



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

254355

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 08 G 69/02

(22) Přihlášeno 10 04 85

(21) PV 2634-85

(40) Zveřejněno 14 05 87

(45) Vydáno 15 11 88

(75)

Autor vynálezu

SAUDEK VLADIMÍR RNDr. CSc., RYPÁČEK FRANTIŠEK RNDr. CSc.,

DROBNÍK JAROSLAV doc. RNDr. CSc., PRAHA

## (54) Rozpuštěné a biodegradovatelné kopolymery aktivované pro vazbu biologicky aktivních látek

Řešení se týká kopolymerů aktivovaných pro vazbu biologicky aktivních látek a způsobu jejich přípravy. Předmětem řešení jsou rozpustné a biodegradovatelné kopolymery aktivované pro vazbu biologicky aktivních látek jejichž hlavní řetěz je tvořen jednotkami kyseliny asparagové nebo glutamové, případně oběma jednotkami jiných aminokyselin podle obecného vzorce I kde  $n = 1$  nebo  $2$ ,  $m = 1$  nebo  $2$ ,  $a + b + c = 100$ ,  $a = 0,5$  až  $100$ ,  $b = 0$  až  $99,5$ ,  $c = 0$  až  $80$ , substituent  $R^1$  je vybraný ze skupiny hydrazo, azo, nebo  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_x \text{NHCO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$ , kde  $x = 2$  až  $6$ ,  $R^2$  je  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_x-$  OH kde  $x = 2$  až  $6$  a  $R^3$  je vybraný ze skupiny sestávající z metylu, 2-propylu, 2-metylpropylu, butylu, 2-butylu, fenetylu a 4-hydroxyfenetylu, přičemž molekulová hmotnost je  $5\,000$  až  $1\,000\,000$ .

Vynález se týká kolopolymerů aktivovaných pro vazbu biologicky aktivních látek a způsobu jejich přípravy.

Vazba biologicky aktivních látek na rozpustné syntetické polymery byla v posledních letech mnohokrát navržena jako výhodný typ, takzvaný "prodrugs" pro lékařské aplikace. Umožňuje například prodloužení poločasu vyloučení aktivní složky z těla, ovlivnění místa účinku v těle, spojení více aktivit aj. Mezi perspektivní polymery patří poly(asparagová kyselina) a poly(glutamová kyselina) a jejich deriváty. Pro vazbu zvolených látek je třeba do polymerů zavést reaktivní funkční skupiny. U poly(asparagové kyseliny) se obvykle používá reaktivního meziprojektu syntézy, poly(sukcinimidu), který se nechá zreagovat s reaktivním aminem nesoucím vhodnou funkční skupinu. Tento postup však skýtá vždy polymer racemický, nesoucí navíc v hlavním řetězci alfa i beta peptidické vazby, což má za následek, že výsledný polymer je velmi obtížně biodegradovatelný.

Biodegradovatelné deriváty aktivované poly(asparagové kyseliny) a poly(glutamové kyseliny) lze získat polymerizací N-karboxyanhydridů monoesterů příslušných aminokyselin, uvolněním karboxylové skupiny rozštěpením esteru a následnou aktivací karboxylu, například karbodiimidem nebo estery kyseliny mravenčí. Nevýhodou tohoto postupu je složitá několikastupňová syntéza, nízké výtěžky, možnost nahromadění nežádoucích vedlejších reakcí a neúplná konverze v jednotlivých stupních. Kromě toho se pro praktické lékařské využití polyanionty s volnými karboxylovými skupinami příliš nehodí, je výhodnější připravovat neionogenní deriváty s hydroxylowymi skupinami v bočním řetězci. To ovšem vyžaduje další reakci s aminoalkoholy po navázání biologicky aktivní látky.

Příkladem tohoto postupu je příprava poly(N-hydroxyetylglutaminu) nesoucího v bočním řetězci 1-beta-D-arabinofuranosylcytosin (ara-C): Poly(gama-benzylglutamát) byl převeden na poly(glutamovou kyselinu), za pomoci isobutylkarbonylchloridu byl navázán ara-C a potom aminoetanol (Kato et al. Cancer Res. 44,25 (1984)). Byl také připraven kopolymer kyseliny glutamové a hydrazidu kyseliny glutamové získaný z poly(glutamové kyseliny) reakcí t-butylkarbazátu za pomoci N-etyloxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinu. Po reakci byla t-butylová skupina odštěpena. Kopolymer byl využit k vazbě adriamycinu pomocí acylhydrazonové vazby (Heeswijk et al. Rec. Adv. Drug Delivery systems, Anderson Kim ed., Plenum Publishing Corporation, 1984, str. 77 až 100).

Pokud by byl připraven kopolymer hydroxyalkylglutaminu a glutamové kyseliny neúplnou aminolýzou esteru a následným zmydelněním zbývajících esterů, nelze jednoduše aktivovat uvolněné karboxyly pro reakci s biologicky aktivní látkou, aniž by došlo také k nežádoucí reakci mezi hydroxylowymi skupinami hydroxyalkylglutaminu a karboxyly.

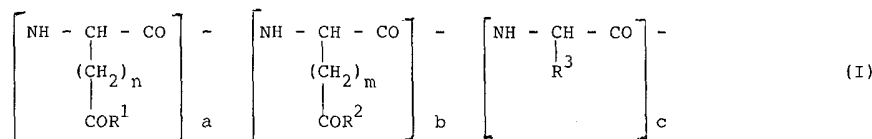
Nyní se zjistilo, že aminoalkoholy katalyzují hydrazinolýzu esterů, takže je možné velmi snadno jednostupňovou reakcí připravit kopolymery hydroxyalkylglutaminů a hydroxyalkylasparaginů s odpovídajícími hydrazidy monomerních jednotek kyseliny glutamové nebo asparagové. Vychází se z polymerních esterů, například poly(gama-benzylglutamátu) nebo poly(gama-metylglutamátu) respektivně poly(beta-alkylasparátů), jejich vzájemných kopolymerů nebo kopolymerů s jinými aminokyselinami, na které se působí směsí aminoalkoholu a hydrazinu. Poměr těchto složek v reakční směsi určuje poměr hydroxyalkylamidových a hydrazidových jednotek ve výsledném produktu. Reakci je možné dále urychlit přidávkem 2-hydroxypyridinu.

Kopolymery s hydrazidy kyselin asparagové je možné připravit také z poly(sukcinimidu) či kopolymerů sukcinimidu s jinými aminokyselinami opět současnou reakcí aminoalkoholu a hydrazinu.

Na kopolymery obsahující hydrazidy lze podle vynálezu vázat přímo látky obsahující aldehydové nebo ketonové skupiny. Další možností je oxidovat hydrazid na azid, který potom dobře reaguje s aromatickými i alifatickými aminy. Reakci lze provést ve vodě i v organických rozpouštědlech. Vynález tak umožňuje vázat přímo zvolené látky s aminoskupinou nebo připravit

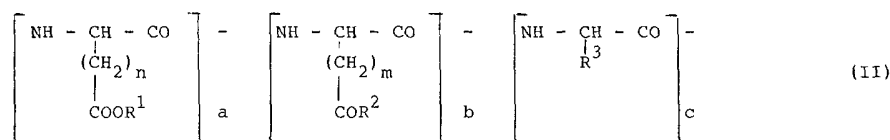
meziprodukty vazbou aminu typu  $H_2N-(CH_2)_n-NHCO-\textcircled{O}-NH_2$ , kde  $n = 0$  až 6, který se potom aktivuje diazotací.

Předmětem vynálezu jsou rozpustné a biodegradovatelné kopolymery aktivované pro vazbu biologicky aktivních látek, jejichž hlavní řetěz je tvořen jednotkami kyseliny asparagové nebo glutamové, popřípadě oběma, a jednotkami jiných aminokyselin, podle obecného vzorce I



kde  $n =$  nebo 2,  $m = 1$  nebo 2,  $a + b + c = 100$ ,  $a = 0,5$  až 100,  $b = 0$  až 99,5,  $c = 0$  až 80, substituent  $R^1$  je vybraný ze skupiny sestávající z  $-NH_2-NH_2$ ;  $N-N$  nebo  $-NH(CH_2)_x-NH.CO-\textcircled{O}-NH_2$ , kde  $x = 2$  až 6,  $R^2$  je  $-NH(CH_2)_x-OH$  kde  $x = 2$  až 6 a  $R^3$  je vybraný ze skupiny sestávající ze metylu, 2-propylu, 2-metylpropylu, butylu, 2-butylu, fenetylu a 4-hydroxyfenetylu, přičemž molekulová hmotnost je 5 000 až 1 000 000.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy těchto kopolymerů spočívající v tom, že na polymer obecného vzorce II



kde  $R$  značí metyl nebo benzyl,  $n = 1$  nebo 2,  $m = 1$  nebo 2,  $a + b + c = 100$ ,  $a = 0,5$  až 100,  $b = 0$  až 99,5,  $c = 0$  až 80,  $R^2$  značí  $R$  nebo totéž co v bodě 1 a  $R^3$  značí totéž co v bodě 1, se působí při teplotě 0 až 60 °C směsí primárního nebo sekundárního aminoalkylalkoholu s hydrazinem, kde alkyl je lineární nebo rozvětvený uhlovodíkový řetěz o počtu uhlíků 2 až 6.

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby kopolymerů kyseliny asparagové, vyznačený tím, že na poly(sukcinimid) se působí při teplotě 0 až 60 °C směsí primárního nebo sekundárního aminoalkylalkoholu a hydrazinu, kde alkyl je lineární nebo rozvětvený uhlovodíkový řetěz o počtu uhlíků 2 až 6.

Vynález objasněn následujícími příklady:

#### P ř í k l a d 1

2 g poly(gama-benzyl-L-glutamátu) byly rozpuštěny ve 20 ml dimethylacetamidu a potom byla přidána za prudkého míchání při teplotě místnosti po kapkách směs 86  $\mu$ l hydrazinu a 1,5 ml etanolaminu, míchání pokračovalo 20 min, potom byla reakční směs ponechána v klidu 4 dny při 60 °C, vlita do 200 ml etanolu obsahujícího 5 ml kyseliny octové, sraženina byla odfiltrována, rozpuštěna v okyselené vodě, dialyzována proti vodě a lyofilizována. Produktem je kopolymer gama-hydrazidu kyseliny L-glutamové (11 mol %) a  $N^Y$ -(2-hydroxyethyl)-L-glutaminu (89 mol %) (1,01 g).

#### P ř í k l a d 2

2 g poly(sukcinimidu) byly rozpuštěny ve 20 ml dimethylformamidu a za chlazení na 0 °C a míchání byla po kapkách přidána směs 144  $\mu$ l hydrazinu a 2,5 ml etanolaminu. Reakční směs byla míchána za teploty místnosti přes noc a potom zpracována stejně jako v příkladu 1.

Produktem je kopolymer alfa, beta-hydrazidu kyseliny D,L-asparagové (12 mol %) a  $N^{\alpha,\beta}$ -(2-hydroxyethyl)-D,L-asparagové kyseliny (88 mol %) (1,9 g).

## P ř í k l a d 3

1 g poly(gama-benzyl-L-glutamátu) byl přelit směsí 2,5 ml etanolaminu a 14  $\mu$ l hydrazinu a ponechána v klidu při 60 °C 4 dny. Výsledný roztok byl sražen 50 ml etanolu obsahujícího 4 ml kyseliny octové, sraženina byla promyta etanolem a etherem a vysušena. Produktem je kopolymer jako v příkladu 1 obsahující 1,3 mol % hydrazidu (0,77 g).

## P ř í k l a d 4

Reakce byla provedena stejně jako v příkladu 1, ale místo etanolaminu byl použit 2-hydroxybutylamin. Produktem je kopolymer gama-hydrazidu kyseliny L-glutamové (10 mol %) a N<sup>Y</sup>-(2-hydroxybutyl)-L-glutaminu (1,0 g).

## P ř í k l a d 5

Reakce byla provedena stejně jako v příkladu 1, ale místo etanolaminu byl použit 3-hydroxybutylamin. Produktem je kopolymer gama-hydrazidu kyseliny L-glutamové (10 mol %) a N<sup>Y</sup>-(3-hydroxybutyl)-L-glutaminu (1,0 g).

## P ř í k l a d 6

1 g kopolymeru gama-benzyl-L-glutamátu a L-fenylalaninu (3 mol %) byl rozpuštěn ve 10 ml dimethylacetamidu a potom bylo přidáno za prudkého míchání při teplotě místnosti po kapkách 0,75 ml roztoku 3,1 mol % hydrazinu a 10 mol % 2-hydroxypyridinu v etanolaminu. Dále příprava pokračovala jako v příkladu 1. Produktem je terpolymer gama-hydrazidu kyseliny glutamové (9,6 mol %), fenylalaninu (3 mol %) a N<sup>Y</sup>-(2-hydroxyetyl)-L-glutaminu (0,5 g).

## P ř í k l a d 7

Reakce byla provedena stejně jako v příkladu 6, byl však užit kopolymer gama-benzyl-L-glutamátu a leucinu (6 mol %) a roztok 2,5 mol % hydrazinu v etanolaminu. Produktem je terpolymer gama-hydrazidu kyseliny glutamové (8,4 mol %), leucinu (6 mol %) a N<sup>Y</sup>-(2-hydroxyetyl)-L-glutaminu (0,48 g).

## P ř í k l a d 8

Reakce byla provedena stejně jako v příkladu 6, byl však užit kopolymer gama-benzyl-L-glutamátu a valinu (4 mol %) a roztok 1,9 mol % hydrazinu v etanolaminu. Produktem je terpolymer gama-hydrazidu kyseliny glutamové (6,6 mol %), valinu (4 mol %) a N<sup>Y</sup>-(2-hydroxyetyl)-L-glutaminu (0,51 g).

## P ř í k l a d 9

K roztoku polymeru z příkladu 1 ve 3 ml 0,1 mol/l HCl byla za míchání a chlazení na 0 °C přidáno postupně 1 ml mol/l dusitanu sodného (NaNO<sub>2</sub>) a po 5 min suspenze 39 mg N-(6-aminohexyl)-2,4-dinitroanilidu (AHDN) dihydrochloridu ve 20 ml 0,2 mol/l bikarbonátu sodného (NaHCO<sub>3</sub>). Po 2 h míchání byl roztok převeden do dialyzační trubice, dialyzován proti vodě a lyofilizován. Ve výsledném preparátu je na 11 mol % monomerních jednotek vázán N-(6-aminohexyl)-2,4-dinitroanilid (AHDN).

## P ř í k l a d 10

K roztoku 100 g polymeru z příkladu 2 ve 2 ml dimethylsulfoxidu (DMSO) bylo postupně za míchání a chlazení na 0 °C přidáno 1 ml 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové (HCl) v metanolu, směs 0,5 ml butylnitritu a 4,5 ml dimethylsulfoxidu (DMSO) a po 5 min roztok 0,139 ml

triethylaminu a 39 mg N-(6-aminohexyl)-2,4-dinitroanilidu (AHDN) dichloridu v 10 ml dimethylsulfoxidu (DMSO). Reakční směs byla po 2 h dialyzována proti vodě a lyofilizována. Ve výsledném preparátu je na 11 % monomerních jednotek vázán N-(6-aminohexyl)-2,4-dinitroanilid (AHDN).

P ř í k l a d 11

K roztoku 45 mg polymeru z příkladu 6 v 10 ml 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové bylo za míchání a chlazení na 0 °C přidáno 10 ml 0,1 mol/l dusitanu sodného a po 5 min roztok 10 mg adriamycinu v 0,1 ml metanolu a 10 ml 0,1 mol/l hydrogenfosforečnanu sodného. Výsledný roztok byl po 2 h nanesen na kolonu plněnou Sephadexem G-26 a oddělená vysokomolekulární frakce byla lyofilizována. Ve výsledném preparátu byl na 9,6 % monomerních jednotek vázán adriamycin.

P ř í k l a d 12

K roztoku 50 mg polymeru z příkladu 2 v 10 ml 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové bylo za míchání a chlazení na 0 °C přidáno 10 ml 0,1 mol/l dusitanu sodného ( $\text{NaNO}_2$ ) a po 5 min roztok 40 mg cytosinu v 10 ml 0,1 mol hydrogenuhlíčitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ ). Po 2 h byla oddělena vysokomolekulární frakce gelovou filtrací přes Sephadex G-26. Ve výsledném preparátu byl na 0,5 % monomerních jednotek vázán cytosin.

P ř í k l a d 13

Reakce byla provedena stejně jako v příkladu 11, pouze místo adriamycinu bylo užito 38 mg cytosin- beta-D-arabinofuranosidu hydrochloridu (Ara-C). Ve výsledném preparátu byl na 0,6 % monomerních jednotek vázán Ara-C.

P ř í k l a d 14

Reakce byla provedena stejně jako v příkladu 1, pouze místo adriamycinu bylo použito 40 mg 5-aza-2'-deoxycytidinu (Aza-C). Ve výsledném preparátu byl na 0,6 % monomerních jednotek vázáno Aza-C.

P ř í k l a d 15

Reakce byla provedena stejně jako v příkladu 9, pouze místo N-(6-aminohexyl)-2,4-dinitroanilidu bylo použito roztoku 39 mg 4-amino-N-(2-aminoethyl)benzamidu hydrochloridu (AABH). Ve výsledném polymeru byl na 11 % monomerních jednotek vázán 4-amino-N-(2-aminoethyl)-benzamid hydrochlorid (AABH).

P ř í k l a d 16

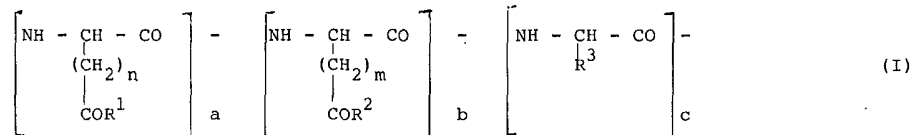
K 50 mg polymeru z příkladu 15 ve 2,5 ml 0,5 mol/l kyseliny chlorovodíkové (HCl) bylo za míchání a chlazení na 0 °C přidáno 0,25 ml 1 mol/l dusitanu sodného ( $\text{NaNO}_2$ ) a po 5 min 1 ml 2 mol/l uhličitany sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0,26 ml 1 mol/l hydrogensířičitanu sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) a po dalších 5 min 9 mg pankreatického inhibitoru trypsinu a kallikreinu (TKI, spec. anti-tryptická aktivita 4,2 BAPA J/mg) v 1 ml vody. Nenavázaný trypsin a kallikrein (TKI) byl oddělen od vysokomolekulární frakce gelovou filtrací přes Sephadex G-50. Výsledný vysokomolekulární preparát obsahoval 17 hmot. % trypsinu a kallikreinu (TKI) a vykazoval 0,15 antitryptických BAPA J/mg.

P ř í k l a d 17

K roztoku 45 mg polymeru z příkladu 1 v 10 ml 0,1 mol/l acetátového pufru pH 5,05 bylo přidáno 10 mg adriamycinu v 0,4 metanolu. Po 7 dnech byla vysokomolekulární frakce oddělena gelovou filtrací pře Sephadex G-25 a lyofilizována. Ve výsledném preparátu byl na 11 % monomerních jednotek vázán adriamycin.

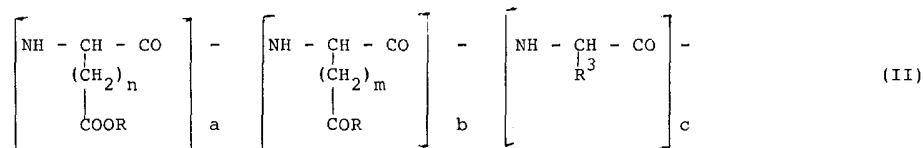
## P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Rozpuslné a biodegradovatelné kopolymery, aktivované pro vazbu biologicky aktivních látek, jejichž hlavní řetěz je tvořen jednotkami kyseliny asparagové nebo glutamové, popřípadě oběma, a jednotkami jiných aminokyselin, podle obecného vzorce I



kde  $n = 1$  nebo  $2$ ,  $m = 1$  nebo  $2$ ,  $a + b + c = 100$ ,  $a = 0,5$  až  $100$ ,  $b = 0$  až  $99,5$ ,  $c = 0$  až  $80$ , substituent  $\text{R}^1$  je vybrán ze skupiny sestávající z  $-\text{NH}-\text{NH}_2$ ;  $\text{N}=\text{N}$  nebo  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_x\text{NH}\cdot\text{CO}-$   $\text{O}-\text{NH}_2$ , kde  $x = 2$  až  $6$ ,  $\text{R}^2$  je  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_x\text{OH}$  kde  $x = 2$  až  $6$  a  $\text{R}^3$  je vybrán ze skupiny sestávající z metylu, 2-propylu, 2-metylpropylu, butylu, 2-butylu, fenetylů a 4-hydroxy-fenetylů, přičemž molekulová hmotnost je  $5\,000$  až  $1\,000\,000$ .

2. Způsob výroby kopolymeru podle bodu 1, vyznačený tím, že na polymer obecného vzorce II



kde  $\text{R}$  značí metyl nebo benzyl,  $n = 1$  nebo  $2$ ,  $m = 1$  nebo  $2$ ,  $a + b + c = 100$ ,  $a = 0,5$  až  $100$ ,  $b = 0$  až  $99,5$ ,  $c = 0$  až  $80$ ,  $\text{R}^2$  značí  $\text{R}$  nebo totéž co v bodě 1 a  $\text{R}^3$  značí totéž co v bodě 1, se působí při teplotě  $0$  až  $60^\circ\text{C}$  směsí primárního nebo sekundárního aminoalkyl-alkoholu s hydrazinem, kde alkyl je lineární nebo rozvětvený uhlovodíkový řetěz o počtu uhlíků  $2$  až  $6$ .

3. Způsob výroby kopolymerů dle bodu 1, vyznačený tím, že na poly(sukcinimid) se působí při  $0$  až  $60^\circ\text{C}$  směsí primárního nebo sekundárního aminoalkylalkoholu s hydrazinem, kde alkyl je lineární nebo rozvětvený uhlovodíkový řetěz o počtu uhlíků  $2$  až  $6$ .