vacío para obtener un producto polimérico sólido, que se disolvió en una pequeña cantidad de etanol (50 ml) y a continuación se añadió una gran cantidad de agua (950 ml) a la misma para recristalización a 0°C durante 3 h. La capa de agua sobrenadante se retira para obtener un producto oleoso marrón, que se disolvió en cloroformo o diclorometano para lavar sucesivamente con solución salina (pH = 7), solución de ácido cítrico (pH = 2), solución de bicarbonato de sodio (pH = 9) y finalmente con solución salina. La solución orgánica final se secó usando sulfato de magnesio anhidro y a continuación se secó al vacío para obtener finalmente el precursor compuesto de éster 2'-aconítico-docetaxel-NHS. Composición: $C_{53}H_{60}N_2O_{21}$ Datos de análisis elemental (%): C (60,07); H (5,86); N (2,71). Valor teórico: (59,99); H (5,70); N (2,64). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 3H, C17-CH_3), 1.24ppm (s, 3H, C16-CH_3), 1,34ppm (s, 9H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 3H, C19-CH_3), 1,96ppm (s, 3H, C18-CH_3), 2,18ppm (d, 2H, C14-CH_2), 2,43ppm (s, 3H, C22-CH_3), 2,64 (t, 4H, NHS-CH_2CH_2), 2,92 (s, 2H, aconítico-CH_2), 4,21 ppm (d, 1H, C20-CH_a), 4,24ppm (m, 1H, C7-CH), 4,32ppm (d, 1H, C20-CH_b), 4,95ppm (dd, 1H, C5CH), 5,23ppm (d, 1H, C10-CH), 5,40ppm (d, 1H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 1H, C2-CH), 6,40-6,68(m, 1H, aconítico-CH), 7,51 ppm (m, 2H, C33, C27-CH), 7,53 (m, 6H, C32, C34-CH; C31, C35-CH; C26, C28-CH), 8,12 (d, 2H, C25, C29-CH),

Ejemplo 11. Síntesis del éster 2'-aconítico paclitaxel-NHS

Según el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 10, el producto deseado del precursor compuesto de éster 2'-aconítico paclitaxel-NHS se preparó usando aconítico anhídrido (3,12 g, 20 mmol), paclitaxel (8,53 g, 10 mmol), DPTS (5,88 g, 20 mmol), NHS (11,5 g, 100 mmol), DIC (2,52 g, 20 mmol) y DIPEA (10 ml). Composición: $C_{55}H_{58}N_2O_{19}$ Datos de análisis elemental (%): C (61,90); H (5,75); N (2,80). Valor teórico: (62,85); H (5,56); N (2,67). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 3H, C17-CH_3), 1,24 ppm (s, 3H, C16-CH_3), 1,34 ppm (s, 9H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 3H, C19-CH_3), 1,96 ppm (s, 3H, C18-CH_3), 2,18 ppm (d, 2H, C14-CH_2), 2,43 ppm (s, 3H, C22-CH_3), 2,64 (t, 4H, NHS-CH_2CH_2), 2,92(s, 2H, aconítico-CH_2), 4,21 ppm (d, 1H, C20-CH_a), 4,24 ppm (m,1H, C7-CH), 4,32 ppm (d, 1H, C20-CH_b), 4,95 ppm (dd, 1H, C5-CH), 5,23 ppm (d,1H, C10-CH), 5,40 ppm (d, 1H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 1H, C2-CH), 6,40-6,68 (m, 1H, aconítico-CH), 7,51 ppm (m, 2H, C33, C27-CH), 7,53 (m, 6H,C32, C34-CH; C31,C35-CH; C26, C28-CH), 8,12 (d, 2H, C25, C29-CH).

Ejemplo 12. Síntesis del éster 2'-aconítico camptotecina-NHS

Según el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 10, el producto deseado del precursor compuesto de éster 2'-aconítico-camptotecina-NHS se preparó usando aconítico anhídrido (3,12 g, 20 mmol), camptotecina (3,48 g, 10 mmol), DPTS (5,88 g, 20 mmol), NHS (11,5 g, 100 mmol), DIC (2,52 g, 20 mmol) y DIPEA (10 ml). Composición: $C_{30}H_{23}N_3O_{11}$ Datos de análisis elemental (%): C (60,29); H (3,98); N (6,57). Valor teórico: (59,90); H (3,85); N (6,99). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 0,9 (t, 3H, C18-CH3), 2,0 (m, 2H, C19-CH_2), 2,64 (t, 4H, NHS-CH_2CH_2), 2,92 (s, 2H, aconítico-CH_2), 4,20 (d, 2H, C5-CH_2), 4,76 (m, 2H, C22-CH_2), 6,40-6,68 (m, 1H, aconítico-CH), 6,70 (s, 1H, C14-CH), 7,59 (s,1H, C11-CH), 7,80 (m, 2H, C12-CH; C7-CH), 8,0 (m, 2H, C9-CH; C12-CH).

Ejemplo 13. Síntesis de 2'-aconítico glucamptotecina

t-Boc-glicina (0,5 g, 2,85 mmol) y camptotecina (CPT) (0,5 g, 1,43 mmol) se disolvieron en cloruro de metileno anhidro (20 ml) y a esto fueron agregados DIPC (0,36 ml, 2,85 mmol) y DMAP (0,31 g, 2,53 mmol)). La solución mezcla se hizo reaccionar agitando a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla resultante se extrajo agitando con solución acuosa diluida de ácido clorhídrico (pH = 2). La capa acuosa se separó y se secó usando sulfato de magnesio anhidro, seguido de secado al vacío para obtener t-Boc-glucamptotecina. Este producto intermedio se hizo reaccionar en la mezcla de cloruro de metileno y ácido trifluoroacético (10 ml/10 ml) durante 1 hora para eliminar el grupo t-Boc, y la camptotecina-gli-NH_2 y *cis*-aconítico anhídrido (0,57 g, 3,63 mmol) resultantes se hicieron reaccionar en disolvente de dimetilformamida (2 ml) a 0ºC durante 16 h. A la mezcla de reacción se añadió una cantidad en exceso de éter etílico para precipitar el precursor de camptotecina, que se filtró y se secó al vacío para obtener 2'-aconítico-glicamptotecina con un rendimiento del 80%. Composición: $C_{28}H_{23}N_3O_{10}$ Datos de análisis elemental (%): C (59,72); H (4,01); N (7,39). Valor teórico: (59,84); H (4,09); N (7,48). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 0,88-0,93 (brm, 3H, -CH_3 de CPT-C18), 2,12-2,16(m, 2H, -CH_2 de CPT -C-19), 2,86(s, 2H, -CH_2 de *cis*-aconitato), 3,92-4,42 (brm, 2H, -CH_2 de glicina), 5 ,27(brs, 2H, -CH_2 de CPT- C5),5,49 (brs, 2H, -CH_2 de CPT-C22), 5,97(s,1H, =CH de *cis*-aconitato), 7,18-7,21 (m, 1H, =CH de CPT-C14), 7,69-7,72 (m, 1H, =CH de CPT-C11), 7,84-7,89 (m, 1H, =CH de CPT-C10) 8,10-8,21 (m, 2H, =CH de CPT-C12 y C9), 8,68 (brs, 1H, =CH de CPT-C7), 12,3-12,8 (brs, -COOH de *cis*-aconitático ácido).

Síntesis de conjugados de fármacos polifosfaceno-anticancerígenos

Ejemplo 14. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,5}(LisEt\text{-}2'\text{-aconítico-docetaxel})_{0,5}]_n$

El compuesto de polifosfaceno (4,85 g, 5,0 mmol) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en cloruro de metileno en un matraz de reacción, que se enfrió usando un baño de hielo. El éster 2'-aconítico-docetaxel-NHS obtenido en el Ejemplo 8 disuelto también en cloruro de metileno se añadió al matraz de reacción y la mezcla de reacción se hizo reaccionar durante 12 h a baja temperatura (0-5°C). Después de 12 h de reacción, la mezcla de reacción se sometió a evaporación al vacío y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de etanol, seguido de la adición de una gran cantidad en exceso de agua para recristalización, que se repitió dos veces. Las impurezas insolubles restantes se eliminaron usando un filtro de membrana y el filtrado se lavó cinco veces con solución acuosa de etanol al 30% y a continuación

cinco veces con agua pura, seguido de fraccionamiento usando ultramembrana y liofilizado para obtener el producto conjugado final de polifosfaceno-docetaxel. $[NP(MPEG550)_{1,5}(LisEt\text{-}2'\text{-aconítico-docetaxel})_{0,5}]_n$ en 90% de rendimiento. Composición: $C_{132}H_{225}N_5O_{59}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (53,62); H (7,92); N (2,67). Valor teórico: (54,89); H (7,85); N (2,42). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 1,5H, C17-CH_3), 1,24 ppm (s, 1,5H, C16-CH_3), 1,34 ppm (bs, 4,1H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 1,5H, C19-CH_3), 1,96 ppm (s, 1,5H, C18-CH_3), 2,18 ppm (d, 1,0H, C14-CH_2), 2,43 ppm (s, 1,5H, C22-CH_3), 4,21 ppm (d, 0,5H, C20-CH_a), 4,24 ppm (m, 0,5H, C7-CH), 4,32 ppm (d, 0,5H, C20-CH_b), 4,95 ppm (dd, 0,5H, C5-CH), 5,23 ppm (d, 0,5H, C10-CH), 5,40 ppm (d, 0,5H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 0,5H, C2-CH), 7,51 ppm (m, 1,0H, C33, C27-CH), 7,53 (m, 3,0H, C32, C34-CH; C31, C35-CH; C26, C28-CH), 8,12(d, 0,6H, C25, C29-CH), 1,24(s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 1,29(bs, 1H, Lis-CH_2), 1,55 ppm (bs, 1H, Lis-CH2), 1,80(bs, 1H, Lis-CH_2), 2,90(br, 1H, Lis-e-CH_2), 3,38 ppm (s, 4,50H, CH_3O-, PEG), y 3,63 ppm (m, 66,0H, -CH_2CH_2-O-), 4,4(s, 0,51H, lisina-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 15. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1.5}(LysEt)_{0.2}(LysEt\text{-}2'\text{-aconitic-docetaxel})_{0.3}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 14, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 1 (9,7 g, 10 mmol), el precursor, éster 2'-aconítico docetaxel NHS (3,18 g, 3,0 mmol) del Ejemplo 11 y DIPEA (5 ml) con un rendimiento del 90%. Composición: $C_{112,4}H_{203}N_{4,6}O_{51,8}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (53,48); H (8,31); N (2,64). Valor teórico: (53,79); H (8,15); N (2,57). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 0,9H, C17-CH_3), 1,24 ppm (s, 0,9H, C16-CH_3), 1,34 ppm (bs, 3,31H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 0,9H, C19-CH_3), 1,96 ppm (s, 0,9H, C18-CH_3), 2,18 ppm (d, 0,6H, C14-CH_2), 2,43 ppm (s, 0,9H, C22-CH_3), 4,21 ppm (d, 0,3H, C20-CH_a), 4,24 ppm (m, 0,3H, C7-CH), 4,32 ppm (d, 0,3H, C20-CH_b), 4,95 ppm (dd, 0,31H, C5-CH), 5,23 ppm (d,0,3H, C10-CH), 5,40 ppm (d, 0,3H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 0,3H, C2-CH), 7,51 ppm (m, 0,6H, C33, C27-CH), 7,53 (m, 1,8H, C32, C34-CH; C31, C35-CH; C26, C28-CH), 8,12(d, 0,6H, C25, C29-CH), 1,24(s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 1,29 (bs, 1H, Lis-CH_2), 1,55 ppm (bs,1H, Lis-CH2), 1,80 (bs, 1H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1H, Lis-CH_2), 3,38 ppm (s, 4,50H, CH_3O-, PEG), y 3,63 ppm (m, 66,0H, -CH_2CH_2-O-), 4,4(s, 0,51H, lisina-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 16. $[NP(MPEG750)_{1,5}(LisEt)_{0,2}(LisEt\text{-}2'\text{-aconítico-docetaxel})_{0,3}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 14, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 2 (12,3 g, 10 mmol), el precursor, éster 2'-aconítico docetaxel NHS (5,3 g, 5,0 mmol) del Ejemplo 11 y DIPEA (10 ml) con un rendimiento del 89 %. Composición: $C_{136,4}H_{251}N_{4,6}O_{63,8}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (53,27); H (8,45); N (2,31). Valor teórico: (53,92); H (8,33); N (2,12). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 0,9H, C17-CH_3), 1,24 ppm (s, 0,9H, C16-CH_3), 1,34 ppm (bs, 3,31H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 0,9H, C19-CH_3), 1,96 ppm (s, 0,9H, C18-CH_3), 2,18 ppm (d, 0,6H, C14-CH_2), 2,43 ppm (s, 0,9H, C22-CH_3), 4,21 ppm (d, 0,3H, C20-CH_a), 4,24 ppm (m, 0,3H, C7-CH), 4,32 ppm (d,0,3H, C20-CH_b), 4,95 ppm (dd, 0,31H, C5-CH), 5,23 ppm (d, 0,3H, C10-CH), 5,40ppm (d, 0,3H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 0,3H, C2-CH), 7,51 ppm (m, 0,6H, C33,C27-CH), 7,53 (m, 1,8H, C32, C34-CH; C31, C35-CH; C26, C28-CH), 8,12(d, 0,6H, C25, C29-CH), 1,24(s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 1,29 (bs, 1H, Lis-CH_2), 1,55 ppm (bs,1H, Lis-CH2), 1,80(bs, 1H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1H, Lis-ε-CH_2), 3,38 ppm (s, 4,50H, CH_3O-, PEG), y 3,63 ppm (m, 98,0H, -CH_2CH_2O-), 4,0 (bs, 4H, MPEG 750-CH_2), 4,51(s, 0,51H, lisina-CH), Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 17. $[NP(MPEGIOOO)_{1,5}(LisEt)_{0,2}(LisEt\text{-}2'\text{-aconítico-docetaxel})_{0,3}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 14, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 3 (15,6 g, 10 mmol), el precursor, éster 2'-aconítico docetaxel NHS (5,3 g, 5,0 mmol) del Ejemplo 11 y DIPEA (10 ml) con un rendimiento del 89 %. Composición: $C_{172,4}H_{323}N_{4,6}O_{48,2}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (53,71); H (8,74); N (2,01). Valor teórico: (54,04); H (8,50); N (1,68). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 0,9H, C17-CH_3), 1,24 ppm (s, 0,9H, C16-CH_3), 1,34 ppm (bs, 3,31H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 0,9H, C19-CH_3), 1,96 ppm (s, 0,9H, C18-CH_3), 2,18 ppm (d, 0,6H, C14-CH_2), 2,43 ppm (s, 0,9H, C22-CH_3), 4,21 ppm (d, 0,3H, C20-CH_a), 4,24 ppm (m, 0,3H, C7-CH), 4,32 ppm (d,0,3H, C20-CH_b), 4,95 ppm (dd, 0,31H, C5-CH), 5,23 ppm (d, 0,3H, C10-CH), 5,40 ppm (d, 0,3H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 0,3H, C2-CH), 7,51 ppm (m, 0,6H, C33, C27-CH), 7,53 (m, 1,8H, C32, C34-CH; C31, C35-CH; C26, C28-CH), 8,12(d, 0,6H, C25, C29-CH), 1,24(s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 1,29 (bs, 1H, Lis-CH_2), 1,55 ppm (bs,1H, Lis-CH_2), 1,80 (bs, 1H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1H, Lis-ε-CH_2), 3,38 ppm (s, 4,50H, MPEG-CH_3O-), y 3,63 ppm (m, 128H, MPEG-CH_2CH_2O), 4,0 (bs, 4H, MPEG1000-CH_2), 4,51(s, 0,51H, Lisina-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 18. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,0}(LisEt)_{0,5}(LisEt\text{-}2'\text{-aconítico-docetaxel})_{0,5}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 14, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 5 (7,7 g, 10 mmol), el precursor, éster 2'-aconítico docetaxel NHS (6,36 g, 6,0 mmol) del Ejemplo 10 y DIPEA (10 ml) con un rendimiento del 89 %. Composición: $C_{115}H_{191}N_7O_{48}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (54,92); H (8,01); N (3,99). Valor teórico: (55,21); H (7,70); N (3,92). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 0,9H, C17-CH_3), 1,24 ppm (s, 0,9H, C16-CH_3), 1,34 ppm (bs, 3,31H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 0,9H, C19-CH_3), 1,96 ppm (s, 0,9H, C18-CH_3), 2,18 ppm (d, 0,6H, C14-CH_2), 2,43 ppm (s, 0,9H, C22-CH_3), 4,21 ppm (d, 0,3H, C20-CH_a), 4,24 ppm (m, 0,3H, C7-CH), 4,32 ppm (d, 0,3H, C20-CH_b), 4,95 ppm (dd, 0,31H, C5-

CH), 5,23 ppm (d, 0,3H, C10-CH), 5,40 ppm (d, 0,3H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 0,3H, C2 -CH), 7,51 ppm (m, 0,6H, C33, C27-CH), 7,53 (m, 1,8H, C32, C34-CH; C31, C35-CH; C26, C28-CH), 8,12 (d, 0,6 H, C25, C29-CH), 1,24 (s, 3,0H, Lis-OCH_2CH_3), 1,29 (bs, 2H, Lis-CH_2), 1,55 ppm (bs, 2H, Lis-CH2), 1,80 (bs, 2H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 2H, Lis-e-CH_2), 3,38 ppm (s, 3,00H, CH_3 O-, PEG) y 3,63 ppm (m, 44,0H, -CH_2 CH_2-O-), 4,4 (s, 0,51 H, Lisina-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 19. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,5}(GliLisEt)\}_{0,2}(GliLisEt\text{-}2'\text{-aconítico-docetaxel})_{0,3}]_n$

Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 14, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 6 (10,4 g, 10 mmol), el precursor, éster 2'-aconítico docetaxel NHS (5,3 g, 5,0 mmol) del Ejemplo 10 y DIPEA (10 ml) con un rendimiento del 89 %. Composición: $C_{114,4}H_{206}N_{5,6}O_{52,8}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (52,98); H (8,23); N (3,19). Valor teórico: (53,53); H (8,09); N (3,06). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,13 ppm (s, 0,9H, C17-CH_3), 1,24 ppm (s, 0,9H, C16-CH_3), 1,34 ppm (bs, 3,31H, C60-t Bu), 1,75 ppm (s, 0,9H, C19-CH_3), 1,96 ppm (s, 0,9H, C18-CH_3), 2,18 ppm (d, 0,6H, C14-CH_2), 2,43 ppm (s, 0,9H, C22-CH_3), 4,21 ppm (d, 0,3H, C20-CH_a), 4,24 ppm (m, 0,3H, C7-CH), 4,32 ppm (d,0,3H, C20-CH_b), 4,95 ppm (dd, 0,31H, C5-CH), 5,23 ppm (d,0,3H, C10-CH), 5,40 ppm (d, 0,3H, C30-CH), 5,69 ppm (d, 0,3H, C2-CH), 7,51 ppm (m, 0,6H, C33, C27-CH), 7,53 (m, 1,8H, C32, C34-CH; C31, C35-CH; C26, C28-CH), 8,12 (d, 0,6H, C25, C29-CH), 1,24 (s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 1,29 (bs, 1H, Lis-CH_2), 1,55 ppm (bs,1H, Lis-CH2), 1,80 (bs, 1H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1H, Lis-e-CH_2), 3,38 ppm (s, 4,50H, CH_3O-, PEG), y 3,63 ppm (m, 66,0H, -CH_2CH_2-O-), 3,98 (bs, 2H, Gli-CH_2), 4,4 (s,0,51H, lisina-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 20. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,50}(LisEt)_{0,2}(LisEt\text{-}2'\text{-succinilpaclitaxel})_{0,3}]_n$

El compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 1 (9,7 g, 10 mmol) se hizo reaccionar con 2'-succinilpaclitaxel (5,26 g, 5,0 mmol) preparado por el procedimiento de la bibliografía (C.-M. Huang y col., Chem. Biol. 2000, 7, 453-461) por esterificación utilizando DCL (2,54 g, 20 mmol) y DIPEA (10 ml) para obtener el compuesto del título deseado con un rendimiento del 90%. Composición: $C_{113,6}H_{202}N_{4,6}O_{51,8}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (54,15); H (8,26); N (2,61). Valor teórico: (54,49); H (8,12); N (2,57). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25 (s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 2,49 (br, 1,00H, succinil-CH_2), 2,90 (br, 1,00H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 4,50H, MPEG550-OCH_3), 3,65 (br, 66,0H, MPEG550-OCH_2CH_2), 1,13 (s, 12H), 1,25 (s, 12H), 1,35 (s, 36H), 1,68 (m, 8H), 1,75 (s, 12H), 1,86 (m, 8H), 1,96 (s, 12H), 2,36 (m, 20H), 2,60 (m, 4H), 3,98 (s, 8H), 4,06 (d, 8H), 4,30 (m, 12H), 4,33 (m 8H), 4,97 (d, 4H), 5,22 (m, 4H), 5,36 (s, 4H), 5,60 (m, 4H), 5,69 (m, 8H), 6,20 (t, 4H), 7,33 (m, 8H), 7,41 (m, 8H), 7,52 (m, 8H), 7,61 (m, 4H), 7,33 (m, 4H), 8,12 (d, 8H). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 21. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,50}(GliLisEt\text{-}2'\text{-succinilpaclitaxel})_{0,50}]_n$

Según el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 20, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 6 (10,4 g, 10 mmol), 2'-succinilpaclitaxel (7,36 g, 7,0 mmol) preparado por el procedimiento de la bibliografía (C.-M. Huang y col., Chem. Biol. 2000, 7, 453-461) mediante reacción de esterificación utilizando DCL (2,54 g, 20 mmol) y DIPEA (10 ml) para obtener el compuesto del título deseado con un rendimiento del 80%. Composición: $C_{136}H_{226}N_6O_{58}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (55,36); H (7,99); N (2,93). Valor teórico: (55,67); H (7,76); N (2,86). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25 (s, 1,5H, Lis-OCH_2 CH_3), 2,49 (br, 1,00H, suucinil-CH_2), 2,90 (br, 1,00H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 4,50H, MPEG550-OCH_3), 3,65 (br, 66,0H, MPEG550-OCH_2CH_2), 1,13 (s, 12H), 1,25 (s, 12H), 1,35 (s, 36H), 1,68 (m, 8H), 1,75 (s, 12H), 1,86 (m, 8H), 1,96 (s, 12H), 2,36 (m, 20H), 2,60 (m, 4H), 3,98 (s, 8H), 4,06 (d, 8H), 4,30 (m, 12H), 4,33 (m, 8H), 4,97 (d, 4H), 5,22 (m, 4H), 5,36 (s, 4H), 5,60 (m, 4H), 5,69 (m, 8H), 6,20 (t, 4H), 7,33 (m, 8H), 7,41 (m, 38H), 7,52 (m, 8H), 7,61 (m, 4H), 7,33 (m, 4H), 8,12 (d, 8H) Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 22. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,50}(N_\alpha\text{-}BocLis)_{0,2}(N_\alpha\text{-}BocLis\text{-}docetaxel)_{0,3}]_n$

El compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 7 (9,57 g, 10,0 mmol) y docetaxel (10,6 g, 10,0 mmol) se secan al vacío y a continuación se disuelven en un disolvente seco de tetrahidrofurano, cloruro de metileno o cloroformo en un recipiente de reacción, que se enfrió en baño de hielo y a continuación el catalizador DCl (2,54 g, 20 mmol) y DIPEA (10 ml) disueltos en el mismo disolvente se añadieron al mismo. Después de que la mezcla de reacción se hizo reaccionar a temperatura de hielo durante 24 h, la solución de reacción se filtró a presión reducida y el filtrado se secó al vacío. El producto resultante se purificó de la misma manera que en el Ejemplo 14 para obtener el compuesto del título con un rendimiento del 60%. Composición: $C_{113,8}H_{204,2}N_{4,6}O_{50,8}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (55,06); H (7,98); N (2,60). Valor teórico: (54,42); H (8,19); N (2,57). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,25 (s, 1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 2,49 (br, 1,00H, suucinil-CH_2), 2,90 (br, 1,00H, Lis-ε-CH_2), 3,38 (s, 4,50H, MPEG550-OCH_3), 3,65 (br, 66,0H, MPEG550-OCH_2CH_2), 1,13 (s, 12H), 1,25 (s, 12H), 1,35 (s, 36H), 1,68 (m, 8H), 1,75 (s, 12H), 1,86 (m, 8H), 1,96 (s, 12H), 2,36 (m, 20H), 2,60 (m, 4H), 3,98 (s, 8H), 4,06 (d, 8H), 4,30 (m, 12H), 4,33 (m, 8H), 4,97 (d, 4H), 5,22 (m, 4H), 5,36 (s, 4H), 5,60 (m, 4H), 5,69 (m, 8H), 6,20 (t, 4H), 7,33 (m, 8H), 7,41 (m, 8H), 7,52 (m, 8H), 7,61 (m, 4H), 7,33 (m, 4H), 8,12 (d, 8H). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 23. Síntesis de $[NP(MPEG550)_{1,5}(LisEt)_{0,2}(LisEt\text{-}2'\text{-aconítico-camptotecina})_{0,3}]_n$

El compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 1 (9,7 g, 10 mmol) y el éster 2'-aconítico-camptotecina-NHS (2,5 g, 5,03

mmol) del Ejemplo 12 se hicieron reaccionar según el mismo procedimiento del Ejemplo 14, se obtuvo el compuesto del título requerido con 75% de rendimiento. Composición: $C_{98,6}H_{180,8}N_{5,2}O_{45,8}P_2$. Datos de análisis elemental (%): C (52,61); H (8,42); N (3,34). Valor teórico: (53,01); H (8,16); N (3,26). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 0,9 (t, 3H, C18-CH3), 2,0 (m, 2H, C19-CH_2), 2,64 (t, 4H, NHS-CH_2CH_2), 2,92 (s, 2H, aconítico-CH_2), 4,20 (d, 2H, C5-CH_2), 4,76 (m, 2H, C22-CH_2), 6,40-6,68 (m, 1H, aconítico-CH), 6,70 (s, 1H, C14-CH), 7,59 (s,1H, C11-CH), 7,80 (m, 2H, C12-CH; C7-CH), 8,0 (m, 2H, C9-CH; C12-CH), 1,24 (s,1,5H, Lis-OCH_2CH_3), 1,29 (bs, 1H, Lis-CH_2), 1,55 ppm (bs, 1H, Lis-CH2), 1,80 (bs,39 1H, Lis-CH_2), 2,90 (br, 1H, Lis-e-CH_2), 3,38 ppm (s, 4,50H, CH_3O-, PEG), y 3,63 ppm (m, 66,0H, -CH_2CH_2-O-), 4,4 (s, 0,51H, lisina-CH). Espectros ^{31}P-RMN: ($CDCl_3$, ppm): δ -0,014 (s), δ -5,551 (s).

Ejemplo 24. Síntesis de $[NP(MPEG550)(LisEt)(aconítico\text{-}glicilcamptotecina)]_n$
Según el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 14, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 5 (0,5 g, 0,25 mmol) y el precursor, 2'-aconítico-glucamptotecina (0,17 g, 0,25 mmol) del Ejemplo 13 y DIPEA (10 ml) con un rendimiento del 85%. Composición: $C_{111}H_{191}N_7O_{50}P_2$. Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 0,89-0,92 (brm, 3H, -CH_3 de CPT-C18), 1,13-1,58 (brm, 6H, -CH_2 de lisina), 2,12-2,17 (brm, 2H, -CH_2 de CPT-C-19), 3,01 (s, 2H, -CH_2 de *cis*- acónito), 3,21 (s, 9H, -OCH_3 de MPEG), 3,34-3,54 (brm, 144H, -CH_2-CH_2 de MPEG), 3, 94-4,41 (brm, 5H, -CH_2 de glicina, P-NH-CH_2 de lisina y = CH de *cis*-aconitato), 5,29 (brs, 2H, -CH_2 de CPT-C5), 5,47 (brs, 2H, -CH_2 de CPT-C22), 7,15-7,17 (m, 1H, = CH de CPT-C14), 7,69-7,72 (m, 1H, = CH de CPT-C11), 7,84-7,94 (m, 1H, = CH de CPT -C10) 8,10-8,21 (m, 2H, = CH de CPT-C12 y CPT-C9), 8,68 (brs, 1H, = CH de CPT-C7). ^{31}P-RMN (DMSO, ppm): δ-5,19 (O-P-O), 0,85 (O-P-N).

Ejemplo 25. Síntesis de $[NP(MPEG550)(AE)(ACA)Pt(dach)]_n$
El polímero vehículo de polifosfaceno, $[NP\ (MPEG550)\ (AE)]_n$ (1 g, 1,5 mmol) del Ejemplo 8 se disolvió en una solución acuosa de bicarbonato de sodio (pH = 9,0) y se añadió el enlazador *cis*-aconítico anhídrido (ACA) (2,35 g, 15 mmol) a la misma para una reacción adicional a 4ºC durante 5 h. La mezcla de reacción se dializó usando una membrana de celulosa (MWCO: 3,5 k Da) para obtener un nuevo producto intermedio de polifosfaceno con el grupo enlazador, $[NP(MPEG550)(AE)(ACA)]_n$. Se añadió una solución de metanol (20 ml) de hidróxido de bario (1,33 mmol) a la solución dializada y la mezcla de reacción se agitó adicionalmente durante 5 h para convertir el grupo enlazador ácido en sal de bario del polímero. La solución de reacción se sometió a evaporación al vacío hasta sequedad. El polímero sólido se disolvió en agua destilada (10 ml) y a esta solución de polímero se le añadió lentamente una solución acuosa (10 ml) de (dach)$Pt(SO_4)$ (dach: trans±1,2-diaminociclohexano) (0,49 g, 1,21 mmol) y la mezcla de reacción se agitó adicionalmente durante 3 h. Después de que el precipitado de sulfato de bario se filtró, el filtrado se dializó usando membrana de celulosa (MWCO: 3,5 kDa) y se sometió a liofilización para obtener un nuevo fármaco conjugado de polifosfaceno-oxaliplatino con un rendimiento del 74%. Composición: $C_{39}H_{73}N_4O_{19}PPt\cdot H_2O$ Datos de análisis elemental (%): C (40,54); H (6,34); N (4,62). Valor teórico: (40,83); H (6,54); N (4,88). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,04-1,20 (brm, 4H, C-4, C-5 de dach), 1,44 (brs, 2H, C-3 de dach), 1,82-1,93 (brm, 2H, C-6 de dach), 2,02-2,52 (brm, 2H, C-1, C-2 de dach), 3,26 (s,3H, OCH_3 de MPEG), 3,41-3,45 (m, 6H, CH_2 de *cis*-aconitato y amino-etanol), 3,47-3,81 (brm, 46H, -O-CH_2 de MPEG), 3,95-4,21 (brm, 2H, -P-O-CH_2- de MPEG), 4,69 (s, 1H, -C=CH- de *cis*-aconitato). ^{31}P-RMN (DMSO, ppm): -4.53 (O-P-O).

Ejemplo 26. Síntesis de $[NP(MPEG750)(AE)(ACA)Pt(dach)]_n$
Según el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 25, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 9 (1,0 g, 11,91 mmol), *cis*-aconítico anhídrido (1,86 g, 1,191 mmol), $Ba(OH)_2\cdot 8H_2O$ (0,35 g, 1,11 mmol) y (dach) $PtSO_4$ (0,4 g, 0,99 mmol) con un rendimiento del 72%. Composición: $C_{47}H_{89}N_4O_{23}PPt\cdot H_2O$ Datos de análisis elemental (%): C (42,32); H (7,64); N (3,88). Valor teórico: (42,65); H (6,88); N (4,23). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,05-1,21 (brm, 4H, C-4, C-5 de dach), 1,47 (brs, 2H, C-3 de dach), 1,80-1,93 (brm, 2H, C-6 de dach), 2,01-2,45 (brm, 2H, C-1, C-2 de dach), 3,27 (s, 3H, -OCH_3 de MPEG),3,41-3,45 (m,6H,-CH_2 de *cis*-aconitato y amino-etanol), 3,50-3,72 (brm, 62H, -CH_2 de MPEG), 3,99-4,13 (brm, 2H, -P-O-CH_2 de MPEG), 4,70 (s, $_1$H, -C=CH- de *cis*-aconitato). ^{31}P-RMN (DMSO, ppm): -4.52 (O-P-O).

Ejemplo 27. Síntesis de $[NP(MPEG550)(LisEt)(ACA)Pt(dach)]_n$
Según el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 25, el producto del título deseado se preparó usando el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 5 (1,0 g, 1,28 mmol), *cis*-aconítico anhídrido (2 g, 1,191 mmol), $Ba(OH)_2\cdot 8H_2O$ (0,44g, 1,39 mmol) y (dach) $PtSO_4$ (0,52 g, 1,28 mmol) con un rendimiento del 79 %. Composición: $C_{45}H_{84}N_5O_{20}PPt\cdot H_2O$ Datos de análisis elemental (%): C (42,63); H (6,61); N (5,42). Valor teórico: (42,88); H (6,83); N (5,56). Espectros ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) (δ, ppm): 1,07-1,21 (brm, 7H, -CH_3, -$(CH_2)_2$ de lisina), 1,43-1,48 (brm, 6H, -C-3, -C-4, C-5 de dach), 1,80-1,93 (brm, 8H, -CH_2 lisina y -C-6 de dach), 2,02-2,26 (brm, 2H, C-1, C-2 de dach), 2,82 (brs, 2H, -CH_2 de *cis*-aconitato), 3,26 (s, 3H, - OCH_3 de MPEG), 3,44-3,72 (brm, 46H, -CH_2-CH_2 de MPEG), 3,96-4,03 (brm, 3H, -CH_2 de etiléster y -N-CH de lisina), 4,62(s, 1H, =CH de *cis*-aconitato).

Mediciones de propiedades fisicoquímicas y eficacia del fármaco.
Experimental 1. Tamaño de partícula y formación de micelas
El compuesto vehículo de polifosfaceno del Ejemplo 1 y el producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo

14 se disolvieron por separado en agua destilada (0,2%) y sus distribuciones de tamaño de partícula y potenciales zeta se midieron por el procedimiento DLS (dispersión dinámica de luz) y los resultados se muestran en las figuras 1, 2 y 3. La figura 1 muestra la distribución del tamaño de partícula del polímero vehículo de polifosfaceno con un diámetro medio de aproximadamente 3 ~ 4 nm, que corresponde al tamaño de partícula de un volumen hidrodinámico de polímeros sin ensamblar probablemente debido a las propiedades catiónicas del grupo lisina amina del polímero como se muestra en la figura 2. Sin embargo, el mayor tamaño de partícula del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel a 60 nm, como se muestra en la figura 3, indica claramente que las moléculas del fármaco conjugado se autoensamblaron en nanopartículas micelares más grandes atribuidas a las propiedades anfifílicas de las moléculas del producto conjugado mediante la introducción de moléculas de docetaxel hidrófobas en el polímero vehículo. Se confirmó además que el tamaño de la micela no cambió significativamente en el intervalo de temperatura de 5 ± 70°C.

Experimental 2. Medición de la concentración crítica de micelas (CMC) del producto conjugado de polifosfaceno-paclitaxel.

Como se mencionó anteriormente, el producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel de la presente invención forma micelas poliméricas en solución acuosa. Para que dicho producto conjugado polímero-fármaco sea clínicamente útil para la inyección IV, la estabilidad de la solución de las micelas autoensambladas del producto conjugado polímero-fármaco es crítica. Dicha estabilidad de micelas se expresa como "concentración de micelas críticas (CMC)", que se mide por varios procedimientos, pero el procedimiento más utilizado es el "procedimiento de fluorescencia de pireno" (K. Kalyanasundoram, y col, J. Am. Chem Soc. 1988, 99, 2039). Según el procedimiento, el valor de CMC del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel de la presente invención se midió de la siguiente manera: Una solución acuosa de pireno (6×10^{-7} M) se preparó y usando esta solución se preparó una serie de soluciones de muestra del producto conjugado de polifosfaceno-paclitaxel del Ejemplo 20 en el intervalo de concentración de 5,0 ~ 0,0005% (p/p). Los espectros de fluorescencia se midieron a 339 nm (I_{ex}) y 390 nm (I_{em}) y a continuación a partir de la relación de las intensidades de fluorescencia de la banda I y la banda III, se determinó el valor de CMC como se muestra en la figura 4. El valor de CMC del producto conjugado de polifosfaceno-paclitaxel así obtenido fue de 41 mg/L, que es muy bajo y se espera que las micelas poliméricas sean estables en el sistema sanguíneo cuando se inyectan por vía intravenosa.

Experimental 3. Biodegradabilidad del producto conjugado de polifosfaceno-fármaco

Instrumento: Sistema GPC Yonglin Columna: Columna HR Hydrogel Waters (1xguard, 1xlineal, 2xHR2) Eluyente: agua/acetonitrilo (8:2) (0,5% $NaNO_3$) Velocidad de flujo: 1ml/min. Se prepararon dos soluciones de muestra disolviendo el producto conjugado de polifosfaceno-paclitaxel del Ejemplo 20 (250 mg) en una solución amortiguadora(5 ml) a pH = 5,4 y en otra solución amortiguadora(5 ml) a pH = 7,4. Las dos soluciones de muestra se agitaron lentamente a 37°C en un baño de agua y se tomaron 500 µl de la solución de muestra en un horario predeterminado (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 16 días después de la incubación) y se liofilizaron. Las muestras secas se disolvieron en tetrahidrofurano con un 0,2% de bromuro de t-butilamonio y se sometieron a cromatografía de permeación en gel (GPC). A partir de los datos de GPC, el patrón de degradación del fármaco conjugado de polifosfaceno-paclitaxel se muestra en la figura 5. Como se ve en la figura, el peso molecular promedio del fármaco conjugado de polifosfaceno disminuyó rápidamente durante los primeros días, pero su degradación se desaceleró particularmente en medio neutro. La vida media de la cadena principal de polifosfaceno en el sistema sanguíneo se estimó en aproximadamente 16 días, pero el factor más alentador es que la cadena principal de polifosfaceno es continuamente degradable en medios ácidos, que es similar al microambiente tumoral relevante para la cinética de liberación del fármaco. En la presente invención, todos los productos poliméricos finales se sometieron a fraccionamiento en diferentes pesos moleculares para estudiar su biodegradación, excreción y cinética de liberación del fármaco.

Experimental 4. Propiedades de focalización tumoral del compuesto de polifosfaceno mediante estudio de imagen

Instrumento: Sistema de imágenes digitales Kodak Image Station 4000mm (Kodak, New Haven, CT) Filtro de excitación y emisión: Omega Optical, Battlebor, VT (ej .: 560 nm, em: 700 nm) Se compraron diez ratones desnudos CH3/HeN de ocho semanas de edad (Institute of Medical Science, Tokio) y después de la adaptación durante una semana se inocularon con carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549 ($1x10_6$) Cuando el tamaño del tumor creció hasta aproximadamente 300 mm^3, los ratones se clasificaron en dos grupos, un grupo se inyectó con un compuesto vehículo de polifosfaceno marcado con colorante fluorescente Cy5.5 del Ejemplo 1 y otro grupo sin tratar se usó como grupo de referencia. En un tiempo predeterminado (12 h, 24 h, 48 h, 72 h después de la inyección IV) los ratones se sacrificaron para separar los órganos principales completos (hígado, pulmón, riñón, bazo, tumor, músculo), que se sometieron a un estudio de imagen de fluorescencia NIR usando una cámara CCD (Kodak Image Station 4000MM), y los resultados se muestran en la figura 6. A partir de las intensidades de fluorescencia de los órganos en la figura, el compuesto de polifosfaceno del Ejemplo 1 mostró claramente una acumulación dominante en el tejido tumoral en comparación con otros órganos, a pesar de su pequeño tamaño de partícula de 3 a 4 nm, que no puede permitir el efecto EPR. Por lo tanto, se puede suponer que la selectividad tumoral de este polímero vehículo de polifosfaceno se debe a sus propiedades catiónicas atribuidas a la amina libre de lisina del polímero y a su larga circulación sanguínea debido a su estructura PEGilada.

Experimental 5. Propiedades de focalización tumoral del fármaco conjugado polifosfaceno-docetaxel

El producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo 14 se marcó con Cy5.5 y sus distribuciones de órganos se compararon de la misma manera que en el Experimental 4 (Figura 7). Los datos cuantitativos de biodistribución del fármaco conjugado se obtuvieron mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia de cada órgano del ratón tratado con el fármaco conjugado marcado con Cy5.5 con el del ratón sin tratar, y los resultados se muestran en la figura 8.

La figura 7 muestra que el fármaco conjugado se acumuló predominantemente en el tumor y, en particular, su acumulación alcanzó un máximo después de 48 h después de la inyección, probablemente debido al efecto EPR (efecto de retención y permeabilidad mejorada) del mayor tamaño de partículas del producto conjugado (60 nm) y larga circulación sanguínea. Los datos cuantitativos para las biodistribuciones del fármaco conjugado de polifosfaceno-docetaxel que se muestran en la figura 8 muestran claramente una selectividad tumoral mucho mayor del fármaco conjugado debido al efecto EPR de su gran tamaño de partículas en comparación con la selectividad tumoral del antiguo polímero vehículo de polifosfaceno atribuido a sus propiedades catiónicas.

Experimental 6. Análisis del contenido de docetaxel en el producto conjugado polifosfaceno-docetaxel.
El contenido del componente del fármaco en el producto conjugado de polifosfaceno-fármaco puede determinarse por espectroscopía de RMN ^{1}H, espectroscopía UV o HPLC. En el procedimiento espectroscópico de RMN de protones, el contenido de docetaxel en el fármaco conjugado podría estimarse a partir de la proporción del área integrada de los protones metoxi a 3,4 ppm (3H-CH_3) del grupo PEG injertado en la cadena principal del polímero y la de los protones C10 a 7,33 ppm (C10, 2H) de docetaxel conjugado. Sin embargo, ambos desplazamientos químicos de los protones metoxi y los protones docetaxel C10 están ligeramente superpuestos con los picos de protones adyacentes, lo que dificulta la precisión de la relación de integración. En el procedimiento de HPLC, la cantidad total de docetaxel libre liberado del fármaco conjugado por descomposición ácida podría medirse por HPLC, pero no se pudieron obtener resultados reproducibles. Por otro lado, podrían obtenerse resultados reproducibles utilizando el procedimiento espectroscópico UV, ya que la molécula de docetaxel muestra una fuerte absorción de UV a 230 nm, mientras que el polímero vehículo de polifosfaceno no exhibe casi ninguna absorción a aproximadamente 230 nm. Por lo tanto, a partir de la curva de calibración medida usando una mezcla solvente de agua y acetonitrilo (1:1), en la cual docetaxel es completamente soluble. La curva de calibración se preparó midiendo la absorción UV a 230 nm usando la solución estándar de 10,0 mg de docetaxel/10 ml de mezcla de solventes y sus soluciones diluidas: 1 mg/ml, 1/2 mg/ml, etc.

Experimental 7. Liberación in vitro del fármaco del producto conjugado docetaxel-polifosfaceno
Instrumento: Agilent serie 1100 con detector DAD (230 nm) Columna: Columna Agbant Zobax Eclipse Plus C18 (diámetro = 4,6 mm; longitud = 150 mm, tamaño de partícula = 3,5 µm) Velocidad de flujo: 1.p ml/min Composición de eluyente: A: 0,1 % TFA en H_2O; B: Acetonitrilo (procedimiento isocrático) El experimento de liberación de fármaco in vitro del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel se realizó utilizando el procedimiento de HPLC. La cantidad de fármaco liberado, docetaxel del producto conjugado se determinó usando la curva de calibración preparada de la misma manera que en el Experimental 6.

Experimental 8. Ensayo in vitro de citotoxicidad del producto conjugado polifosfaceno-paclitaxel.
Como se sabe que el agente anticancerígeno paclitaxel es clínicamente muy eficaz contra muchos cánceres diferentes, se seleccionaron líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), de ovario (SK-OV3), de pulmón de células no pequeñas (A549) y de estómago (SNU638) para probar su citotoxicidad in vitro según el procedimiento de la bibliografía (procedimiento SRB) (Rita Song, y col, J. Control. Lanzamiento 105 (2005)142-150). Los resultados se presentan en la Tabla 1 siguiente. Como se ve en la tabla, los valores IC_{50} de los productos conjugados de polifosfaceno-paclitaxel de los ejemplos 20 y 21 son mucho más altos que el paclitaxel libre, ya que el componente hidrofóbico del paclitaxel es muy difícil de liberar del núcleo de micelas poliméricas después de la degradación del producto conjugado de polifosfaceno-paclitaxel.

Tabla 1. Citotoxicidad in vitro del producto conjugado de polifosfaceno-paclitaxel

	IC_{50} (nM) (media ± DE, n = 3 - 4)			
Líneas celulares de prueba	MCF-7	SK-Ov3	A-549	SNU-638
Paclitaxel	3,47 ± 0,62	15,32 ± 2,6	6,63 ± 2,84	10,89 ± 0,90
Ejemplo 20	164,8 ± 86,5	587,5 ± 47,8	170,0 ± 48,3	364,4 ± 201,7
Ejemplo 21	316,7 ± 141,1	6964 ± 141,7	1543 ± 41,8	5411 ± 46,6

Experimental 9. Estudio farmacocinético del producto conjugado polifosfaceno-docetaxel.

Con el fin de examinar el comportamiento farmacocinético del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel del Ejemplo 14 en comparación con el "Taxotere" no conjugado pero formulado actualmente en uso clínico, se realizó un

estudio farmacocinético del producto conjugado utilizando ratas Sprague-Dawley según el procedimiento de la bibliografía (Jun y col., Int. J. Pharm. 422(2012) 374-380). El perfil de concentración plasmática dependiente del tiempo se mostró en la figura 9 y los parámetros farmacocinéticos se presentaron en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos del Ejemplo 14 y Taxotere como referencia.

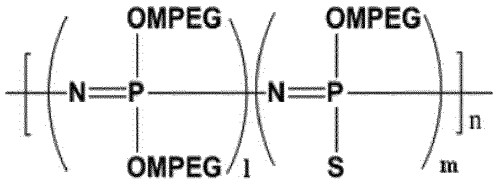
Parámetros farmacocinéticos	Taxotere (referencia)		Ejemplo 14	
	Media	DE	Media	DE
C_0 (µg/mL)	8,764	3,221	0,263	0,051
$AUC_{último}$ (µg·h/mL)	0,651	0,098	1,192	0,380
AUC_{INF} (µg·h/mL)	0,678	0,098	1,439	0,531
$t_{1/2}$ (h)	0,651	0,093	6,115	4,041
V_z(L)	1,758	0,159	7,287	2,231
Cl (L/h)	1,896	0,255	0,984	0,311

Experimental 10. Ensayos de xenoinjerto en ratones desnudos del producto conjugado polifosfaceno-docetaxel.

Para evaluar la eficacia in vivo del Ejemplo 14 en comparación con Taxotere como referencia, se realizaron ensayos de xenoinjerto en ratones desnudos contra la línea celular de cáncer gástrico MKN-28 usando ratones desnudos BALB/C según el procedimiento de la bibliografía (Y. J. Jun, y col. Int. J. Pharm. 422 (2012) 374-380). Dado que se sabe que la dosis óptima de Taxotere es de 10 mg/kg, se determinó que una dosis de inyección del Ejemplo 14 era de 10 mg/kg y 20 mg/kg en función del contenido de docetaxel del producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel, que se administraron tres veces (día 1, 5, 9). Tanto el tamaño del tumor como el peso corporal de cada uno se midieron desde el comienzo de la primera inyección hasta los 40 días. La figura 10 muestra la actividad antitumoral contra las células tumorales gástricas MKN-28 y la figura 11 muestra los cambios de peso corporal durante los 40 días. Se ve en la figura 10 que el producto conjugado de polifosfaceno-docetaxel exhibe una fuerte actividad antitumoral equivalente a Taxotere, y el resultado más importante se ve en la figura 11 que muestra que el peso corporal promedio de los ratones tratados con Taxotere se reduce significativamente (> 10%) durante el período de inyección del fármaco, mientras que no se observan cambios significativos en el peso corporal para el fármaco conjugado, lo que significa que el presente fármaco conjugado muestra una menor toxicidad sistémica. Los resultados de los ensayos de xenoinjerto realizados para la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549 se muestran en la figura 12, que muestra que el presente fármaco conjugado exhibe una actividad antitumoral aún mejor que el Taxotere de referencia.

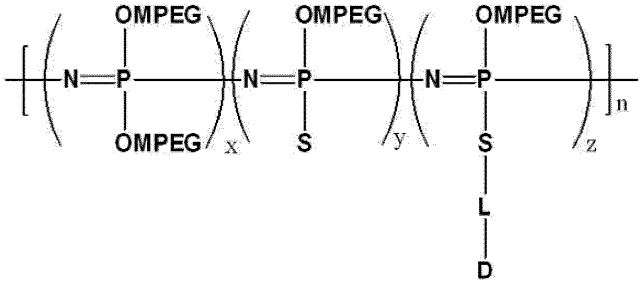
REIVINDICACIONES

1. Compuestos lineales de polifosfaceno representados por la siguiente fórmula química 1.
[Fórmula química 1]



donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; 1 es igual a 0 ~ 0,9; m es igual a 0,1~1 y 1 + m es igual a 1.

2. Compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco representados por la siguiente fórmula química 2.
[Fórmula química 2]



donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino - butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; L es un enlazador para conectar el grupo espaciador del polímero y la molécula D del fármaco que lleva un grupo hidroxilo o amina; x e y están independientemente en el intervalo de 0 ~ 0,5; z está en el intervalo de 0 ~ 1; y x + y + z = 1.

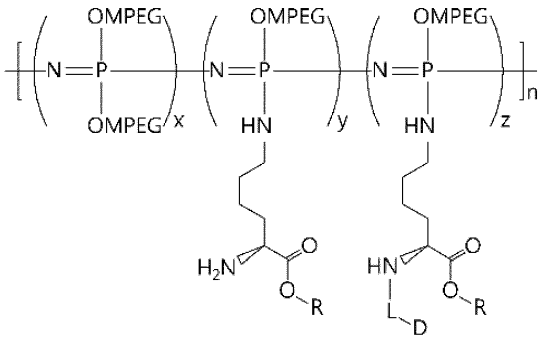
3. Los compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la reivindicación 2, donde S es lisina o dipéptido que contiene lisina o tripéptido que contiene lisina.

4. Los compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la reivindicación 2, donde S es amino-etanol o amino-propanol.

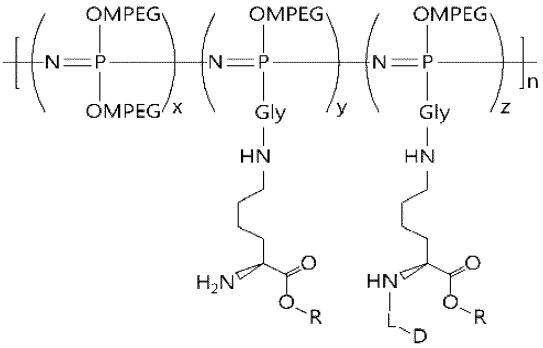
5. Los compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la reivindicación 2, donde D es uno seleccionado del grupo que comprende docetaxel, paclitaxel, camptotecina y (dach)Pt(II) (dach: trans ±1,2-diaminociclohexano).

6. Los compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la reivindicación 2, donde la fórmula química 2 anterior se expresa en una de las siguientes fórmulas químicas 3 a 5.

[Fórmula química 3]

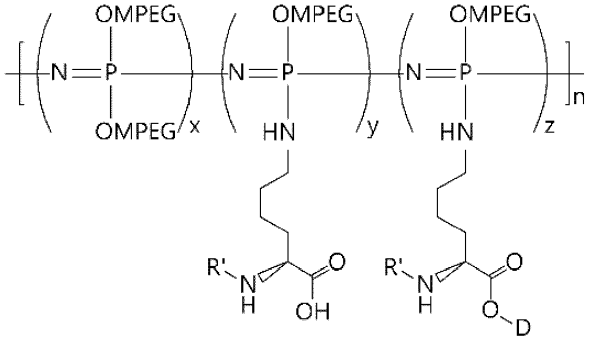


[Fórmula química 4]



En las fórmulas químicas 3 y 4, n es independientemente un número entero de 3 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; D representa docetaxel, paclitaxel, camptotecina o (trans-(±)-1,2-diaminociclohexano)platino(II); R es un ciclo alquilo lineal, ramificado o cíclico C_{1-6} u OCH_2Bz; x e y están independientemente en el intervalo de 0 a 0,5; z es mayor que 0 y menor que 1,0; x + y + z = 1.

[Fórmula química 5]

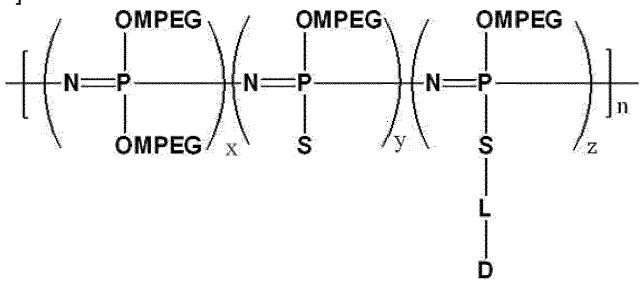


Donde n es un número entero de 3 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; D representa docetaxel, paclitaxel o camptotecina; R' representa t-Boc o CBZ; x e y están independientemente en el intervalo de 0 a 0,5; z es mayor que 0 y menor que 1,0; x + y + z = 1.

7. Un procedimiento para preparar compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco representados por la siguiente fórmula química 2 que comprende las etapas (a) a (d):
(a) preparar un producto intermedio de polifosfaceno PEGilado sometiendo un material de partida hexaclorociclotrifosfaceno a polimerización térmica para obtener un poli(diclorofosfaceno) lineal y, a continuación, hacer reaccionar el poli(diclorofosfaceno) lineal con la sal sódica de metoxi poli(etilenglicol),
(b) preparar un polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo haciendo reaccionar el producto intermedio de polifosfaceno PEGilado con un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en éster de lisina, éster de oligopéptido que contiene lisina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol, y amino-hexanol,
(c) preparar un precursor enlazador de fármaco haciendo reaccionar moléculas de fármaco que llevan grupo funcional

OH o NH_2 con un enlazador apropiado,
(d) conectar el precursor fármaco-enlazador obtenido de la Etapa (c) al grupo espacial del polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo obtenido de la Etapa (b),

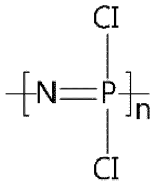
[Fórmula química 2]



donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metil poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; L es un enlazador para conectar el grupo espaciador del polímero y una molécula D del fármaco que lleva un grupo hidroxilo o amina; x e y están independientemente en el intervalo de 0 ~ 0,5; z está en el intervalo de 0 ~ 1; y x + y + z = 1.

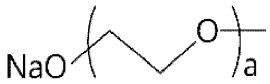
8. El procedimiento de preparación de los compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la reivindicación 7, donde la Etapa (a) se lleva a cabo agregando lentamente solución de sal sódica de metoxi poli(etilenglicol) de fórmula química 15 a la solución de poli(diclorofosfaceno) de fórmula química 13 enfriada por debajo de 0°C para obtener el producto intermedio de polifosfaceno de fórmula química 16:

[Fórmula química 13]



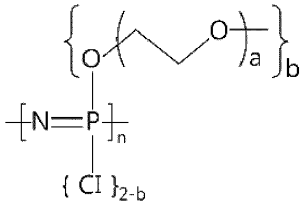
donde n es un número entero de 3 a 300,

[Fórmula química 15]



donde a es un número entero de 7 a 22,

[Fórmula química 16]

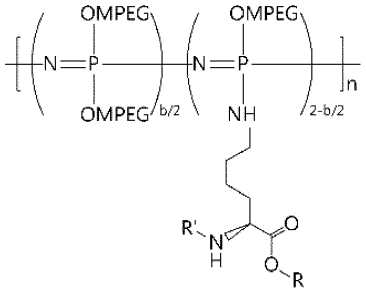


donde n es un número entero de 3 a 300, a es un número entero de 7 a 22, y b es la fracción molar sustituida de metoxi poli(etilenglicol) en el intervalo de 0,5 a 1,8.

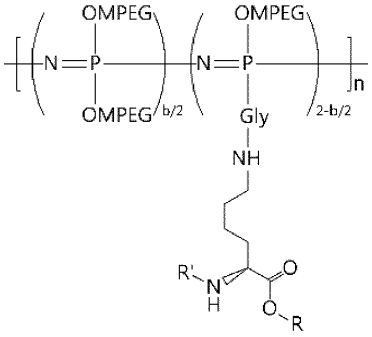
9. El procedimiento de preparación de compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la

reivindicación 8, donde la Etapa (b) se lleva a cabo haciendo reaccionar el producto intermedio de polifosfaceno de fórmula química 16 anterior con un grupo espaciador seleccionado del grupo que consiste en éster de lisina, oligopéptido que contiene lisina, éster, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol, amino-hexanol para obtener el polímero vehículo del polifosfaceno catiónico hidrófilo de las siguientes fórmulas químicas 19 y 20:

[Fórmula química 19]



[Fórmula química 20]

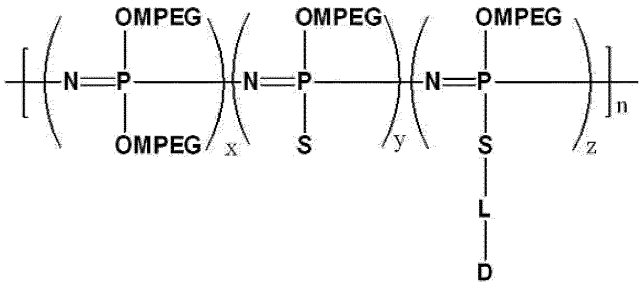


En las fórmulas químicas 19 y 20, n es un número entero de 3 a 300; MPEG representa metoxi poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; b tiene independientemente un valor de 0,5 a 1,8; R es un grupo alquilo C_{1-6}, u OCH_2Bz lineal, ramificado o cíclico; y R' es t-Boc (tert-butoxicarbonilo), Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo) o CBZ (carbozeniloxi).

10. El procedimiento de preparación de compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la reivindicación 7, donde en la Etapa (c) el enlazador es anhídrido de ácido aconítico y el fármaco es fármaco anticancerígeno de la familia taxano y fármaco anticancerígeno de la familia camptoticina.

11. Un procedimiento para preparar compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco representados por la siguiente fórmula química 2 que comprende las etapas (a) a (d):
(a) preparar un producto intermedio de polifosfaceno PEGilado sometiendo un material de partida hexaclorociclotrifosfaceno a polimerización térmica para obtener un poli(diclorofosfaceno) lineal y, a continuación, hacer reaccionar el poli(diclorofosfaceno) lineal con la sal sódica de metoxi poli(etilenglicol),
(b) preparar un polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo haciendo reaccionar el producto intermedio de polifosfaceno PEGilado con un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en éster de lisina, éster de oligopéptido que contiene lisina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol, y amino-hexanol,
(c) conectar un grupo enlazador al grupo espacial del polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo obtenido de la etapa (b),
(d) conectar moléculas de un fármaco con un grupo funcional OH o NH_2 al grupo enlazador que está conectado al polímero vehículo de polifosfaceno catiónico hidrófilo obtenido de la etapa (c),

[Fórmula química 2]



donde n es un número entero de 1 a 300; MPEG representa metil poli(etilenglicol) con un peso molecular de 350 a 1000; S es un grupo espacial seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, glutamina, asparagina, tirosina, oligopéptido que contiene lisina, oligopéptido que contiene arginina, oligopéptido que contiene glutamina, oligopéptido que contiene asparagina, oligopéptido que contiene tirosina, amino-etanol, amino-propanol, amino-butanol, amino-pentanol y amino-hexanol; L es un enlazador para conectar el grupo espaciador del polímero y una molécula D del fármaco que lleva un grupo hidroxilo o amina; x e y están independientemente en el intervalo de 0 ~ 0,5; z está en el intervalo de 0 ~ 1; y x + y + z = 1.

12. El procedimiento de preparación de compuestos conjugados de polifosfaceno-fármaco según la reivindicación 11, donde el fármaco que contiene un grupo hidroxilo (OH) o amina (NH_2) es docetaxel, paclitaxel, camptoticina o (dach)Pt (II) (dach: trans±1,2-diaminociclohexano).

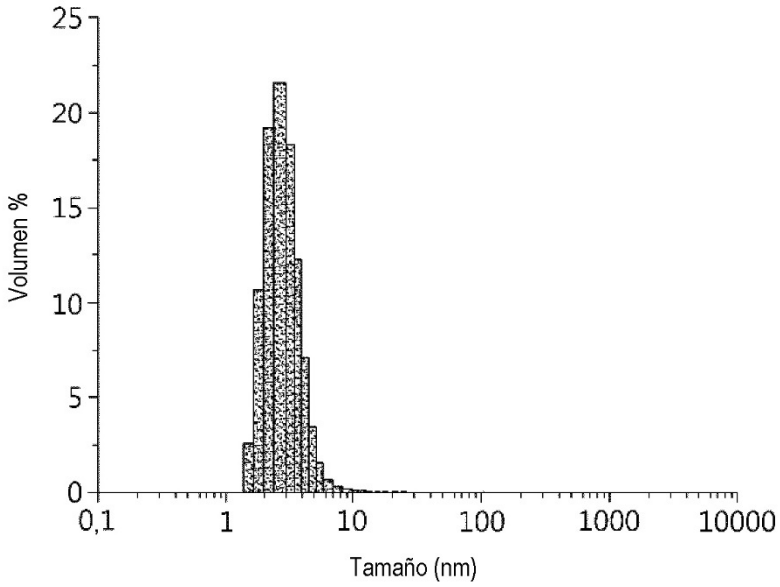


Figura 1

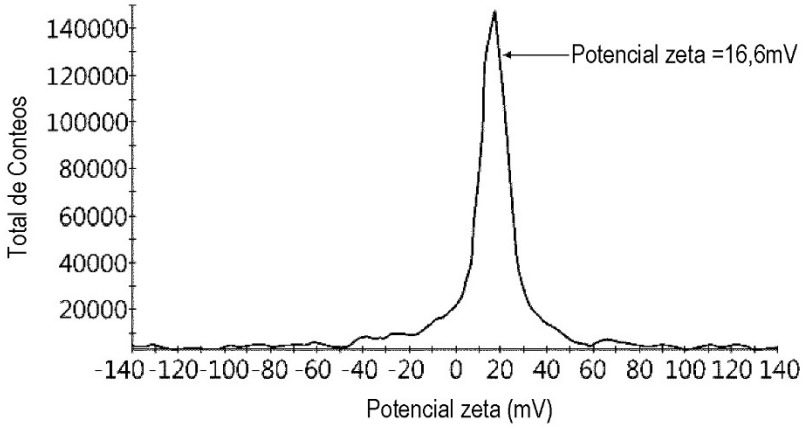


Figura 2

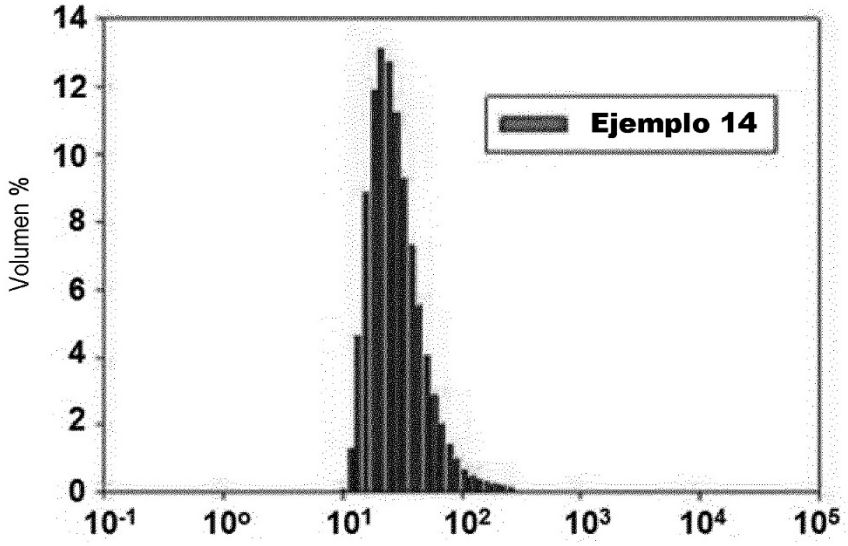


Figura 3

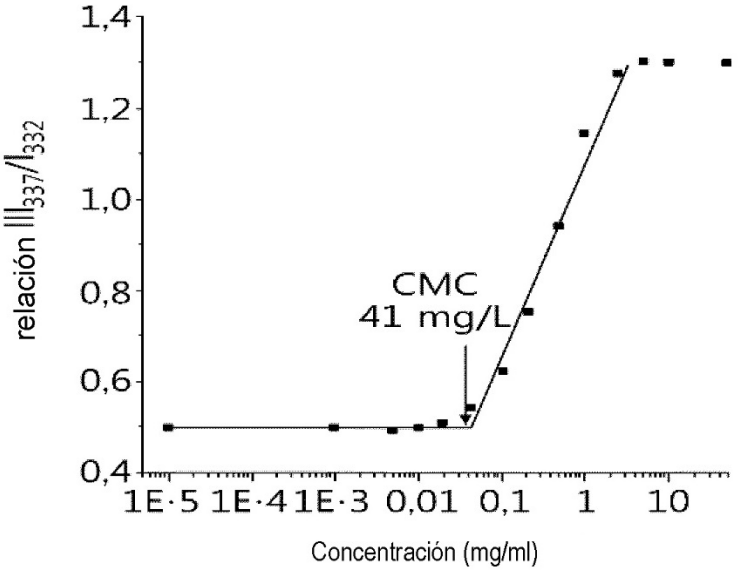


Figura 4

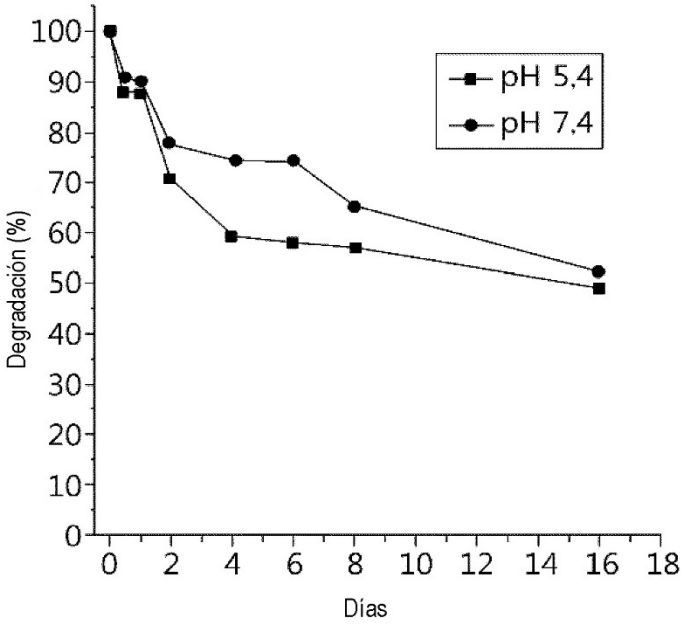


Figura 5

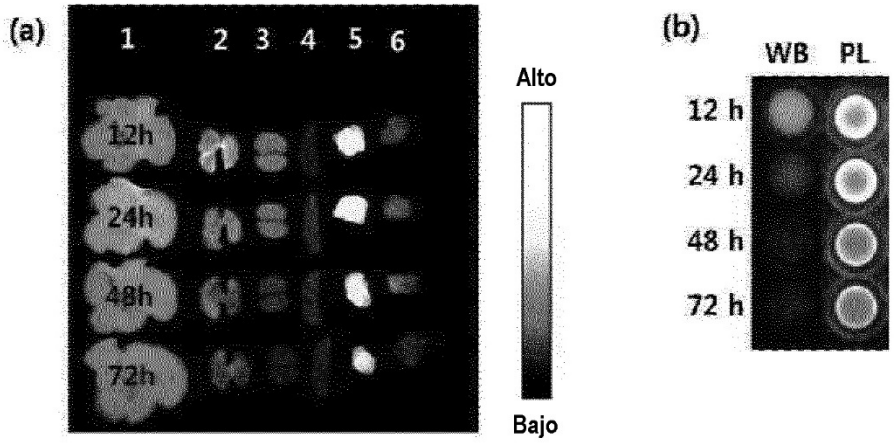


Figura 6

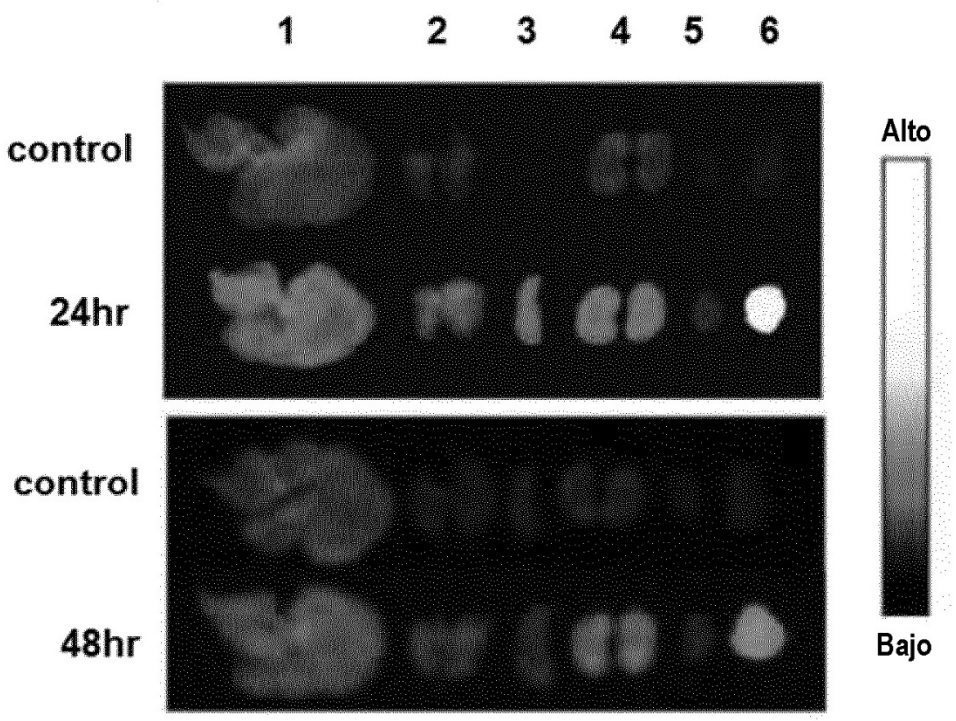


Figura 7

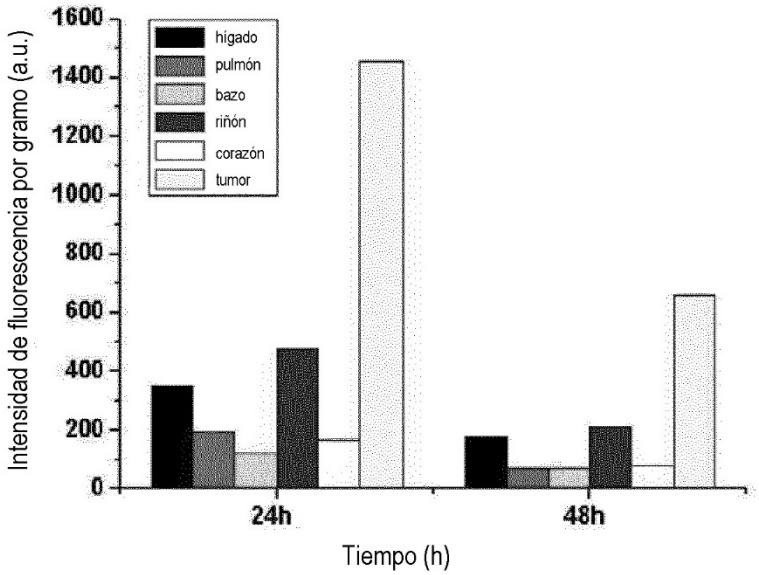


Figura 8

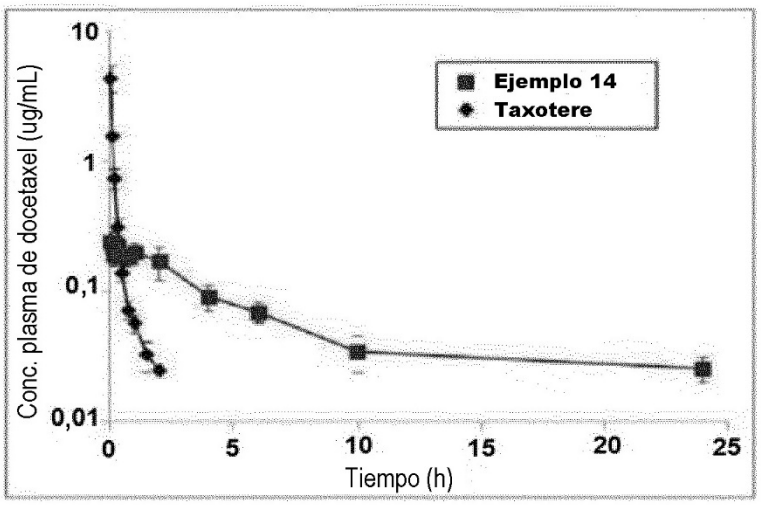


Figura 9

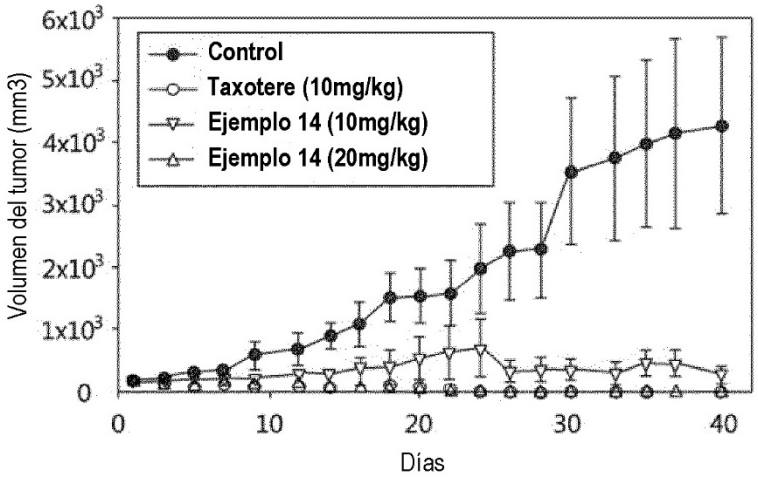


Figura 10

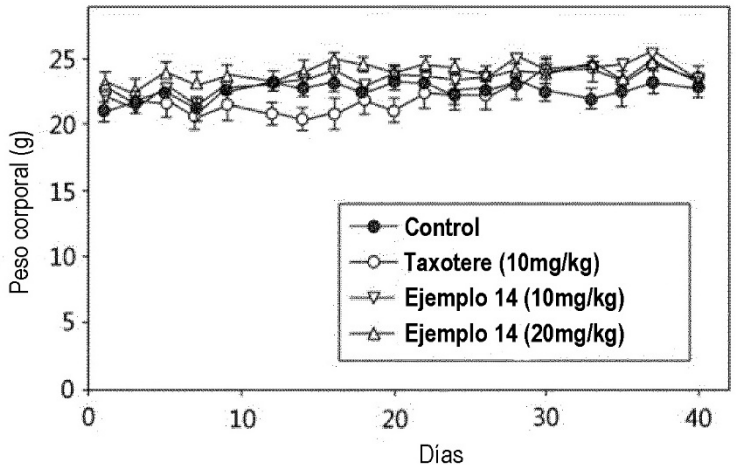


Figura 11

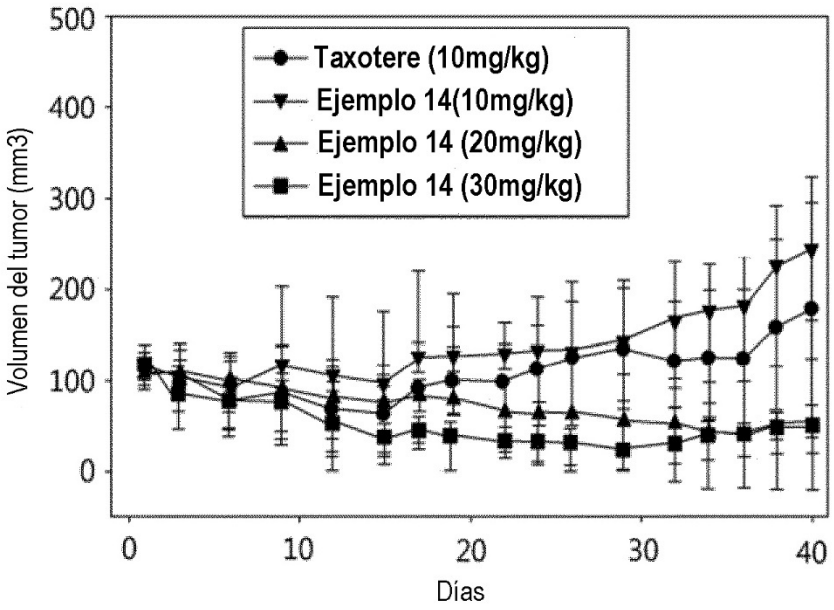

Taxotere (10mg/kg)
Ejemplo 14(10mg/kg)
Ejemplo 14 (20mg/kg)
Ejemplo 14 (30mg/kg)
Volumen del tumor (mm3)
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
Días

Figure 12