

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 9620090 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **9620090**

(51) MPK⁶: **A61K 38/12**

(22) Datum prijave: **24.05.1996**

(45) Datum objave: **31.08.1998**

(87) PCT objava: **WO 96/39160, 12.12.1996**

(86) PCT prijava: **24.05.1996 WO PCT/US96/07756**

(30) Prednost: **06.06.1995 US 08/468947**

(72) Izumitelj: **SHALABY W. SHALABY, Anderson, South Carolina 29625, US;
JACKSON A. STEVEN, Holliston, Massachusetts 01746, US;
IGNATIUS FRANCIS, Milford, Massachusetts 01757, US;
MOREAU JACQUES-PIERRE, Upton, Massachusetts 01568, US**

(73) Nosilec: **Biomeasure Incorporated, 27 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757-3650, US**

(74) Zastopnik: **ITEM, poslovno svetovanje, d.o.o., Resljeva 16, 1000 Ljubljana, SI**

(54) **IONSKI MOLEKULSKI KONJUGATI N-ACILIRANIH DERIVATOV POLI (2-AMINO-2-DEOKSI-D-GLUKOZE) AND POLIPEPTIDOV**

(57) Kopolimer, ki obsega N-acilirani derivat in sestavek, ki obsega omenjeni kopolimer in polipeptid, pri čemer vsebuje omenjeni polipeptid vsaj en učinko-

viti ionogeni amin, kjer je vsaj 50 masnih odstotkov polipeptida prisotnega v omenjenem sestavku ionsko vezanih na omenjeni polimer.

SI 9620090 A

IONSKE MOLEKULSKE KONJUGATE N-ACILIRANIH DERIVATOV POLI(2-AMINO-2-DEOKSI-D-GLUKOZE) IN POLIPEPTIDOV

Ozadje izuma

Polimerne sisteme za izpust zdravil so razvili za kontrolirano sproščanje farmacevtskih polipeptidov. Na primer, za sproščanje biološko aktivnih polipeptidov so uporabljali sintetične poliestre kot poli(DL-mlečno kislino), poli(glikolno kislino), poli(mlečno-glikolno kislino) in poli(ϵ -kaprolakton) v obliki mikrokapsul, filmov ali palic. Glej na primer, U.S. Patent Nos. 4,767,628 in 4,675,189 in PCT Application No. WO 94/00148.

Razen sintetičnih polimernih verig so uporabljali naravne polimere in njihove derivate kot komponente v podobnih izpustnih sproščajočih sestavkih, ki se razkrojijo z encimsko razgradnjo. Primer takšnih naravnih polimerov so polimeri, ki bazirajo na hitinu, to je na poli(N-acetilglukozaminu). Vendar, ker je hitin netopen v vodi, so drugi raziskali topne derivate, ki bazirajo prvenstveno na delno deaciliranem hitinu, na primer hitosanu. Glej na primer, Sanford, P.A. in ostali, Eds., *Advances in Chitin & Chitosan* (1992). Čeprav je hitosan prisoten v nekaterih glivah, se biorazgradljivi hitosan običajno proizvaja sintetično. Glej Mima in ostali, *J. Appl. Polym. Sci.* 28:1909-1917 (1983). Pripravili so tudi sintetične derivate hitosana za spreminjanje *in vivo* bioloških lastnosti polimera. Glej Muzzarelli in ostali, *Carbohydrate Res.* 207:199-214 (1980).

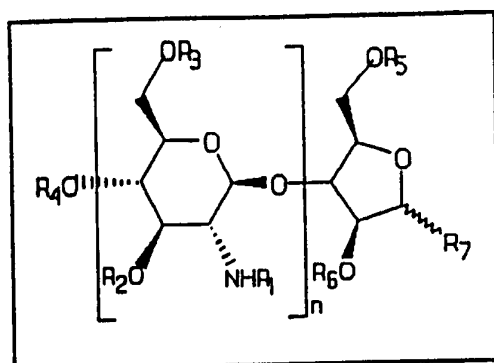
Uporabo hitina, kot tudi derivatov hitina, so predlagali v številnih izpustnih sistemih za zdravila. Glej na primer, European Patent Application Nos. 486,959, 482,649, 525,813 A1 in 544,000 A1; in U.S. Patent No. 5,271,945.

Povzetek izuma

Pri enem od vidikov predloženi izum obravnava kopolimer, ki obsega N-acilirani derivat poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze), v katerem je 1 odstotek do 50 odstotkov prostih aminov poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih s prvo acilno skupino, prva acilna skupina je COE₁, kjer je E₁ izbran iz skupine, ki jo sestavljajo C₃₋₃₃ karboksialkil, C₃₋₃₃ karboksialkenil, C₇₋₃₉ karboksiarilalkil in C₉₋₃₉ karboksiarilalkenil, 50 do 99 odstotkov prostih aminov poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) pa je aciliranih z drugo acilno skupino, druga acilna skupina je COE₂, kjer je E₂ izbran iz skupine, ki jo sestavljajo C₁₋₃₀ alkil, C₂₋₃₀ alkenil, C₆₋₃₇ arilalkil in C₈₋₃₇ arilalkenil, pod pogojem, da je vsaj eden od prostih aminov derivata aciliran s prvo acilno skupino in da je do 30 odstotkov prostih hidroksilnih skupin omenjene poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih s prvo acilno skupino ali drugo acilno skupino.

Kopolimer ima prednostno molekulsko maso okoli 3,000 do 90,000 daltonov, kot je bilo določeno z gelsko permeacijsko kromatografijo ali katerokoli analogno metodo. V drugih prednostnih izvedbah je preko 90 odstotkov prostih aminov poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih bodisi s prvo acilno skupino ali z drugo acilno skupino. Prednostno je od 10 do 30 odstotkov prostih aminov poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih s prvo acilno skupino. Nekatere od prostih hidroksilnih skupin (na primer med 1 odstotkom in 30 odstotki) lahko aciliramo bodisi s prvo acilno skupino ali z drugo acilno skupino.

Pri eni od prednostnih izvedb ima kopolimer formulo:



kjer:

je R_1 za vsako posamezno ponavljajočo se enoto izbran iz skupine sestojee iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_2 za vsako posamezno ponavljajočo se enoto izbran iz skupine sestojee iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_3 za vsako posamezno ponavljajočo se enoto izbran iz skupine sestojee iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_4 izbran iz skupine sestojee iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_5 izbran iz skupine sestojee iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_6 izbran iz skupine sestojee iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_7 izbran iz skupine sestojee iz COH in CH_2OR_8 ;

je R_8 izbran iz skupine sestojee iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je n med 2 in 200; in

za 1 odstotek do 50 odstotkov ponavljajočih se enot je R_1 prva acilna skupina, za 50 do 99 odstotkov ponavljajočih se enot pa je R_1 druga acilna skupina, pod pogojem, da je vsaj za eno od ponavljajočih se enot R_1 prva acilna skupina.

Izrazi COE_1 in COE_2 pomenijo $-\text{C}=\text{O}\bullet\text{E}_1$ oziroma $-\text{C}=\text{O}\bullet\text{E}_2$. Substituenti karboksialkil, karboksialkenil, karboksiarilalkil in karboksiarilalkenil lahko vsebujejo 1 - 4 funkcionalnosti karboksilne kisline. Primeri prve acilne skupine obsegajo, niso pa omejeni z njimi, sukcinil, 2-(C_{1-30} alkil)sukcinil, 2-(C_{2-30} alkenil)sukcinil, maleil, ftalil, glutaril in itakonil. Primeri druge acilne skupine obsegajo, niso pa omejeni z njimi, acetil, benzoil, propionil in fenilacetil.

Predloženi izum predstavlja tudi sestavek, ki vključuje gornji kopolimer in polipeptid, ki obsega vsaj en učinkovit ionogeni amin, kjer je vsaj 50 masnih odstotkov polipeptida prisotnih v sestavku ionsko vezanih na polimer. Prednostno obsega sestavek od 5 do 50 masnih odstotkov polipeptida.

Primeri primernih polipeptidov so rastni hormon sproščajoči peptid (GHRP), luteinizirajoči hormon sproščajoči hormon (LHRH), somatostatin, bombezin, gastrin sproščajoči peptid (GRP), kalcitonin, bradikinin, galanin, melanocit stimulirajoči hormon (MSH), rastni hormon sproščajoči faktor (GRF), hormon rasti (GH), amilin, tahikinin, sekretin, paratiroidni hormon (PTH), enkafelin, endotelin, kalcitoninske gene sproščajoči peptid (CGRP), nevromedini, protein soroden paratiroidnemu hormonu (PTHrP), glukagon, nevrotenzin, adrenokortikotropni hormon (ACTH), peptid YY (PYY), glukagon sproščajoči peptid (GLP), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), peptid za aktivacijo pituitarne adenilatne ciklaze (PACAP), motilin, substanca P, neuropeptid Y (NPY), TSH in biološko aktivni analogi le-tega. Izraz "biološko aktivni analogi" uporabljamo tu za označevanje v naravi nastopajočih, rekombinantnih in sintetičnih peptidov, polipeptidov in proteinov, ki imajo fiziološko ali terapevtsko delovanje. Na splošno uporabljamo izraz za označevanje vseh fragmentov in derivatov peptida, proteina ali polipeptida, ki izkazujejo kvalitativno podoben agonistični ali antagonistični učinek, kot ga izkazuje nemodificirani, v naravi nastopajoči peptid, protein ali polipeptid, na primer tistih, kjer je eden ali več ostankov aminokislin nastopajočih v naravni spojini substituiranih ali izbrisanih, ali kjer so bili ostanki N- ali C-terminalov strukturno modificirani. Izraz učinkoviti ionogeni amin se

nanaša na prosti amin prisoten na polipeptidu, ki je sposoben tvoriti ionsko vez s prostimi karboksilnimi skupinami na kopolimeru.

Sproščanje polipeptida iz sestavka lahko modificiramo s spremembo kemične strukture sestavka. S povečanjem molekulske mase polimera pada količina peptida sproščenega iz konjugata. S povečanjem števila karboksilnih kislinskih skupin na polimeru se poveča količina polipeptida ionsko vezanega na sestavek, posledica pa je, da se poveča količina sproščanja peptida iz konjugata.

Sproščanje polipeptida lahko nadalje moduliramo (a) z obdelavo sestavka s topno soljo dvovalentnih ali polivalentnih kovinskih ionov šibkih kislin (na primer kalcijevih, železovih, magnezijevih ali cinkovih); (b) z nanosom na delce tenke, vpojne prevleke iz glikolidnega kopolimera ali silikonskega olja v kroglasti, cilindrični ali ravni konfiguraciji; ali (c) z mikroinkapsulacijo sestavka v vpojnem glikolidnem kopolimeru. Pri eni od izvedb sestavek vsebuje od 0,01 do 20 masnih odstotkov polivalentne kovine.

Ovisno od izbire polipeptida sestavek lahko uporabimo za zdravljenje večjega števila bolezni. Na primer, pokazalo se je, da somatostatin, bombezin, GRP, LHRH, in analogi le-teh lahko zdravijo razne oblike raka. Za faktor rasti kot GH, GRF in GHRP in za njihove analoge se je pokazalo, da stimulirajo rast pri doraščajočih kot pri starejših osebah. Za kalcitonin, amilin, PTH in PTHrP in za njihove analoge se je pokazalo, da zdravijo osteoporozo in druge bolezni kosti.

Sestavki so načrtovani za parenteralno jemanje, na primer, intramuskularno, subkutano, intraduralno ali intraperitonealno vbrizganje. Prednost ima intramuskularno vbrizganje sestavka.

Sestavek v skladu z izumom ima lahko obliko prahu ali mikrodolcev, ki jih jemljemo kot suspenzijo s farmacevtsko sprejemljivim vehiklom (na primer, voda z nosilno substanco kot manitolom ali polisorbitom ali brez nje). Sestavek lahko sestavimo v obliki palice za parenteralno implantacijo z uporabo trokarja, na primer intramuskularne implantacije.

Doza sestavka v skladu s predloženim izumom za zdravljenje zgoraj omenjenih bolezni ali motenj se spreminja v odvisnosti od načina dajanja, starosti in telesne teže osebe in stanja osebe, ki jo zdravimo, dokončno pa o tem odloča lečeči zdravnik ali veterinar. Količino sestavka, ki jo je določil lečeči zdravnik ali veterinar, navajamo tu kot "terapevtsko učinkovito količino".

Pri drugem vidiku predloženi izum predstavlja postopek za sintezo kopolimera, pri čemer postopek obsega: reakcijo hitosana s šibko kislino, tako da nastane polisaharid z nižjo molekulsko maso; reakcijo 1 odstotka do 50 odstotkov prostih aminov z nižjo molekulsko maso s prvim acilirnim sredstvom, prvo acilirno sredstvo pa izberemo iz skupine, ki jo sestavljajo C_4 - C_{34} polikarboksialkan, C_4 - C_{34} polikarboksialken, C_8 - C_{40} polikarboksilarilalkan, C_{10} - C_{40} polikarboksilarilalken ali acilirni derivat le-teh; in reakcijo od 50 do 100 odstotkov prostih aminov polisaharida z nižjo molekulsko maso z drugim acilirnim sredstvom, drugo acilirno sredstvo pa izberemo iz skupine, ki jo sestavljajo C_{2-31} monokarboksialkan, C_{3-31} monokarboksialken, C_{7-38} monokarboksilarilalkan, C_{9-35} monokarboksilarilalken ali acilirni derivat le-teh. Reakcijo polisaharida z nižjo molekulsko maso s prvim acilirnim sredstvom kot z drugim acilirnim sredstvom lahko merimo s sredstvom za detekcijo aminov (na primer fluorescaminom), da bi zagotovili, da je 1 odstotek do 50 odstotkov prostih aminov polisaharida z nižjo molekulsko maso aciliranih s prvim acilirnim sredstvom in 50 do 99 odstotkov prostih aminov polisaharida z nižjo molekulsko maso aciliranih z drugim acilirnim sredstvom. Glej na primer, Bailey, P.D., An Introduction to Peptide Chemistry (Wiley, NY) (1990); Oppenheimer, H. in ostali, Archives Biochem. Biophys. 120:108-118 (1967); Stein, S. Arch. Biochem. Biophys. 155:203-212 (1973).

Pri reakciji hitosana s šibko kislino (na primer dušikasto kislino) se polimer razcepi, pri čemer se zniža njegova molekulska masa (na primer 2,500 - 80,000 daltonov). Pri prednostnih izvedbah prva acilirna skupina in drugo acilirno sredstvo reagirata s polisaharidom z nižjo molekulsko maso zaporedoma, na primer, ali reagira prvo acilirno sredstvo preden reagira drugo

acilirno sredstvo, ali reagira drugo acilirno sredstvo preden reagira prvo acilirno sredstvo ali simultano. Rezultat aciliranja prostih aminov je lahko ta, da se acilira nekaj prostih hidroksilnih skupin polisaharida z nižjo molekulsko maso. Stopnjo acilacije prostih hidroksilnih skupin lahko spremenimo s spreminjanjem pH, topil ali sredstev uporabljenih med reakcijo acilacije, ali pa uporabljenega acilirnega sredstva.

Primeri acilirnih derivatov vključujejo, vendar pa niso omejeni z njimi, anhidride in N-acilirane heterocikle (na primer imidazole in pirazole). Glej na primer, Bodansky in ostali, *The Practice of Peptide Synthesis*, 87-150 (Springer Verlag, 1984). Sredstva polikarboksialkan, polikarboksialken, polikarboksiarilalkan, in polikarboksiarilalken ali acilirni derivati le-teh vsebujejo reaktante, ki imajo funkcionalnosti 2-5 karboksilnih kislin, ali pa izvirajo iz njih. Substituenti monokarboksialkan, monokarboksialken, monokarboksiarilalkan in monokarboksiarilalken vsebujejo reaktante, ki imajo samo eno skupino karboksilne kisline, ali pa izvirajo iz nje. Primeri prvih acilirnih sredstev vključujejo, vendar pa niso omejeni z njimi, anhidrid sukcinjske kisline, anhidrid 2-(C₁₋₃₀ alkil)sukcinjske kisline, anhidrid 2-(C₂₋₃₀ alkenil)sukcinjske kisline, anhidrid maleinske kisline, anhidrid glutarne kisline, anhidrid itakonske kisline in ftalanhidrid. Primeri druge acilirne skupine obsegajo, vendar pa niso omejeni z njimi, anhidrid očetne kisline, anhidrid benzojske kisline, N,N'-diacetil-3,5-dimetilpirazol, N,N'-diacetilimidazol, anhidrid fenilocetne kisline, anhidrid propionske kisline in anhidrid butirne kisline.

Pri še enem od vidikov predloženi izum predstavlja postopek za sintezo sestavka, pri čemer postopek obsega naslednje faze: reakcijo hitosana s šibko kislino, ki daje polisaharid z nižjo molekulsko maso; reakcijo 1 odstotka do 50 odstotkov prostih aminov polisaharida z nižjo molekulsko maso s prvim acilirnim sredstvom, pri čemer je prvo acilirno sredstvo izbrano iz skupine, ki jo sestavljajo C₄-C₃₄ polikarboksialkan, C₄-C₃₄ polikarboksialken, C₈-C₄₀ polikarboksiarilalkan, C₁₀-C₄₀ polikarboksiarilalken ali acilirni derivati le-teh; reakcijo od 50 do 100 odstotkov prostih aminov polisaharida z nižjo

molekulska maso z drugim acilirnim sredstvom, drugo acilirno sredstvo pa je izbrano iz skupine, ki jo sestavljajo C_{2-31} monokarboksialkan, C_{3-31} monokarboksialken, C_{7-38} monokarboksialkan, C_{9-35} monokarboksialken ali acilirni derivat le-teh; nevtralizacijo aciliranega polisaharida z nižjo molekulska maso z bazo; in mešanje nevtraliziranega aciliranega polisaharida z nižjo molekulska maso s polipeptidno soljo, pri čemer polipeptidna sol vsebuje vsaj en ionogeni amin za tvorbo polipeptidnega-kopolimernega ionskega konjugata.

Z nevtralizacijskim postopkom povzročimo, da, kot je zaželeno, polisaharid z nižjo molekulska maso lažje emulgiramo ali raztopimo v vodi. Pri prednostnih izvedbah je baza anorganska baza (na primer natrijev hidroksid). Zaželeno je, da je polipeptidna sol sol šibke kisline (na primer acetat, laktat ali citrat). Ionski konjugat lahko izoliramo s filtriranjem ali s centrifugiranjem nastale zmesi.

Konjugate v skladu z izumom lahko zlahka predelamo v vbrizgljive mikrokroglice ali mikrodolce in filme ali palice za implantacijo, ne da bi morali uporabiti procesiranja, ki daje multifazne emulzije. Prednostno, mikrodolce izdelamo (a) z raztapljanjem sestavka v aprotičnem organskem topilu, ki se meša z vodo; (b) z mešanjem organskega topila v vodi in (c) z izločanjem mikrodolcev iz vode. Pri prednostnih izvedbah organsko topilo izberemo iz skupine acetona, acetonitrila, tetrahidrofurana, dimetilformamida in dimetiletilenglikola.

Druge lastnosti in prednosti predloženega izuma bodo razvidne iz detajlnega opisa in iz patentnih zahtevkov.

Detajlni opis izuma

Sinteza in raba kopolimerov in kopolimernih-peptidnih ionskih konjugatov tega izuma sta znotraj sposobnosti oseb z običajno strokovno veščino. Če ni definirano drugače, imajo vsi tehnični in znanstveni izrazi isti pomen, kot jih na splošno razume oseba z običajno veščino v stroki, kamor spada ta izum.

Poleg tega so vse publikacije, patentne prijave, patenti in druge reference, ki so tu omenjene, vključene v reference.

Mnenja smo, da oseba, ki je vešča stroke, lahko na podlagi tu vsebovanega opisa uporablja predloženi izum do popolne mere. Sledeče specifične izvedbe naj se zato vsekakor in sploh tolmačijo zgolj kot ilustrativne in neomejevalne za preostanek objave.

Primer 1: Depolimerizacija hitosana

Hitosan (Protan, Inc., Portsmouth, NH) raztopimo v vodni raztopini očetne kisline in mešamo z mehanskim mešalcem en dan. Skozi raztopino uvajamo dušik, medtem pa dodajamo vodno raztopino natrijevega nitrita. Po preteku pol ure filtriramo raztopino skozi lijak s stekleno frito pod zmanjšanim tlakom, da odstranimo netopne delce, ki so prisotni v začetni raztopini hitosana. Filtrirani raztopini dodamo vodno raztopino NaOH, nato pa raztopino močno mešamo v metanolu, da se obori polimer. Dobljeno oborino nato odfiltriramo in izmenoma spiramo petkrat z vodo in metanolom. Oborino sušimo pri 60° C v vakuumskem sušilniku dva dni. Depolimerizirani hitosan vsebuje aldehidno skupino na enem koncu verige. Aldehidno končno skupino lahko reduciramo do primarne hidroksilne skupine z reakcijo z NaBH₄. Depolimerizirani produkt lahko analiziramo z gelsko permeacijsko kromatografijo (GPC), da določimo molekulsko maso kot tudi porazdelitev molekulske mase v primerjavi s Pullulanovimi referenčnimi standardi. Lahko uporabimo NMR (nuklearna magnetna resonanca) in IR (infra - rdeča) preučevanja za določanje količine N-acilacije na depolimeriziranem produktu.

Primer 2: Delna sukcinilacija depolimeriziranega hitosana

Depolimerizirani hitosan iz primera 1 raztopimo v 0,1M vodni raztopini očetne kisline. Tej raztopini dodamo metanol, nato pa dodamo raztopino anhidrida sukcininske kisline v acetonu. Dobljeno raztopino mešamo 24 ur na sobni temperaturi. Po dokončanju sukcinilacije raztopino zlijemo v aceton z

vodo, da dobimo oborino. Dobljeno oborino izločimo s centrifugiranjem in petkrat speremo z metanolom. Oborino nato raztopimo v 0,5M KOH in dializiramo proti vodi do pH 7. Dializirano raztopino nato koncentriramo pod zmanjšanim tlakom, oborimo v acetonu z vodo in sušimo v vakuumskem sušilniku pri 60° C.

Da bi dosegli spremenljive ravni sukcinilacije, lahko stopnjo reakcije kontroliramo v teku procesa aciliranja z analiziranjem števila neaciliranih aaminskih skupin. Število neaciliranih aaminskih skupin lahko določimo tako, da reakcijski zmesi odvzamemo vzorec in ga polijemo s sredstvom za določevanje aminov (na primer fluorescaminom). Količino prisotnega amina lahko izmerimo spektrofotometrično z uporabo standardne krivulje za kopolimere. Tako, poleg tega, lahko dodajamo anhidrid sukcininske kisline postopoma, dokler ne dosežemo želenega odstotka acilacije. Točno stopnjo sukcinilacije očiščenega produkta lahko določimo z uporabo ^1H NMR spektroskopije in konduktometrične titracije.

Primer 3: Acetiliranje N-sukciniliranega hitosana

Delno sukciniliran vzorec iz primera 2 raztopimo v 0,1M vodni raztopini očetne kisline. Tej raztopini nato dodamo metanol in anhidrid očetne kisline in mešamo reakcijsko zmes en dan pri sobni temperaturi. To raztopino nato zlijemo v aceton z vodo, da nastane oborina. Dobljeno oborino ločimo s centrifugiranjem in speremo petkrat z metanolom. Oborino nato raztopimo v 0,1N KOH in dializiramo proti vodi do pH 7. Končno raztopino liofiliziramo za dobivanje končnega produkta. Postopek aciliranja lahko merimo spektrofotometrično, tako kot smo obravnavali pri primeru 2, točno stopnjo acilacije očiščenega produkta pa lahko določimo z uporabo ^1H NMR spektroskopije in s konduktometrično titracijo.

Primer 4: Priprava poli(N-acil-D-glukozamin)peptidnega ionskega konjugata

N-sukcinilirano kalijevo sol hitosana iz primera 3 raztopimo v vodi. Vodno raztopino acetatne soli analoga polipeptida somatostatina SOMATULIN-

ATM (D-Nal-c[Cis-Tir-D-Trp-Lis-Val-Cis]-Thr-NH₂; Kinerton, Dublin, Ireland) dodamo mešani raztopini polimera. Nastane oborina, ki jo odfiltriramo in sušimo v vakuumu pri 40° C.

Količino polipetida v dobljenem ionskem konjugatu lahko določimo tako, da določimo razliko med količino začetnega dodanega peptida in količino prostega preostalega peptida vsebovanega v filtratu in izpiralni raztopini. Količino peptida v dobljenem ionskem konjugatu lahko določimo s primerjavo razmerja ogljik/dušik v začetnem N-sukciniliranem hitosanu z razmerjem v dobljenem ionskem konjugatu. GPC analizo lahko uporabimo za določanje molekulske mase in MWD, diferencialno scanning kalorimetrijo (DSC) za določanje termičnih lastnosti in NMR in IR za ugotavljanje kemijske identitete.

Druge izvedbe

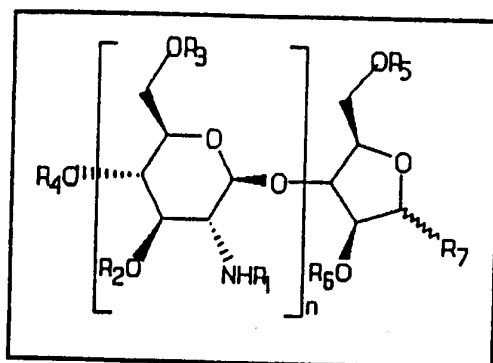
Dasi smo izum opisali v povezavi z detajlnim opisom le-tega, je treba to razumeti tako, da ima gornji opis namen ilustrirati in ne omejevati dometa izuma, ki je definiran s cilji priloženih patentnih zahtevkov. Drugi vidiki, prednosti in modifikacije so znotraj patentnih zahtevkov.



PATENTNI ZAHTEVKI

1. Kopolimer, ki obsega N-acilirani derivat poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze), **označen s tem**, da je 1 odstotek do 50 odstotkov prostih aminov omenjene poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih s prvo acilno skupino, omenjena prva acilna skupina je COE₁, kjer je E₁ izbran iz skupine sestoeče iz C₃₋₃₃ karboksialkila, C₃₋₃₃ karboksialkenila, C₇₋₃₉ karboksiarilalkila in C₉₋₃₉ karboksiarilalkenila, 50 do 99 odstotkov prostih aminov omenjene poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) je aciliranih z drugo acilno skupino, omenjena druga acilna skupina je COE₂, kjer je E₂ izbran iz skupine sestoeče iz C₁₋₃₀ alkila, C₂₋₃₀ alkenila, C₆₋₃₇ arilalkila in C₈₋₃₇ arilalkenila, pod pogojem, da je vsaj eden od prostih aminov omenjene poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliran s prvo acilno skupino in da je do 30 odstotkov prostih hidroksilnih skupin omenjene poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih z omenjeno prvo acilno skupino ali z omenjeno drugo acilno skupino.
2. Kopolimer v skladu z zahtevkom 1, **označen s tem**, da ima omenjeni kopolimer molekulsko maso okoli 3,000 do 90,000 daltonov, kot je določeno z gelsko permeacijsko kromatografijo.
3. Kopolimer v skladu z zahtevkom 1, **označen s tem**, da je preko 90 odstotkov omenjenih prostih aminov omenjene poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih bodisi z omenjeno acilno skupino bodisi z omenjeno drugo acilno skupino.
4. Kopolimer v skladu z zahtevkom 1, **označen s tem**, da je od 10 do 30 odstotkov omenjenih prostih aminov omenjene poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoze) aciliranih z omenjeno prvo acilno skupino.

5. Kopolimer v skladu z zahtevkom 1, **označen s tem**, da ima omenjeni kopolimer formulo:



kjer:

je R_1 , za vsako posamezno ponavljajočo se enoto, izbran iz skupine sestoječe iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_2 , za vsako posamezno ponavljajočo se enoto, izbran iz skupine sestoječe iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_3 , za vsako posamezno ponavljajočo se enoto, izbran iz skupine sestoječe iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_4 izbran iz skupine sestoječe iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_5 izbran iz skupine sestoječe iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_6 izbran iz skupine sestoječe iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je R_7 izbran iz skupine sestoječe iz COH in CH_2OR_8 ;

je R_8 izbran iz skupine sestoječe iz prve acilne skupine, druge acilne skupine in H;

je n med 2 in 200; in

je R_1 za 1 odstotek do 50 odstotkov omenjenih enot prva acilna skupina, za 50 do 99 odstotkov omenjenih ponavljajočih se enot pa je R_1 druga acilna skupina, pod pogojem, da je vsaj za eno od ponavljajočih se enot, R_1 prva acilna skupina.

6. Kopolimer v skladu z zahtevkom 1, **označen s tem**, da je omenjena prva acilna skupina COE_1 , kjer je E_1 C_3 - C_{33} karboksialkil.
7. Kopolimer v skladu z zahtevkom 6, **označen s tem**, da je omenjena prva acilna skupina sukcinil.
8. Kopolimer v skladu z zahtevkom 7, **označen s tem**, da je omenjena druga acilna skupina acetil in je R_7 COH ali CH_2OH .
9. Sestavek, ki obsega omenjeni kopolimer v skladu z zahtevkom 1 in polipeptid, omenjeni polipeptid pa vsebuje vsaj en učinkoviti ionogeni amin, **označen s tem**, da je vsaj 50 masnih odstotkov omenjenega polipeptida prisotnega v omenjenem sestavku ionsko vezanih na omenjeni polimer.
10. Sestavek v skladu z zahtevkom 9, **označen s tem**, da omenjeni sestavek vsebuje od 5 do 50 masnih odstotkov omenjenega polipeptida.
11. Sestavek, ki obsega omenjeni kopolimer v skladu z zahtevkom 5 in polipeptid, pri čemer omenjeni polipeptid vsebuje vsaj en učinkoviti ionogeni amin, **označen s tem**, da je vsaj 50 masnih odstotkov omenjenega polipeptida prisotnega v omenjenem sestavku ionsko vezanih na omenjeni kopolimer.
12. Sestavek v skladu z zahtevkom 11, **označen s tem**, da omenjeni sestavek vsebuje od 5 do 50 masnih odstotkov omenjenega polipeptida.

13. Sestavek v skladu z zahtevkom 12, **označen s tem**, da je omenjeni polipeptid somatostatin ali analog somatostatina.
14. Sestavek v skladu z zahtevkom 10, **označen s tem**, da je omenjena prva acilna skupina sukcinil in da je omenjena druga acilna skupina acetil.
15. Postopek za sintezo kopolimera, pri čemer omenjeni postopek obsega stopnje:
- reakcijo hitosana s šibko kislino za dobivanje polisaharida z nižjo molekulsko maso;
 - reakcijo 1 odstotka do 50 odstotkov prostih aminov omenjenega polisaharida z nižjo molekulsko maso s prvim acilnim sredstvom, omenjeno prvo acilno sredstvo pa je izbrano iz skupine sestoječe iz C_4 - C_{34} polikarboksialkana, C_4 - C_{34} polikarboksialkena, C_8 - C_{40} polikarboksilarilalkana, C_{10} - C_{40} polikarboksilarilalkena ali iz acilnega derivata le-teh; in
 - reakcijo od 50 do 100 odstotkov prostega amina omenjenega polisaharida z nižjo molekulsko maso z drugim acilnim sredstvom, omenjeno drugo acilno sredstvo pa je izbrano iz skupine sestoječe iz C_{2-31} monokarboksialkana, C_{3-31} monokarboksialkena, C_{7-38} monokarboksilarilalkana, C_{9-35} monokarboksilarilalkena ali iz acilnega derivata le-teh.
16. Postopek v skladu z zahtevkom 15, **označen s tem**, da je odstotek omenjenih prostih aminov, ki so acilirani, določen z uporabo sredstva za detekcijo prostega amina.
17. Postopek v skladu z zahtevkom 15, **označen s tem**, da je omenjeno prvo acilno sredstvo anhidrid sukcinske kisline, omenjeno drugo acilno sredstvo je anhidrid očetne kisline, omenjena šibka kislina pa je dušikasta kislina.

18. Postopek za sintezo sestavka, omenjeni postopek pa obsega stopnje:
reakcijo hitosana s šibko kislino za dobivanje polisaharida z nižjo molekulsko maso;
reakcijo 1 odstotka do 50 odstotkov prostih aminov omenjenega polisaharida z nižjo molekulsko maso s prvim acilirnim sredstvom, pri čemer je omenjeno prvo acilirno sredstvo izbrano iz skupine sestoječe iz C_4 - C_{34} polikarboksialkana, C_4 - C_{34} polikarboksialkena, C_8 - C_{40} polikarboksilarilalkana, C_{10} - C_{40} polikarboksilarilalkena ali acilirnega derivata le-teh;
reakcijo od 50 do 100 odstotkov prostega amina omenjenega polisaharida z nižjo molekulsko maso z drugim acilirnim sredstvom, pri čemer je omenjeno drugo acilirno sredstvo izbrano iz skupine sestoječe iz C_{2-31} monokarboksialkana, C_{3-31} monokarboksialkena, C_{7-38} monokarboksilarilalkana, C_{9-35} monokarboksilarilalkena ali acilirnega derivata le-teh; nevtralizacijo omenjenega polisaharida z nižjo molekulsko maso z bazo; in
mešanje omenjenega nevtraliziranega polisaharida z nižjo molekulsko maso s polipeptidno soljo, kjer omenjena polipeptidna sol vsebuje vsaj en ionogeni amin za tvorbo polipeptidnega-kopolimernega ionskega konjugata.
19. Postopek v skladu z zahtevkom 18, **označen s tem**, da odstotek omenjenih prostih aminov, ki so bili acilirani, določimo z uporabo sredstva za detekcijo prostega amina.
20. Postopek v skladu z zahtevkom 18, **označen s tem**, da je omenjeno prvo acilirno sredstvo anhidrid sukcininske kisline, da je omenjeno drugo acilirno sredstvo anhidrid očetne kisline in da je omenjena šibka kislina dušikasta kislina.



**IONSKI MOLEKULSKI KONJUGATI N-ACILIRANIH DERIVATOV
POLI(2-AMINO-2-DEOKSI-D-GLUKOZE) IN POLIPEPTIDOV**

IZVLEČEK

Kopolimer, ki obsega N-acilirani derivat in sestavek, ki obsega omenjeni kopolimer in polipeptid, pri čemer vsebuje omenjeni polipeptid vsaj en učinkoviti ionogeni amin, kjer je vsaj 50 masnih odstotkov polipeptida prisotnega v omenjenem sestavku ionsko vezanih na omenjeni polimer.