PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C08G 69/10, 73/06, G01N 33/545, C07H 17/04 | A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/24437

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 1995 (14.09.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/00844

(22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1995 (07.03.95)

(30) Prioritätsdaten:
P 44 08 248.7 11. März 1994 (11.03.94) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: TOEPFER, Alexander [DE/DE]; Kirschgartenstrasse 12, D-65830 Kriftel (DE). KRETZSCHMAR, Gerhard [DE/DE]; Ulmenweg 10, D-65760 Eschborn (DE). BARTNIK, Eckart [DE/DE]; Karlsruher Strasse 8, D-65205 Wiesbaden (DE). SCHMIDT, Wolfgang [DE/DE]; Johannesallee 14, D-65929 Frankfurt (DE). HÖRSCH, Brigitte [DE/DE]; Königsberger Strasse 49, D-65830 Kriftel (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Zentrale Patentabteilung, Gebäude F 821, D-65926 Frankfurt am Main (DE).

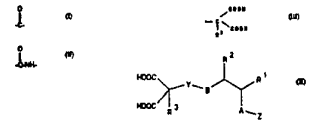
(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: POLYMER-CONJUGATED MALONIC ACID DERIVATIVES AND THEIR USE AS MEDICAMENTS AND DIAGNOSTIC AGENTS

(54) Bezeichnung: POLYMERKONJUGIERTE MALONSÄUREDERIVATE UND DEREN VERWENDUNG ALS ARZNEITMITTEL UND ALS DIAGNOSTIKA

(57) Abstract



The present invention concerns polymer-based polyvalent malonic acid derivatives having anti-adhesive properties and consisting of a polyamino acid which is linked in each case by a spacer of formula (I) -[-Q^1-CH_2)$_p$-Q^2-]$_r$-, in which Q^1 means -CH_2- or (i), Q^2 means -NH- or (ii), p is a number from 1 to 6 and r means 0 to 1, with at least one radical of formula (II) in which R^1 and R^2 together from a six-member carbo or heterocycle with at least one of the cycle substituents R^4, R^5 and R^6, and R^3 means H, $(CH_2)_mX$ or $CH_2O(CH_2)_mX^1$, A and B, independently of each other, mean O, S, NH, HN-CO, OC-NH, 0-CO, OC-O, NH-CO-O, O-CO-NH, S-CO, SC-O, O-CS-O, S-CS-S, NH-CS-S, S-CS-NH or CH_2, and Z means a pyranose, a furanose, an open-chain polyalcohol or Y-X^6, Y is -O- $(CX^2, X^3)_n$ is -O- $(CX^2, X^3)_n$, - $(CH^2, X^3)_n$ -CH_2- (CX^2, X^3) -$_n$ or a saturated or unsaturated, six-member carbo or heterocycle with at least one substituent R^9 or a combination of the chain -O- $(CX^2, X^3)_n$, - $(CX^2, X_3)_n$ and the carbo or heterocycle, in which R^4, R^5 and R^6, independently of each other, mean H, OH, -O- $(CH_2)_qX^4$, $CH_2O(CH_2)_qX^5$ or HNC (O)CH_3 and X, X^1, X^2 and X^3, independently of one another, mean H, NH_2, COOH, OH, CH_2OH, CH_2NH_2, C_1-C_{20} alkyl, C_6-C_{10} aryl, X^4 and X^5, independently of one another, mean -NH- or -O- and X^6 means OH or (iii), and m, n and q, independently of one another, mean a number between 1 to 20, by one of the cycle substituents R^4, R^5 or R^6. *In vivo* these derivatives do not cause intolerance reactions either when whole or when in the form of decomposition products. The invention further relates to a process for preparing these derivatives and their use as medicaments or in diagnostic agent.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft polyvalente Malonsäurederivate mit antiadhäsiven Eigenschaften auf Polymerbasis, bestehend aus einer Polyaminosäure, welche über jeweils einen Spacer der Formel (I) $-[-Q^1-(CH_2)_p-Q^2-]_r-$, worin Q^1 $-CH_2-$ oder (i) Q^2 -NH- oder (ii) p eine Zahl von 1 bis 6 und r 0 oder 1 bedeuten, mit wenigstens einem Rest der Formel (II), in der R^1 und R^2 gemeinsam einen sechsgliedrigen Carbo- oder Heterocyclus mit mindestens einem der Ringsubstituenten R^4, R^5 und R^6 bilden und R^3 H, $(CH_2)_mX$ oder $CH_2O(CH_2)_mX^1$ bedeutet, A und B unabhängig voneinander O, S, NH, HN-CO, OC-NH, O-CO, OC-O, NH-CO-O, O-CO-NH, S-CO, SC-O, O-CS-S, S-CS-O, NH-CS-S, S-CS-NH oder CH_2 bedeuten und Z eine Pyranose, eine Furanose, einen offenkettigen Polyalkohol darstellt oder $Y-X^6$ bedeutet, Y $-O-(CX^2, X^3)_n$, $-(CX^2,X^3)_n$, $-CH_2-(CX^2,X^3)-^n$ oder eine gesättigten oder ungesättigten, sechsgliedrigen Carbo- oder Heterozyklus mit mindestens einem Substituenten R^9 oder eine Kombination aus der Kette $-O-(CX^2,X^3)_n$,$-(CX^2,X^3)_n$ und dem Carbo- oder Heterozyklus darstellt, wobei R^4, R^5 und R^6 unabhängig voneinander H, OH, $-O-(CH_2)_qX^4$, $CH_2O(CH_2)_qX^5$ oder $HNC(O)CH_3$ und X, X^1, X^2 und X^3 unabhängig voneinander H, NH_2, COOH, OH, CH_2OH, CH_2NH_2, C_1-C_{20}-Alkyl oder C_6-C_{10}-Aryl, X^4 und X^5 unabhängig voneinander -NH- oder -O- und X^6 OH oder (iii) und m, n und q unabhängig voneinander eine Zahl von 1 bis 20 bedeuten, über einen der Ringsubstituenten R^4, R^5 oder R^6 verknüpft ist, die in vivo weder in ihrer Gesamtheit noch in Form von Abbauprodukten Unverträglichkeitsreaktionen hervorrufen, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel oder Diagnostika.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	**GA**	Gabon	**MR**	Mauretanien
AU	Australien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BJ	Benin	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BR	Brasilien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
CA	Kanada	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CG	Kongo	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CH	Schweiz	**KR**	Republik Korea	**SI**	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kasachstan	**SK**	Slowakei
CM	Kamerun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
ES	Spanien	**MG**	Madagaskar	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**ML**	Mali	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MN**	Mongolei	**VN**	Vietnam

POLYMER KONJUGIERTE MALONSAUREDERIVATE UND DEREN VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL UND ALS DIAGNOSTIKA

Die vorliegende Erfindung betrifft polyvalente Malonsäurederivate mit antiadhäsiven Eigenschaften auf Polymerbasis, die in vivo weder in ihrer Gesamtheit noch in Form von Abbauprodukten Unverträglichkeitsreaktionen hervorrufen, ihr Herstellungsverfahren und ihre Verwendung als Arzneimittel und Diagnostika.

Die auf der Oberfläche eukaryontischer Zellen befindlichen Glycoconjugate stellen spezifische Bindungsepitope für Transmembran-Proteine dar, welche man als Selektine bezeichnet. Diese Selektine, welche sowohl im Endothel als auch auf den verschiedenen zirkulierenden Zellen des hämatolymphischen Systems vorkommen, gehen spezifische Wechselwirkungen mit Kohlenhydrat-Epitopen (Liganden) des jeweils anderen Zelltyps ein (K.A. Karlsson, TIPS 12, (1991), 265-272).

Synthetische Analoga der Selektin-Liganden sind daher vielversprechende Kandidaten für Antiphlogistika und Antikoagulantien. Auch als Erkennungsdomänen für Viren, Bakterien und Toxine spielen Kohlenhydratliganden eine entscheidende Rolle und damit auch bei der Einleitung der entsprechenden Krankheiten (Prophylaxe, Diagnostik oder Therapie von bakteriellen und viralen Infektionen, entzündlichen Erkrankungen, rheumatische Arthritis, Allergien, Nachinfarktsyndrom, Schock, Schlaganfall, akute und chronische Organabstoßung, Vasculitis, Sepsis, Schocklunge, usw.).

ORIGINAL UNTERLAGEN

Da Krebszellen ein anderes Muster dieser Kohlenhydratstrukturen aufweisen als gesunde Zellen, ermöglicht dies die Verwendung dieser Mimetika einerseits als Marker, andererseits zur Bekämpfung von Tumorzellen, insbesondere bei metastasierenden Tumoren (S.I. Hakomori, Cancer Cells, December 1991, Vol.3, No. 12).

Von besonderer Bedeutung als Mediatoren der Zelladhäsion sind sialylierte und / oder fucosylierte Kohlenhydrate wie z.B. Sialyl-Lewis X und Sialyl-Lewis-A (Lowe et al, Cell, 63, 475-85, 1990).

Mit dem Ziel einer Vereinfachung der sehr aufwendigen Synthesen dieser Verbindungen bei Erhaltung oder Verbesserung ihrer Bindungsaffinitäten zu den entsprechenden Selektinen wurden bereits einfachere Strukturen vorgeschlagen und teilweise synthetisiert. So wurde z.B. Neuraminsäure durch Milch- oder Glycolsäure und/oder Fucose durch Glycerin bzw. Trifluormethylfucose und/oder N-Acetylglucosamin durch Glucosamin oder Glucose ersetzt (PCT/US 92/09870). Eine Substitution von Neuraminsäure durch Sulfat oder Phosphat ist ebenfalls beschrieben (PCT/CA 92/00245). Beschrieben ist außerdem eine Substitution von Glucosamin durch eine Kette von mindestens 2 Kohlenstoffatomen (WO 92/18610).

Die Therapie entzündlicher Erkrankungen mit freien Oligosacchariden, die anstelle der natürlichen Liganden an Rezeptoren binden sollen, scheitert an den sehr hohen Mengen des zu verabreichenden Oligosaccharids, da die Affinität zwischen Rezeptor und Oligosaccharid gering ist ($K_D \sim 10^{-4}$M bei der Wechselwirkung zwischen einem monovalenten Galactosid und dem entsprechenden Lectin D. T. Connolly et al. J. Biol. Chem. 257, 939, (1982)) .

Divalente Strukturen mit z.T. besserer Bindung an den jeweiligen Rezeptor werden von Wong et al. (J. Am. Chem. Soc. 115, 7549 (1993)) und in der US 5,254,676 beschrieben.

Es ist außerdem bekannt, daß eine erhöhte Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand durch die Kopplung mehrerer Liganden auf einer Oberfläche erreicht wird. Am Beispiel des Virusproteins Hemaglutinin, das an Neuraminsäure auf der Zelloberfläche bindet, konnte gezeigt werden, wie durch Verwendung eines Polymers dieser polyvalente Effekt sich signifikant auf die Wechselwirkung Ligand-Rezeptor auswirkt (monovalent K_D = $2x20^{-4}$M, polyvalent K_D = $3x10^{-7}$M, A. Spaltenstein et al. J. Am. Chem. Soc. 113, 686 (1991)).

Als Oberflächen wurden bisher Liposomen (N. Yamazaki, Int. J. Biochem. 24, 99 (1991); WO 91/19501; WO 91/19502), Polyacrylamide (R.C. Rathi et al. J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem. 29, 1895 (1991), S.-I. Nishimura et al. Macromolecules 24, 4236 (1991)), Polylysin oder sulfatierte Polysaccharide verwendet. Diese polyvalenten Strukturen haben den Nachteil entweder in vivo nur wenig stabil oder durch Abbau in toxische Metaboliten in vivo unverträglich zu sein. Bei Polylysin oder sulfatierten Polysacchariden treten unspezifische Wechselwirkungen mit Zelloberflächenstrukturen auf.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, polyvalente Malonsäurederivate auf Polymerbasis mit antiadhäsiven Eigenschaften bereitzustellen, die in vivo weder in ihrer Gesamtheit noch in Form von Abbauprodukten Unverträglichkeitsreaktionen hervorrufen. Diese sollen gegenüber den natürlichen Liganden eine vergleichbare oder stärkere Wechselwirkung mit dem Rezeptor aufweisen und sich im Vergleich mit den näturlichen Kohlenhydrat-Liganden einfacher und in größeren Mengen herstellen lassen.

Es ist ferner die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, auf Basis dieser polymeren und polyvalenten Malonsäurederivate Arzneimittel zur Therapie oder Prophylaxe und Mittel zur Diagnose von Krankheiten verfügbar zu machen, bei welchen bakterielle oder virale Infektionen, metastasierende Tumore oder endzündliche Prozesse beteiligt sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Verbindung bestehend aus einer Polyaminosäure, welche über jeweils einen Spacer der Formel I,

$$-[-Q^1-(CH_2)_p-Q^2-]_r- \qquad I,$$

worin

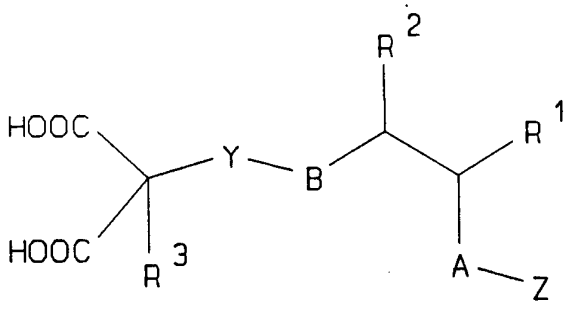
Q^1 $-CH_2-$ oder $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-$,

Q^2 $-NH-$ oder $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH-$,

p eine Zahl von 1 bis 6 und

r 0 oder 1 bedeuten,

mit wenigstens einem Rest der Formel II



II,

in der

R^1 und R^2	gemeinsam einen sechsgliedrigen Carbo- oder Heterocyclus mit mindestens einem der Ring-substituenten R^4, R^5 und R^6 bilden und
R^3	H, $(CH_2)_mX$ oder $CH_2O(CH_2)_mX^1$ bedeutet,
A und B	unabhängig voneinander O, S, NH, HN-CO, OC-NH, O-CO, OC-O, NH-CO-O, O-CO-NH, S-CO, SC-O,

O-CS-S, S-CS-O, NH-CS-S, S-CS-NH oder CH_2 bedeuten und

Z eine Pyranose, eine Furanose, einen offenkettigen Polyalkohol darstellt oder Y-X^6 bedeutet,

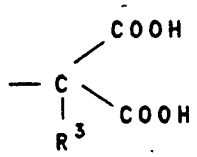
Y $-O-(CX^2,X^3)_n$, $-(CX^2,X^3)_n$, $-CH_2-(CX^2,X^3)_n$ oder einen gesättigten oder ungesättigten, sechsgliedrigen Carbo- oder Heterozyklus mit mindestens einem Substituenten R^9 oder eine Kombination aus der Kette $-O-(CX^2,X^3)_n$,$-(CX^2,X^3)_n$ und dem Carbo- oder Heterozyklus darstellt, wobei

R^4, R^5 und R^6 unabhängig voneinander H, OH, $-O-(CH_2)_qX^4$, $CH_2O(CH_2)_qX^5$ oder $HNC(O)CH_3$ und

X, X^1, X^2 und X^3 unabhängig voneinander H, NH_2, COOH, OH, CH_2OH, CH_2NH_2, C_1-C_{20}-Alkyl oder C_6-C_{10}-Aryl,

X^4 und X^5 unabhängig voneinander -NH- oder -O- und

X^6 OH oder



und

m, n und q unahängig voneinander eine Zahl von 1 bis 20 bedeuten,

über einen der Ringsubstituenten R^4, R^5 oder R^6 verknüpft ist.

Vorzugsweise ist die Polyaminosäure Polysuccinimid, Polyaspartamid, Polyglutamat oder Polylysinfumaramid, oder die Polyaminosäure ist ein Copolymer aus Polysuccinimid und Polyaspartamid, ein Copolymer aus Polyhydroxyethylaspartamid und Polyaspartamid oder ein Copolymer aus Polysuccinimid, Polyaspartamid und Polyhydroxyethylaspartamid.

Vorzugsweise zeichnet sich die erfindungsgemäße Verbindung dadurch aus, daß in dem Rest der Formel II R1 und R2 gemeinsam einen substituierten Tetrahydropyranring bilden,

A und B O,

Z eine -Fucopyranosyl-Gruppe und

Y $(CX^2,X^3)_n$ bedeuten, wobei

R^3, X^2 und X^3 H bedeuten und n für 5 steht.

Vorzugsweise bedeuten die Substituenten des Tetrahydropyranrings R^4 und R^5 jeweils H, der im Tetrahydropyranring zwischen dem Ringheteroatom O und dem Ringsubstituenten -A-Z liegende Substituent R6 $-CH_2O(CH_2)_qX^5$ und X^5 -NH-; besonders bevorzugt steht q für 2.

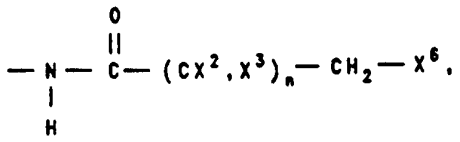
Vorzugsweise ist der Tetrahydropyranring eine Pyranose.

Besonders bevorzugt ist die Pyranose N-Acetyl-D-glucosamin.

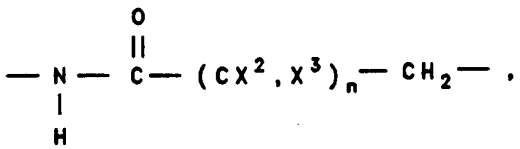
Vorzugsweise ist die Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung auch dadurch gekennzeichnet, daß

R^1 und R^2 gemeinsam einen sechsgliedrigen Carbocyclus bilden,

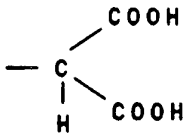
A-Z



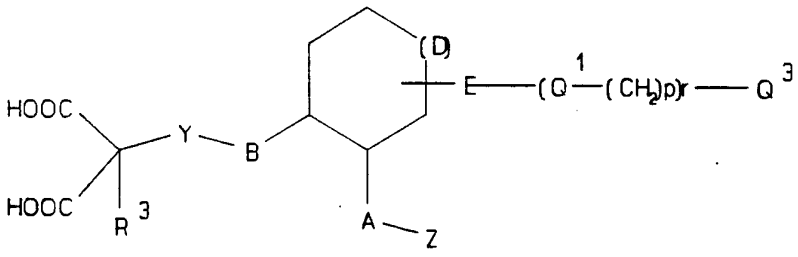
-B-Y-



R^3 und X^2 H, X^3 und X^6 OH und n 4 bedeuten, oder wahlweise dadurch gekennzeichnet ist, daß

X^6  bedeutet.

Die eingangs gestellte Aufgabe wird ferner durch ein Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen Verbindung gelöst, welches sich dadurch auszeichnet, daß die kovalente Verknüpfung des Polymers mit einer Verbindung der Formel III

 III,

worin

(D) -NH-, -O- oder $-CH_2-$,

E für r = 1 $-O-(CH_2)_q-NH-$, $-O-(CH_2)_q-O-$, $-CH_2O(CH_2)_q-NH-$ oder $-CH_2O(CH_2)_q-O-$ und

für r = 0 $-O-(CH_2)_q-$, $-O-(CH_2)_q-$, $-CH_2O(CH_2)_q-$ oder $-CH_2O(CH_2)_q-$ und

Q^3 -OH, $-NH_2$ oder $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OH$ bedeuten und

die übrigen Variablen die vorgenannten Bedeutungen haben, durch Reaktion zwischen einer reaktiven und einer aktivierten Gruppe erfolgt.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Arzneimittel, enthaltend die Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung und gegebenfalls pharmazeutische Träger.

Die Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung eignet sich vorteilhaft zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie oder Prophylaxe von Krankheiten, bei welchen bakterielle oder virale Infektionen, entzündliche Prozesse oder metastasierende Tumoren involviert sind.

Die erfindungsgemäße Verbindung ist vorteilhaft auch geeignet zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von Krankheiten, bei welchen bakterielle oder virale Infektionen, entzündliche Prozesse oder metastasierende Tumoren involviert sind.

Die Erfindung wird im folgenden detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen:

Das polyvalente Malonsäurederivat auf Polymerbasis ist physiologisch verträglich und hat vorzugsweise ein Molekulargewicht von <70 kD. Gut verträglich bedeutet, daß durch die Verbindung keine Unverträglichkeitsreaktionen hervorgerufen werden. Das Malonsäurederivat und das Polymer alleine dürfen in vivo nicht schädigend für den Organismus sein, sie dürfen also nicht hämolytisch, nicht antigen und nicht thrombogen wirken.
Das polyvalente Malonsäurederivat ist physiologisch abbaubar, d.h. es ist in vivo als ganzes Molekül ausscheidbar oder in vivo zu kleinen physiologisch verträglichen Bausteinen abbaubar, um in dieser Form ausscheidbar (biodegradabel) zu sein. Dies gilt insbesondere für das Polymer.
Über die Abbaubarkeit in vivo wird die Verweildauer am jeweiligen Rezeptor und damit die Wirkzeit gesteuert. So kann z. B. über die Wahl der Polymerbausteine

und deren Verknüpfung die Abbaubarkeit gesteuert werden. Bei Überschuß der Verbindung kann so eine Akkumulation im Organismus verhindert werden.

Die Begriffe Rezeptor und Ligand werden wie folgt definiert:
Ein Rezeptor ist ein Makromolekül auf der Oberfläche der Zelle, welches aufgrund seiner Konfiguration eine Bindungsstelle zur spezifischen Bindung einer, selten mehrerer Signalsubstanzen besitzt. Dies Signalsubstanz wird als Ligand bezeichnet. Ziel der Bindung des Liganden an den Rezeptor ist die Informationsübertragung in die Zelle und anschließende Zellstoffwechseländerung.

Der Belegungsgrad des Polymers mit dem Malonsäurederivat gibt den prozentualen Anteil der Repetiereinheiten des Polymers, an die das Malonsäurederivat geknüpft ist, bezogen auf die Gesamtheit der Repetiereinheiten an.

Grundsätzlich erfolgt die Synthese durch kovalente Knüpfung des Malonsäurederivats über einen Spacer an ein Polymer.

Der Spacer ist eine physiologisch verträgliche, natürliche oder synthetische Verbindung, die die Aufgabe der räumlichen Trennung von Malonsäurederivat und Polymer hat. Diese räumliche Trennung ist notwendig, um eine optimale Zugänglichkeit des Liganden für den Rezeptor zu gewährleisten.
Um eine Kopplung des Spacers an das Malonsäurederivat zu gewährleisten, muß der Spacer bifunktionell sein.

Die Herstellung von biodegradablem, hydrophilen Polymer erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren. Diese sind z. B. beschrieben in: H.G. Elias, Makromoleküle, Bd. 1 und 2, Hüthig & Wepf Verlag, Basel, Schweiz, 1991/92 oder D. Braun, H. Cherdron, W. Kern, Praktikum der Makromolekularen Organischen Chemie, Hüthig Verlag 1979.
Polymere, die in ihrer Funktion als Träger Bestandteil des polyvalenten

Malonsäurederivats sind und diagnostische oder therapeutische Verwendung finden sollen, müssen grundsätzlich eine Reihe von Anforderungen erfüllen, um physiologisch gut verträglich zu sein:

- keine Immunantwort zu induzieren und
- um unspezifische Wechselwirkungen und Kumulation im Retikoendothelialen System zu vermeiden.

Definitionsgemäß besteht das Polymer aus wenigstens zwei gleichen oder veschiedenen Monomerbausteinen, die linear oder verzweigt miteinander verknüpft sind und eine Molekulargewichtsverteilung aufweisen können.

Das Polymer ist vorzugsweise eine Polyaminosäure als Polyamid oder -anhydrid verknüpft mit einem Molekulargewicht kleiner oder gleich 70 kD. Vorzugsweise hat das Polymer eine Mindestgröße von 2 kD, um im Vergleich zu niedermolekularen Trägern eine erhöhte Verweilzeit im Blut zu erzielen.

Für die Herstellung von Malonsäurederivaten auf Polymerbasis besonders bevorzugt geeignete Polyaminosäuren sind Polyaspartamide, Polysuccinimide, Polyglutamate und Polylysinfumaramide sowie deren Copolymere.

Der Belegungsgrad des Polymers mit dem Malonsäurederivat via Spacer liegt zwischen 0.5 und 50 Mol%, vorzugsweise zwischen 2-25 Mol%.

Das Polymer kann Träger mehrerer, über Spacer gekoppelter Malonsäurederivate sein oder nur ein Malonsäurederivat tragen. Die Anzahl der vom Polymer getragenen Malonsäurederivate richtet sich nach der medizinischen Verwendung und Wirksamkeit des erfindungsgemäßen polyvalenten Malonsäurederivats.

Die kovalente Verknüpfung des Polymers mit dem Spacer bzw. mit einer Verbindung bestehend aus kovalent verküpftem Spacer und Malonsäurederivat erfolgt durch Reaktion zwischen einer reaktiven und einer aktivierten Gruppe. Dabei können sich sowohl die reaktive Gruppe am Ende des Spacers bzw. einer

Verbindung bestehend aus kovalent verknüpftem Spacer und Malonsäurederivat und die aktivierte Gruppe auf Seiten des Polymers als auch die aktivierte Gruppe am Ende des Spacers bzw. einer Verbindung aus kovalent verknüpftem Spacer und Malonsäurederivat und die reaktive Gruppe auf Seiten des Polymers befinden.

Eine reaktive Gruppe auf Seiten des Malonsäurederivats oder Spacers kann eine OH-, NH_2- oder COOH-Gruppe sein. Eine aktivierte Gruppe auf Seiten des Polymers oder Spacers kann ein Carbamat, z.b. ein Nitrophenylcarbamat, ein Hydroxysuccinimid-Derivat, ein Carbonsäureanhydrid oder ein aus der freien Carbonsäure nach bekannten Methoden aus der Peptidchemie zugänglicher Aktivester sein (z.B. Succinimid-Ester, Hydroxysuccinimid-Ester, gemischtes Anhydrid etc.)

Die Reaktion zwischen reaktiven und aktivierten Gruppen erfolgen nach dem Fachmann bekannten Verfahren zur Alkylierung, Acylierung oder Addition an eine Doppelbindung. Diese Verfahren sind dem Fachmann aus der Literatur bekannt. (Larock, R.C. Comprehensive Organic Transformations, 1989, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim).

Ist die aktivierte Gruppe eine Aminogruppe und die reaktive Gruppe eine Carbonsäure, wird die kovalente Verknüpfung durch in der Peptidchemie gängige Aktivierungsmethoden (Carbodiimid, Aktivester, gemischte Anhydride) durchgeführt.

Die erfindungsgemäßen polymerkonjugierten Malonsäurederivate können eine höhere Affinität zu den natürlichen Rezeptoren, beispielsweise zu E- und P-Selektin, als die natürlichen Kohlenhydratliganden haben, wie anhand der nachfolgend beschriebenen Zelladhäsionsassays nachgewiesen werden kann.

1. 96er Mikrotitertestplatten (Nunc Maxisorb®) werden mit 100 µl eines in 50 mM Tris pH 9,5 verdünnten (1 + 100) Ziege anti human IgG

Antikörpers (Sigma®) 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung wird einmal mit PBS gewaschen.

2. 150 µl des Blockierungspuffers werden für 1 Std. bei Raumtemperatur in den Näpfchen belassen. Die Zusammensetzung des Blockierungspuffers ist:
0,1 % Gelatine, 1 % BSA, 5 % Kalbserum, 0,2 mM PMSF, 0,02 % Natriumazid. Nach Entfernen des Blockierungspuffers wird einmal mit PBS gewaschen.

3. In die Näpfchen werden je 100 µl Zellkulturüberstand von entsprechend transfektierten und exprimierenden COS-Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgt 2 Std. bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Zellkulturüberstandes wird einmal mit PBS gewaschen.

4. In die Näpfchen werden 20 µl Bindungspuffer gegeben. Der Bindungspuffer hat die Zusammensetzung: 50 mM Hepes, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mg/ml BSA;
2 mM $MgCl_2$; 1mM $CaCl_2$; 3 mM $MnCl_2$; 0,02 % Natriumazid; 0,2 mM PMSF. Dazu werden 5 µl der Testsubstanz pipettiert, durch Schwenken der Platte vermischt und 10 Min. bei Raumtempeartur inkubiert.

5. 50 ml einer HL60 Zellkultur mit 200.000 Zellen/ml werden 4 Min. bei 350 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml RPMI 1640 resuspendiert und die Zellen erneut zentrifugiert. Zur Markierung der Zellen werden 50 µg BCECF-AM (Molecular Probes®) in 5 µl wasserfreiem DMSO aufgelöst; anschließend werden 1,5 ml RPMI 1640 auf die BCECF-AM/DMSO-Lösung gegeben. Mit dieser Lösung werden die Zellen resuspendiert und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 350 g wird das markierte Zellpellet in 11 ml Bindungspuffer resuspendiert und die resuspendierten Zellen in 100 µl Aliquots in die Mikrotiterplatten-Näpfchen verteilt. Die Platte wird 10 Min.

bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Zellen auf den Boden der Testplatte sedimentieren zu lassen. Dabei haben die Zellen Gelegenheit an das beschichtete Plastik zu adhärieren.

6. Zum Abstoppen des Tests wird die Mikrotiterplatte im 45° Winkel gänzlich in den Stoppuffer getaucht (25 mM Tris, pH 7,5; 125 mM NaCl; 0,1 % BSA; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM $CaCl_2$; 3 mM $MnCl_2$; 0,02 % Natriumazid). Durch Invertierung wird der Stoppuffer aus den Näpfchen entfernt und die Prozedur noch zweimal wiederholt.

7. Die Messung der in den Näpfchen festhaftenden, BCECF-AM-markierten Zellen erfolgt in einem Cytofluorimeter (Millipore®), bei einer Empfindlichkeitseinstellung von 4, einer Anregungswellenlänge von 485/22 nm und einer Emissionswellenlänge von 530/25 nm.

Die polymerkonjugierten Malonsäurederivate gemäß der vorliegenden Erfindung stellen allesamt potentielle Liganden für die bisher bekannten Selektine (Proteine, welche auf dem Endothel und anderen Zelloberflächen exprimiert und an spezifische Kohlenhydrat-Liganden binden) dar.

Die erfindungsgemäßen polymerkonjugierten Malonsäurederivate können demzufolge als Anti-Adhäsionstherapeutika eingesetzt werden und verhindern im Fall von Entzündungen, daß die ELAM-1-Rezeptoren auf stimulierten Endothelzellen an Sialyl Lewis-X-Strukturen auf der Oberfläche von Leukozyten binden. Im Fall der Influenza-Therapie verhindern die polymerkonjugierten Malonsäurederivate die Anheftung von Viren an die Neuraminsäure auf der Zelloberfläche und damit auch die Endozytose der Viruspartikel.

Aus diesem Sachverhalt ergibt sich die Möglichkeit zur Prophylaxe, Diagnostik oder Therapie selektinvermittelter Krankheiten. Hierzu gehören beispielsweise:

1. Autoimmunkrankheiten:

Rheumatische Arthritis, Multiple Sklerose, entzündliche Knochenerkrankungen, Lupus, Myasthenia gravis, Allergien, Osteoarthritis, Asthma, Kontakt-Dermatitis, Psoriasis, Adult respiratory distress syndrome, Transplantatabstoßung.

2. Infektionen:

Schnupfen, Grippe, Helicobacter pylori, Malaria, Septischer Schock.

3. Krebs:

Colorectal, Brust, Eierstöcke, Prostata.

4. Zentrales Nervensystem:

Schlaganfall, Trauma

5. Reperfusionsverletzungen:

Myocardinfarkt, Angioplastie, instabile Angina, systemischer Schock

6. Weitere:

Osteroporose, Wunden und schwere Verbrennungen.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden im allgemeinen intravenös, oral oder parenteral oder als Implantate verabreicht, aber auch eine rektale Anwendung ist prinzipiell möglich. Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Tabletten, Dragees, (Mikro-)Kapseln, Zäpfchen, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole, Tropfen oder injizierbare Lösungen in Ampullenform sowie Präparate mit protrahierte Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung üblicherweise Trägerstoffe und Zusätze und/oder Hilfsmittel wie Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel oder Lösungsvermittler Verwendung finden. Als häufig verwendete Träger- oder Hilfsstoffe seien z. B. Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Vitamine, Cellulose und

ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle, Polyethylenglykole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser, Alkohole; Glycerin und mehrwertige Alkohole genannt.

Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht. Feste Dosierungseinheiten sind Tabletten, Kapseln und Suppositorien.

Für die Behandlung eines Patienten sind je nach Wirksamkeit der Verbindung, Art der Applikation, Art und Schwere der Erkrankung, Alter und Körpergewicht des Patienten, unterschiedliche Tagesdosen notwendig. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber mehrerer kleiner Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilten Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen. Die zu verabreichende Tagesdosis kann außerdem von der Anzahl der während des Krankheitsverlaufs exprimierten Rezeptoren abhängig sein. Es ist vorstellbar, daß im Anfangsstadium der Krankheit nur wenige Rezeptoren auf der Zelloberfläche expirmiert werden und demzufolge die zu verabreichende Tagesdosis geringer ist als bei stark erkrankten Patienten.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden dadurch hergestellt, daß man ein polymerkonjugiertes Malonsäurederivat gemäß der vorliegenden Erfindung mit üblichen Träger- sowie gegebenenfalls Zusatz- und/oder Hilfsstoffen in die bzw. eine geeignete Darreichungsform bringt.

Die Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung ist auch zur Herstellung von Antikörpern zur diagnostischen Bestimmung von Liganden geeignet, welche nicht zugänglich, nicht immunogen genug oder unbekannt sind.

Bei vielen Autoimmunerkrankungen und Tumoren sind bestimmte Liganden bzw. Antigene auf der Zellmembran hochreguliert. Diese sind aber häufig nicht

bekannt, lassen sich nicht rein isolieren oder sind nicht genug immunogen, um daraus Antikörper herstellen zu können.

Die Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung kann zur Gewinnung von Antikörpern dienen, welche mit Epitopen der natürlichen, unbekannten bzw. nicht zugänglichen Liganden kreuzreagieren. Neben den diagnostischen Anwendungen sind für die auf diese Weise gewonnenen Antikörper auch therapeutische Anwendungen denkbar (A. N. Houghton, D. A. Scheinberg, Semin. Oncol. 13 (1986) 165-179; W. C. Eckelmann, In Vivo Diagnosis and Therapy of Human Tumors with Monoclonal Antibodies; Pergamon Press,London 1988; M. H. Ravindranath, D. L. Morton, R. F. Irie, Cancer Res. 49 (1989) 3891-3897).

Im folgenden werden beispielhaft die Vorschriften für die Synthese eines erfindungsgemäßen polymerkonjugierten Malonsäurederivates beschrieben.

Beispiel 1

Synthese von 4,6-Isopropyliden-1,2-didesoxyglucose (1):

Eine Lösung von Tri-O-acetyl-D-glucal (30 g, 110.17 mmol) in Dioxan (400 ml) wird mit Palladiumkohle (10%, 3g) 24 h in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Die Mischung wird durch Kieselgur filtriert und eingeengt. Zur Abspaltung der Acetylgruppen wird der Rückstand in Methanol (500 ml) aufgenommen und eine 1 M Natriummethanolatlösung (6 ml) zugegeben. Nach 90 min wird mit Amberlite IR-120 neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird mit Toluol (3 x 250 ml) coevaporiert und in DMF (500 ml) aufgenommen. Zu der Lösung gibt man Dimethoxypropan (140 ml, 114,6 mmol) und p-Toluolsulfonsäure (400 mg). Nach 18 h gibt man Triethylamin (3 ml) zu, läßt noch 15 min rühren und engt im Hochvakuum ein. Chromatographie (Toluol/Aceton 4:1) liefert 1d (33 g, 80 %).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.41, 1.51 (2s, 6H, 2 CH_3), 1.76 (ddd, 1H, 2-H), 2.0 (ddd, 1H, 2-H), 2.8 (d, 1H, OH), 3.16 (m, 1H, 1-H), 3.46 (dd, 1H, 6-H), 3.53 (m, 1H, 1-H), 3.7 (dd, 1H, 6-H), 3.86 (dd, 1H, 4-H), 3,96 (m, 1H, 5-H).

Synthese von 4-Allyloxy-1-p-toluolsulfonyloxy-pentan (2):

Eine Mischung aus Pentandiol (21.8 ml, 207 mmol), Allylbromid (11.7 mmol, 138 mmol), Kaliumcarbonat (21 g, 151.8 mmol) und Dibenzo-18-crown-6 wird 24 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird mit Dichlormethan (250 ml) verdünnt und 2 x mit Wasser (je 100 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und der Rückstand mit Pyridin (50 ml, 600 mmol), Dichlormethan (700 ml) und p-Toluolsulfonsäurechlorid (40 g, 207 mmol) gerührt. Nach 16 h wird mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, die organische Phase getrocknet und eingeengt.
Flash-Chromatographie (Hexan/Essigester 6:1 → 5:1) liefert Verbindung 2 (19.9g, 53%)
^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.39, 1.53, 1.66 (3m, 6H, -CH_2-CH_2-CH_2-), 2.45 (s, 3 H, CH_{3tos}), 3.38 (t, 2H, OCH_2-), 3.93 (m, 2H, O-CH_2-CH=CH_2), 4.01 (t, 2H, OCH_2-), 5.20 (m, 2 H, O-CH_2-CH=CH_2), 5.88 (m, 1H, O-CH_2-CH=CH_2), 7.34, 7.78 (2 m, 4H, Tosyl-H_{aromat}).

Synthese von 4-Allyloxy-1-hydroxybutyl-(1→3)-1,2-didesoxyglucose (3):

Zu einer Lösung aus 1 (10 g, 53.47 mmol) in Dimethylformamid (100 ml) gibt man Natriumhydrid (1.56 g, 65 mmol). Nach 30 min tropft man eine Lösung von 2 (19 g, 63.8 mmol) zu. Nach 18 h gibt man Wasser (5 ml) zu, verdünnt mit Ether und wäscht die organische Phase mit Wasser und engt sie anschließend ein. Der Rückstand wird mit Tetrahydrofuran (150 ml) und 1 M Salzsäure (5 ml) aufgenommen und auf 60 °C erwärmt. Nach 90 min wird im

Vakuum eingeengt, mit Toluol coevaporiert und der Rückstand mit Hexan/Essigester 1:1 → 1:3 chromatografiert. Man erhält 3 (12.1 g, 83%).
^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.02 (m, 1 H, 2-H), 2.58 (bt, 1H, OH), 3.93 (m, 2H, O-CH_2-CH=CH_2), 5.22 (m, 2 H, O-CH_2-CH=CH_2), 5.92 (m, 1H, O-CH_2-CH=CH_2).

Synthese von 4-Allyloxy-1-hydroxybutyl-(1→3)-6-O-p-toluolsulfonyl-1,2-didesoxyglucose (4):

Zu einer eiskalten Lösung von 3 (19 g, 69.3 mmol) in Pyridin (100 ml) gibt man Tosylchlorid (15.9 g, 83.2 mmol). Nach 18 h bei 0 °C wird im Vkuum eingeengt, mit Toluol coevaporiert und der Rückstand mit Ether aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und chromatografiert (Hexan/Essigester 3:1). Ausbeute: 28.5 g, (96%).
^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.02 (m, 1 H, 2-H), 2.4 (s, 3H, CH_3), 2.73 (bs, 1H, 4-OH), 3.95 (m, 2H, O-CH_2-CH=CH_2), 5.22 (m, 2 H, O-CH_2-CH=CH_2), 5.9 (m, 1H, O-CH_2-CH=CH_2), 7.32, 7.80 (2m, 4H, H_{tos}).

Synthese von 4-Allyloxy-1-hydroxybutyl-1→3)-2-azido-1-hydroxyethyl-(1→6)-1,2-didesoxyglucose (5):

Zu einer Lösung aus Azidoethanol (5 g, 57.5 mmol) in Dimethylformamid (100 ml) gibt man Natriumhydrid (1.56 g, 65 mmol). Nach 30 min tropft man eine Lösung von 4 (4.93 g, 11.5 mmol) zu. Nach 18 h gibt man Wasser (5 ml) zu, verdünnt mit Ether und wäscht die organische Phase mit Wasser und engt sie anschließend ein. Der Rückstand wird chromatografisch (Hexan/Essigester 2:1 1:1) gereinigt. Ausbeute: 3.58 g (91%).
^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.02 (m, 1 H, 2-H), 2.78 (d, 1H, 4-OH), 3.96

(m, 2H, O-CH_2-CH=CH_2), 5.22 (m, 2 H, O-CH_2-CH=CH_2), 5.9 (m, 1H, O-CH_2-CH=CH_2).

Synthese von 4-Allyloxy-1-hydroxybutyl-(1→3)-[(2,3,4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyranosyl)-(1→4)]-2-azido-1-hydroxyethyl-(1→6)-1,2-didesoxyglucose (6):

Zu einer Lösung von 5 (1.76 g, 5.13 mmol) in Ether (30 ml) gibt man eine 0.1 M Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-Lösung (0.51 ml) und tropft anschließend eine Lösung von O-(2,3,4-Tri-O-benzyl-L-fucopyranosyl)-trichloracetimidat binnen 15 min dazu. Nach weiteren 15 min wird mit Natriumhydrogencarbonat (0.5 g) neutralisiert , filtriert und eingeengt. Chromatographie (Dichlormethan/Methanol 80:1) liefert 6 (3.43 g, 88%).

Synthese von 1,4-Dihydroxybutyl-(1→3)-[(2,3,4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyranosyl)-(1→4)]-2-azido-1-hydroxyethyl-(1→6)-1,2-didesoxyglucose (7):

Zu einer Lösung aus 6 (3.43 g, 4.52 mmol) in Tetrahydrofuran (34 ml) gibt man eine Lösung aus vorhydriertem Bis(methyldiphenylphosphin)-cyclooctadieniridium-I- hexafluorophosphat (52 mg, 0.06 mmol) in THF (5 ml). Nach 90 min gibt man Wasser (2 ml) und Iod (1.076 g) dazu und rührt weitere 2 h. Es wird mit Dichlormethan verdünnt, mit einer 20%igen Natriumthiosulfatlösung und anschließend Wasser gewaschen. Der nach dem Einengen erhaltene Rückstand wird chromatographiert (Hexan/Essigester 1:1 → 2:1). Man erhält Verbindung 7 (2.21 g, 68%).

Synthese von 4-Toxyloxy-1-hydroxybutyl-(1→3)-[(2,3,4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyranosyl-(1→4)]-2-azido-1-hydroxyethyl-(1→6)-1,2-didesoxyglucose (8):

Zu einer eiskalten Lösung von 7 (618 mg, 0.86 mmol) in Pyridin (5 ml) gibt man Tosylchlorid (212 mg, 1.11 mmol). Nach 24 h wird im Vakuum eingeengt, mit Toluol coevaporiert, der Rückstand in Ether aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Chromatographie (Hexan/Essigester 3:1 2:1) liefert Verbindung 8 (533 mg, 71%).
^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.09 (d, 3H, 6-H_{fuc}), 2.43 (s, 3 H, CH_3), 5.05 (d, 1H, 1-H).

Synthese von 4-Dimethylmalonyl-1-hydroxybutyl-(1→3)-[(2,3,4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyranosyl)-(1→4)]-2-azido-1-hydroxyethyl-(1→6)-1,2-didesoxyglucose (8):

Eine Mischung aus 8 (986 mg, 1.13 mmol), Malonsäuredimethylester (17 ml), Kaliumcarbonat (1.08 g) und Dibenzo-18-crown-6 wird 1 h bei 100 °C gerührt. Man verdünnt mit Essigester, filtriert über Kieselgel und engt den Rückstand im Hochvakuum bei 70 °C ein. Chromatographie (Hexan/Essigester 3:12:1) liefert 8 (684 mg, 73%).
^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 1.12 (d, 3H, 6-H_{fuc}), 3.72 (2s, 6H, 2CH_3), 5.05 (d, 1H, 1-H).

Synthese von 4-Malonyl-1-hydroxybutyl-(1→3)-[α-L-fucopyranosyl-(1→4)]-2-amino-1-hydroxyethyl-(1→6)-1,2-didesoxyglucose (9):

Zu einer Lösung aus 8 (506 mg, 0.608 mmol) in Methanol gibt man succesiv soviel 2 M Natronlauge, daß gerade nichts ausfällt. Nach vollständiger Verseifung wird mit Amberlite® IR-120 neutralisiert, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wird mit Dioxan/Wasser (9 : 1, 15 ml) aufgenommen, mit

Palladiumkohle (10%, 400 mg) versetzt und 18 h in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Filtration und Chromatographie mittels Biogel® P2 liefern 9 (281 mg, 91%).

^{1}H-NMR (300 MHz, D_2O): δ = 1.06 (d, 3H, 6-H_{fuc}), 1.18 (m, 4H, 2 CH_2), 1.45 (2m, 3H, 1-H, CH_2), 1.60 (m, 2H, CH_2), 2.14 (m, 1H, 1-H), 4.26 (q, 1H, 5-H_{fuc}), 4.74 (d, 1H, 1H_{fuc}).

Beispiel 2

Poly-D,L-succinimid-co-α,ß-(5-Carboxypentyl)-D,L-aspartamid

500 mg PSI (MG 9 600) werden in 2 ml DMF gelöst und mit 1.38 g 6-Aminohexansäure, gelöst in 8 ml Formamid, und 1 ml Triethylamin versetzt. Es wird 13 h bei 45°C gerührt und anschließend mit 1-Butanol gefällt. Nach Waschen des Polymers mit Methanol wird in H2O aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 350 mg

Substitutionsgrad laut NMR: 8% Aminohexansäure

Beispiel 3

Poly-D,L-succinimid-co-α,ß-(5-Carboxypentyl)-D,L-aspartamid

1g PSI (MG 24 000) werden in 4 ml DMF gelöst und mit 2.1 g 6-Aminohexansäure, gelöst in 10 ml Formamid, und 25 mg DMAP versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur und 9 h bei 45°C gerührt und anschließend mit 1-Butanol gefällt. Nach Waschen des Polymers mit Methanol wird in H_2O aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 980 mg

Substitutionsgrad laut NMR: 18% Aminohexansäure

Beispiel 4

Poly-D,L-succinimid-co-α,ß-(2-Carboxyethyl)-D,L-aspartamid

5 g PSI (MG 9 600) werden in 20 ml DMF gelöst und mit 7.5 g ß-Alanin, gelöst in 50 ml Formamid, und 100 mg DMAP versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur und 9 h bei 45°C gerührt und anschließend mit 1-Butanol gefällt. Nach Waschen des Polymers mit Methanol wird in H_2O aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 3.9 g

Substitutionsgrad laut NMR: 14% ß-Alanin

Beispiel 5

Poly-D,L-succinimid-co-α,ß-(2-(2-hydroxymethyl)-carboxyethyl)-D,L-aspartamid

1 g PSI (MG 9 600) werden in 4 ml DMF gelöst und mit 1.5 g L-Serin, gelöst in 8 ml Formamid, und 4 ml Triethylamin versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur und 9 h bei 45°C gerührt und anschließend mit 1-Butanol gefällt. Nach Waschen des Polymers mit Methanol wird in H_2O aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1 g

Substitutionsgrad laut NMR: 14% L-Serin

Beispiel 6

Kopplung des Polymers aus Beispiel 2 mit Verbindung 9 (aus Beispiel 1)

100 mg PCPA aus Beispiel 2 werden in 2 ml H_2O gelöst und mit 20 mg Verbindung 9 (aus Beispiel 1) versetzt. Während 36 h werden 4 mal je 20 mg

1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)- carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) zugegeben. Nach Dialyse und Gefriertrocknung verbleibt das Produkt.

Ausbeute: 112 mg
Substitutionsgrad laut NMR: 5 % Verbindung 9

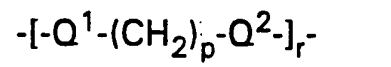
Beispiel 7
Kopplung des Polymers aus Beispiel 3 mit Verbindung 9 (aus Beispiel 1)

100 mg PCPA aus Beispiel 3 werden in 2 ml H_2O gelöst und mit 20 mg Verbindung 9 (aus Beispiel 1) versetzt. Während 36 h werden 4 mal je 20 mg 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)- carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) zugegeben. Nach Dialyse und Gefriertrocknung verbleibt das Produkt.

Ausbeute: 90 mg
Substitutionsgrad laut NMR: 12 % Verbindung 9

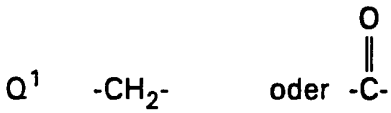
Patentansprüche

1. Verbindung bestehend aus einer Polyaminosäure, welche über jeweils einen Spacer der Formel I,



I,

worin



Q^1 $-CH_2-$ oder $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$,

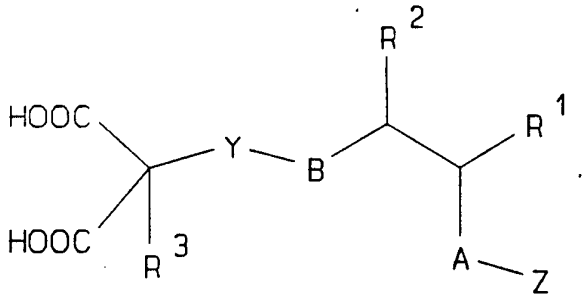


Q^2 $-NH-$ oder $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-$,

p eine Zahl von 1 bis 6 und

r 0 oder 1 bedeuten,

mit wenigstens einem Rest der Formel II



II,

in der

R^1 und R^2 gemeinsam einen sechsgliedrigen Carbo- oder Heterocyclus mit mindestens einem der Ring-

substituenten R^4, R^5 und R^6 bilden und

R^3 H, $(CH_2)_mX$ oder $CH_2O(CH_2)_mX^1$ bedeutet,

A und B unabhängig voneinander O, S, NH, HN-CO, OC-NH, O-CO, OC-O, NH-CO-O, O-CO-NH, S-CO, SC-O, O-CS-S, S-CS-O, NH-CS-S, S-CS-NH oder CH_2 bedeuten und

Z eine Pyranose, eine Furanose, einen offenkettigen Polyalkohol darstellt oder Y-X^6 bedeutet,

Y $-O-(CX^2,X^3)_n$, $-(CX^2,X^3)_n$, $-CH_2-(CX^2,X^3)_n$ oder einen gesättigten oder ungesättigten, sechsgliedrigen Carbo- oder Heterozyklus mit mindestens einem Substituenten R^9 oder eine Kombination aus der Kette $-O-(CX^2,X^3)_n$,$-(CX^2,X^3)_n$ und dem Carbo- oder Heterozyklus darstellt,

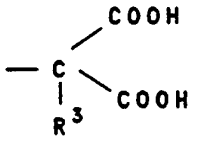
wobei

R^4, R^5 und R^6 unabhängig voneinander H, OH, $-O-(CH_2)_qX^4$, $CH_2O(CH_2)_qX^5$ oder $HNC(O)CH_3$ und

X, X^1, X^2 und X^3 unabhängig voneinander H, NH_2, COOH, OH, CH_2OH, CH_2NH_2, C_1-C_{20}-Alkyl oder C_6-C_{10}-Aryl,

X^4 und X^5 unabhängig voneinander -NH- oder -O- und

X^6 OH oder



und

m, n und q unabhängig voneinander eine Zahl von 1 bis 20 bedeuten,

über einen der Ringsubstituenten R^4, R^5 oder R^6 verknüpft ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure Polysuccinimid ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure Polyaspartamid ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure Polyglutamat ist.

5. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure Polylysinfumaramid ist.

6. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure ein Copolymer aus Polysuccinimid und Polyaspartamid ist.

7. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure ein Copolymer aus Polyhydroxyethylaspartamid und Polyaspartamid ist.

8. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure ein Copolymer aus Polysuccinimid, Polyaspartamid und Polyhydroxyethylaspartamid ist.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß R1 und R2 gemeinsam einen substituierten Tetrahydropyranring bilden,

A und B	O,
Z	eine -Fucopyranosyl-Gruppe,
Y	$(CX^2,X^3)_n$ bedeuten, wobei
R^3, X^2 und X^3	H bedeuten und n für 5 steht.

10. Verbindung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Substituenten des Tetrahydropyranrings R^4 und R^5 jeweils H, der im Tetrahydropyranring zwischen dem Ringheteroatom O und dem Ringsubstituenten -A-Z liegende Substituent

R^6 $-CH_2O(CH_2)_qX^5$ und

X^5 -NH- bedeuten.

11. Verbindung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß q für 2 steht.

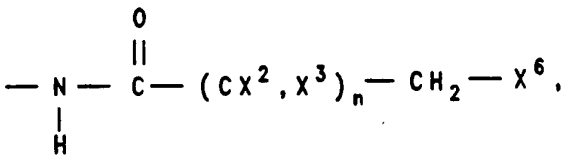
12. Verbindung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Tetrahydropyranring eine Pyranose ist.

13. Verbindung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Pyranose N-Acetyl-D-glucosamin ist.

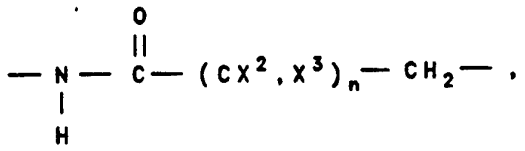
14. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß

R^1 und R^2 gemeinsam einen sechsgliedrigen Carbocyclus bilden,

A-Z



-B-Y-

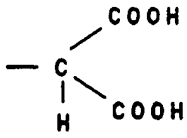


R^3 und X^2 H,

X^3 und X^6 OH und

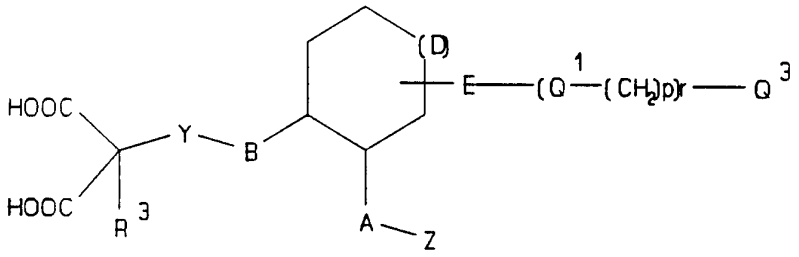
n 4 bedeuten.

15. Verbindung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß X^6



bedeutet.

16. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die kovalente Verknüpfung des Polymers mit einer Verbindung der Formel III



III,

worin

(D) -NH-, -O- oder $-CH_2-$,

E für r = 1 $-O-(CH_2)_q-NH-$,$-O-(CH_2)_q-O-$, $-CH_2O(CH_2)_q-NH-$ oder $-CH_2O(CH_2)_q-O-$ und

für r = 0 $-O-(CH_2)_q-$, $-O-(CH_2)_q-$, $-CH_2O(CH_2)_q-$ oder $-CH_2O(CH_2)_q-$ und

Q^3 OH, $-NH_2$ oder $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OH$ bedeuten und

die übrigen Variablen die in Anspruch 1 genannten Bedeutungen haben, durch Reaktion zwischen einer reaktiven und einer aktivierten Gruppe erfolgt.

17. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 und gegebenfalls pharmazeutische Träger.

18. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie oder Prophylaxe von Krankheiten, bei welchen bakterielle oder virale Infektionen, entzündliche Prozesse oder metastasierende Tumoren involviert sind.

19. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von Krankheiten, bei welchen bakterielle oder virale Infektionen, entzündliche Prozesse oder metastasierende Tumoren involviert sind.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna al Application No
PCT/EP 95/00844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C08G69/10 C08G73/06 G01N33/545 C07H17/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C08G G01N C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DD-A-273 443 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 15 November 1989 see claim 1	1-19
A	WO-A-93 14127 (UNIVERSITY OF UTAH) 22 July 1993 see claims 1-20	1-19
A	EP-A-0 406 473 (ABBOTT LABORATORIES) 9 January 1991 see claims 1-16	1-19
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13 no. 372 (C-627) [3720] ,17 August 1989 & JP,A,01 127039 (CHUICHI HIRAYAMA) see abstract	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 July 1995	31.07.95

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Glanddier, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. nal Application No
PCT/EP 95/00844

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DD-A-273443		NONE		
WO-A-9314127	22-07-93	AU-B-	3592693	03-08-93
EP-A-406473	09-01-91	AU-B-	626563	06-08-92
		AU-A-	3891389	02-11-89
		JP-A-	3044399	26-02-91

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen
PCT/EP 95/00844

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C08G69/10 C08G73/06 G01N33/545 C07H17/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C08G G01N C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DD-A-273 443 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 15.November 1989 siehe Anspruch 1	1-19
A	WO-A-93 14127 (UNIVERSITY OF UTAH) 22.Juli 1993 siehe Ansprüche 1-20	1-19
A	EP-A-0 406 473 (ABBOTT LABORATORIES) 9.Januar 1991 siehe Ansprüche 1-16	1-19
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13 no. 372 (C-627) [3720] ,17.August 1989 & JP,A,01 127039 (CHUICHI HIRAYAMA) siehe Zusammenfassung	1-19

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
6.Juli 1995	31. 07. 95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Glanddier, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interna ales Aktenzeichen
PCT/EP 95/00844

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DD-A-273443		KEINE		
WO-A-9314127	22-07-93	AU-B-	3592693	03-08-93
EP-A-406473	09-01-91	AU-B-	626563	06-08-92
		AU-A-	3891389	02-11-89
		JP-A-	3044399	26-02-91