

K I V O N A T

LIPID-POLIMER-KONJUGÁTUMOK

**NYOMDAPÉLDÁNY
MÁSOLATA**

A jelen találmány lipid-polimer-konjugátumokra vonatkozik, amelyek legalább egy hidrofób apoláris egységből és egy hidrofil fejcsoporthoz álló amfifil lipidből és egy N- és egy C-terminális végcsoportot hordozó polimerből vagy ennek prekurzorából nyerhetők, ahol a polimer egy poli(aminosav), poli(aminosav-származék) vagy egy poli(aminosav-analóg) és a lipid a polimer N- vagy C-terminális végcsoportjához kapcsolódik.

LIPID-POLIMER-KONJUGÁTUMOK**KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

A jelen találmány lipid-polimer-konjugátumokra, ezek előállítására és alkalmazására vonatkozik.

A találmány háttere

A lipid-polimer-konjugátumok jól-ismertek és számos különböző alkalmazásra használják azokat. Ezek közül egyik a kolloidális hordozó kompozíciókba történő beépítés, így pl. vezikuláris kettősrétegű rendszerekbe, mint pl. liposzómák, nioszómák és fordított vezikulumok, micelláris rendszerek, nanokapszulák, nanogömbök, stb.. Az ilyen kolloidális hordozó kompozíciók jól-ismert képviselőit a liposzómák alkotják. Bár az alábbiakban különösen a liposzómákat említjük, a szakember számára nyilvánvaló, hogy a fejtegetések, leírások és kitanítások más kolloidális hordozó kompozíciókra is vonatkoznak.

A liposzómák, amelyek a kolloidális hordozó részecskék csoportjába tartoznak, kicsi vezikulumok, melyek egy vagy több, egy vizes teret bezáró, koncentrikus lipid kettősrétegből állnak. Méretben, felületi töltésben, lipid összetételben, kettősréteg fluiditásában való szerkezeti változékonyságuk és azon képességük miatt, hogy majdnem minden gyógyszert enkapszuláznak, jelentőségüket gyógyszer-szállító rendszerekként hamar felismerték. Azonban a liposzómák intravénás injekcióban történő beadásakor, azokat a Mononukleáris Fagocita Rendszer (MPS) idegen részecskéként ismeri fel, és gyorsan kivonja a keringésből a fagocita sejtekben-gazdag szervekbe, így a májba, lépbe és csontvelőbe. Néhány lehetőséget, így pl. a liposzómák méretének csökkentése

és a liposzómák felületi töltésének megváltoztatása, már azonosítottak abból a célból, hogy csökkentsék ezt a hatást. Egy másik fejlesztés a liposzómák felületének módosítására vonatkozik olyan specifikus hidrofil polimer komponensek bevitelével a liposzómális felszínbe, amely csoportok csökkentik a fehérje-adszorpciót részecske felszínén. Következésképpen az ilyen liposzómák védettek az MPS sejtjeinek felismerésével szemben, és meghosszabbított rezidens élettartammal rendelkeznek az általános keringésben. A liposzómális felszín módosításának egyik jólismert példája a beépítés a hidrofil polimer polietilén-glikol (PEG) lipid-származéka liposzómális kompozíció-jának elkészítése során. Rendszerint ez a polimer a terminálisán egy hidrofób egységgel módosított, amely egy foszfatidil-etanol-amin-származék vagy hosszú szénláncú zsírsav-maradék. A polietilén-glikol önmagában egy elég stabil polimer, amely a fehérje-adhézió visszaszorítója, és amely nincs alávetve az enzimatis vagy hidrolitikus degradációnak fiziológiai körülmények között. A meghosszabbított plazma fél-életidőt és a fagocitákban gazdag szervekben történő csökkenő felhalmozódást tekintve jó eredményeket kaptak a PEG-beültetett (PEG-grafted) felületű liposzómák intravénás beadását követően különböző állatfajokban és emberekben is (Storm G., Belliot S.O., Daemen T. és Lasic D.D.: Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system, *Adv. Drug Delivery Rev.* 17, 31-48 (1995); Moghimi S.M., Hunter A.C. és Murray J.C.: Long-circulating and target-specific nanoparticles; theory to practice, *Pharmacol. Rev.* 53, 283-318 (2001); Boermann O.C.,

Dams E.T., Oyen W.J.G., Cortens F.H.M. és Storm G.: Radiopharmaceuticals for scintigraphic imaging of infection and inflammation, *Inflamm. Res.* 50, 55-64 (2001)). Forgalomba hozatali engedélyt adtak az ilyen liposzómális, doxorubicint tartalmazó készítményekre.

Időközben feltárták a polimer polietilén-glikol használatának hátrányait a hosszú élettartamú liposzómákban. A PEG-beültetett liposzómák felhalmozódása a makrofágokban és a bőrben néhány esetben a nem-biodegradálhatóságra vezethető vissza. A hosszú cirkulációs tulajdonság elvesztését (gyors kiürülés) az injektált PEG-liposzómákon egy másodperc időnek találták (Dams E.T., Laverman P., Oijen W.J., Storm G., Scherphof G.L., Ven der Meer J.W., Cortens F.H. és Boermann O.C.: Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 1071-1079 (2000)). A jelenlegi PEG-liposzómákkal végzett vizsgálatok betegekben azt mutatták, hogy a PEG-liposzómák képesek akut mellékhatásokat (arc kipirulás, mellkasi szorítás, a légzés rövidülése, változások a vérnyomásban) előidézni, amelyek azonnal feloldódnak, amikor a PEG-liposzóma készítmény beadását (infúzió) abbahagyják. A jelenlegi adatok rámutatnak a kiegészítő aktiválás szerepére a mellékhatások kiváltásában (Szebenyi J., Baranyi L., Savay S., Lutz H., Jelezarova E., Burger R. és Alving C.R.: The role of complement activation in hypersensitivity to Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil), *J. Liposome Res.* 10, 467-481 (2000)). Mostanáig a kereskedelmi forgalomban kapható, PEG-liposzómákon alapuló készítmények vizes szuszpenziós készítmé-



nyek. Az jól-ismert, hogy a liposzómális vizes szuszpenziós készítmények fél-életideje általában és a PEG-liposzómáké is meglehetősen korlátozott. Ismertek bizonyos technikák, hogy hogyan távolítsuk el az ilyen készítmények hordozóját vagy folyamatos fázisát, így pl. porlasztva szárítás, diaszűrés, rotációs bepárlás, stb., és előnyös a fagyasztva szárítás. Nemrég javasoltak egy olyan fagyasztva szárítási módszert, amely növeli a PEG-liposzómák hosszantartó életidejét és technécium-kelátor hidrazino-nikotinamidot tartalmaz (Laverman P., van Bloois L., Boerman O.C., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M. és Storm G.: Lyophilisation of Tc-99m-HYNIC labelled PEG-liposomes, J. Liposome Res. 10(2 és 3), 117-129 (2000)), de az eredményekhez és ennek a technikának liposzómális készítményekben való alkalmazhatóságához további vizsgálatok szükségesek.

A polietilén-glikol használatával járó hátrányok arra késztették a kutatókat, hogy alternatív polimereket keressenek. Számos polimert megvizsgáltak, mint alkalmas jelöltet származékképzésre (vezikulumot formáló) lipidekkel a liposzómákba történő beépítésre (lásd pl. EP 0 688 207). A hidrofil víz-oldható polimerek, így a poli(vinil-pirrolidon), poli(akrilóil-morfolin), poli(2-(m)etil-2-oxazolin), poliakrilamid és poliglicerin azt mutatták, hogy meghosszabbítják a liposzómák keringési idejét intravénás beadás után egy bizonyos ideig. Azonban, a mai napig ilyen lipid-polimer-konjugátumokat nem alkalmaznak a kereskedelmi forgalomban kapható gyógyszerkészítményekben, főként mivel azok semmilyen előnyt nem mutattak az ismert lipid-PEG-konjugátumokkal szemben. Ezért még mindig fennáll az igény, hogy

egy olyan polimert találjunk, amelyből származék készíthető egy lipiddel, amely képes beépülni kolloidális hordozó kompozíciókba, így pl. liposzómákba, az ilyen polimer hosszú keringési tulajdonságokkal rendelkezik és ráadásul bizonyos előnyökkel a PEG-gel szemben, mint pl. biodegradálhatóság.

A találmány összefoglalása

A jelen találmány lipid-polimer-konjugátumokat bocsát rendelkezésre, amelyek legalább egy hidrofób apoláris egységet és egy hidrofil poláris fejcsoportot tartalmazó, amfifil lipidből és egy polimerből vagy ennek egy monomer prekursorából állíthatók elő, amelyek egy N- és egy C-terminális végcsoportot hordoznak, ahol a polimer egy poli(aminosav), egy poli(aminosav-származék) vagy egy poli(aminosav-analóg), és amelyben a lipid kovalensen kapcsolódik a polimer N- vagy C-terminális végcsoportjához, a polimer pedig az alábbi képlettel rendelkezik:

$-[\text{NHCHR}(\text{CH}_2)_m\text{CO}]_n-$, amelyben -R jelentése -H, $-\text{CH}_3$, $-\text{CHCH}_3\text{OR}_1$, $-(\text{CH}_2)_x\text{OR}_1$, $-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-\text{NHR}_1$, $-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}_1$, $-(\text{CH}_2)_x\text{SO}_y\text{CH}_3$, $\text{OR}-(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$; -R₁ jelentése -H vagy (C₁-C₄)alkil-amin-csoport; x jelentése 0-4; m jelentése 1 vagy 0 és y jelentése 1 vagy 2.

A találmány eljárásokat is rendelkezésre bocsát az ilyen konjugátumok előállítására és a konjugátumok alkalmazására.

Az ábrák leírása

Az 1. ábra a beinjekciózott dózis (ID) számított százalékos aránya átlag-értékeinek grafikus ábrázolása vérmintákban az idő függvényében a különböző össz-lipid mennyiséggel bíró, PEG-DSPE-tartalmú liposzómális készítmények esetében (22. példa).

A 2. ábra a beinjekciózott dózis (ID) számított százalékos aránya átlag-értékeinek grafikus ábrázolása vérmintákban az idő függvényében a különböző össz-lipid mennyiséggel bíró, PHEA-DODASuc-tartalmú liposzómális készítmények esetében (22. példa).

A 3. ábra az enkapszulázott prednisolon-foszfát (PLP) százalékos arányának grafikus ábrázolása a PEG-DSPE- és PHEA-DODASuc-tartalmú liposzómális készítményekben az idő függvényében (23. példa).

A 4. ábra az enkapszulázott prednisolon-foszfát-koncentráció grafikus ábrázolása a PEG-DSPE- és PHEA-DODASuc-tartalmú liposzómákban a vérben az idő függvényében (24. példa).

Az 5. ábra a gyulladásos talp pontjainak grafikus ábrázolása az idő függvényében sóoldat és prednisolon-foszfát-tartalmú liposzómák (PEG-DSPE-vel és PHEA-DODASuc-cal bevonva) egyetlen intravénás injekcióban történő beadása előtt és után (24. példa).

A 6. ábra a liposzómák beinjekciózott dózisának májban, lépben és máj+lépben talált százalékos aránya olyan liposzómák intravénás beadása után, amelyek PEG-DSPE, PHEG-diaminobután-DODASuc, PHPG-diaminobután-DODASuc, PHBG-diaminobután-DODASuc, és PHEA-DODASuc lipid-polimer-konjugátumokat tartalmaznak, illetve konvencionális liposzómák (BARE) beadása után (21. példa).

A találmány részletes leírása

Az amfifil lipid-polimer-konjugátumokat a találmány szerinti kompozíciókban egy amfifil lipidből és egy polimerből vagy annak egy monomer prekursorából kaphatjuk meg.

A találmány szerinti lipid-polimer-konjugátumban alkalmazandó amfifil lipideket különböző szintetikus vagy természetesen előforduló lipid közül választhatjuk ki, amelyek legalább egy hidrofób apoláris farkat és egy hidrofil poláris fejcsoporthoz tartalmazznak, mint pl. a vezikulumot képző lipidek és membrán lipidek.

A lipid-polimer-konjugátumban használandó amfifil lipid igen lényeges tulajdonsága, hogy a lipid egy funkcionális csoportot tartalmaz a poláris fejcsoporthoz, amely alkalmas kovalensen kapcsolódni a polimer lánchoz. A poláris felcsoport például egy primer vagy szekunder amincsoport, egy hidroxil-csoport, egy aldehid-csoport, egy halid vagy egy karboxil-csoport. A lipid hidrofób egysége lehetővé teszi a lipid-polimer-konjugátumok beépülését a kettősrétegű szerkezetekbe, mint pl. liposzómákba és egy ankerként (horgony) hat.

Az amfifil lipidekre példaként megemlítjük a foszfolipideket, glikolipideket, ceramidokat, koleszterint és származékait, telített vagy részlegesen telített, egyenes vagy elágazó láncú C_8 - C_{25} mono- vagy dialkil-aminokat, aril-alkil-aminokat, cikloalkil-aminokat, alkanolokat, aldehideket, karbohalidokat vagy alkánsavakat és ezek anhidridjeit, ahol az össz szénatomszám előnyösen 25 vagy ennél nagyobb.

Még specifikusabban alkalmas amfifil lipidek példái közé tartozik a foszfatidil-kolin, foszfatidil-etanol-amin, foszfatidil-inozitol, szfingomielin, sztearil-amin, mirisztal-alkohol, koleszterin és palmitinsav.

A lipid-polimer-konjugátumban egyik előnyös amfifil lipid egy olyan lipid, amely két hidrofób láncsal, tipikusan alkil-láncokkal és egy poláris fejcsoporttal rendelkezik, amely egy fent-leírt funkcionális csoportot tartalmaz. A foszfatidil-etanol-amin-származékok és különösen a disztearil-foszfatidil-etanol-amin ilyen előnyös foszfolipidek, mivel ezek egy reaktív aminocsoportot hordoznak.

További előnyös amfifil lipidek hidrofil poláris fejcsoportként egy primer vagy szekunder amint és két telített vagy telítetlen C_8 - C_{50} egyenes vagy elágazó szénláncú hidrofób apoláris egységeket hordoznak. Ezekre példaként szolgálnak az 1-heptadecil-oktadecil-amint és a disztearil-amint tartalmazó vegyületek, mint pl. disztearil-amin és N-szukcinil-dioktadecil-amin (DODASuc).

A találmány szerinti lipid-polimer-konjugátumok polimer részét egy poliaminosavból, egy poli(aminosav-származékból) vagy egy poli(aminosav-analógból) képezzük, amelyek olyan aminosav-monomerekből tevődnek össze, amelyekhez egy vagy több szubsztituens kapcsolódik. Erre példa a poli(2-hidroxi-etil)-L-glutamin. Egy poli(aminosav-analóg), amint itt használjuk, egy olyan polimer, amelyben az aminosav-monomer szénláncának hosszát csökkentettük vagy meghosszabbítottuk. Erre példaként szolgál a poli(homoszerin) és a poli(pentahomoszerin).

A polimer egy homo-polimer, amely olyan monomerekből épül fel, melyek az egész polimerláncon keresztül ugyanazok. Az is lehetséges, hogy a polimer rész blokk kopolimerekből áll, melyeket a poli(aminosav), poli(aminosav-származék) és poli(aminosav-

analóg) csoportból választunk ki, vagy hogy a polimer részt változó monomerek sorozatával vagy a monomerek szabályozott rendjével vagy alkalmas monomerek random polimerizációjával képezzük, melyeket egy vagy több aminosavból, aminosav-származékból és aminosav-analógból álló csoportból választunk ki. A polimerek lineárisak vagy elágazóak lehetnek és magukban foglalnak graft polimereket, de előnyösen lineárisak.

A felhasználható aminosavak a természetesen előforduló α -aminosavak. Azonban β -aminosavak, valamint nem-fehérje vagy nem-természetesen előforduló aminosavak is érdeklődésre tartanak számot. Mind az L- mind a D-konfigurációjú aminosavakat és származékokat felhasználhatjuk. Ha a lipid-polimer-konjugátumban a polimer aminosav-szekvenciáját L-aminosav-részekből képezzük, a kapott polimer enzimes degradációnak lesz alávetve. Másrészt, ha a találmány szerinti lipid-polimer-konjugátumban a polimer aminosav-szekvenciáját D-aminosavakkal képezzük, a kapott polimer valószínűleg stabil lesz a peptid-degradáló enzimekkel szemben. Az L- és D-aminosavak keverékét is alkalmazhatjuk. Tekintetbe véve a polimerek különböző tulajdonságait, a kolloidális hordozó részecskék, amelyekbe a találmány szerinti lipid-polimer-konjugátumokat beépítettük, felület-módosítását szabályozhatjuk a kiindulási anyagok L- és/vagy D-formáinak szelektív alkalmazásával a konjugátumok előállítására.

A jelen találmány szerinti lipid-polimer-konjugátumokba beépítésre alkalmas poliaminosav, poli(aminosav-származék) és poli(aminosav-analóg) vegyületek lényeges tulajdonsága, hogy azok vízben oldhatók (legalább 1 rész 100 rész vízben, előnyösen

1 rész 30 rész vízben és legelőnyösebben 1 rész 10 rész vízben vagy még kevesebben). A polimereket a vízben mért χ -paraméterükkel is jellemezhetjük. Ezt a polimer-oldószer kölcsönhatás paramétert pl. membrán-ozmometriával határozhatjuk meg. A polimerek, melyeket a találmány szerinti lipid-konjugátumokban előnyösen alkalmazhatunk, χ -paramétere $\leq 0,65$, előnyösen $\leq 0,5$ vízben.

A polimerek további lényeges tulajdonsága, hogy nem tartalmaznak lényeges mennyiségben elektromosan töltött csoportokat a fiziológiás 4 és 8 közötti pH-tartományban. Előnyösen semleges aminosav monomereket vagy aminosav-analóg monomereket használunk a polimerek előállításához vagy olyan aminosav-származék monomereket, amelyek semlegesek vagy semlegesítettek. Úgy tűnik, hogy az is megengedhető, hogy alacsony százalékos arányban töltéssel bíró csoportok jelen legyenek anélkül, hogy lerontanák a találmány szerinti kolloidális hordozó kompozíciók hosszú keringési tulajdonságait. Amint a (2-hidroxi-etil)-L-glutamin és töltéssel bíró monomerek kopolimerjeire igazoltuk, a pozitívan töltött csoportok nagyobb százalékos arányban lehetnek jelen, mint a negatívan töltött csoportok.

A polimerek előállítására alkalmas monomerek többek között az alanin, treonin, valin, α -amino-adipinsav, α,γ -diamino-vajsav származékai, ornitin, glutamin és származékai, beleértve a glutaminsavat, aszparagin és származékai, beleértve az aszparaginsavat, lizin-származékai, metionin és származékai, szerin, származékai és további CH_2 -csoportokkal képzett analógjai, mint például homoszerin és pentahomoszerin. Alkalmas oldal-

lánc-csoportok közé tartozik a (C_1-C_4) -alkil, hidroxil-alkil, dihidroxil-alkil, savamidok és aril-csoportok vagy ezek kombinációi, biztosítva, hogy a polimer vízzel oldható maradjon. Ezekre a csoportokra példa a 2-hidroxil-etil-, 3-hidroxil-propil-, 4-hidroxil-butyl- és 2,3-dihidroxil-propil-csoport. Az alkalmazható polimerek közé tartoznak például a poli(D,L-szerin) (PDLS), poli(2-hidroxil-etil)-D,L-glutamin (PDLHEG), poli(2-hidroxil-butyl-L-glutamin) (PHBG) és a poli(HEG-ko-glutaminsav) 1% glutaminsav (PHEG1%GA) kopolimer. Előnyös polimerek a poli(D,L-glutamin) (PDLG), poli(D,L-aszparagin) (PDLA), poli(hidroxil-propil)-L-glutamin (PHPG), poli(2-hidroxil-propil)-L-glutamin (P2HPG) és a β -alanin és 2-(hidroxil-etil)-L-glutamin kopolimerje (PbAHEG), poli(HEG-ko-dimetil-amino-etil-L-glutamin), mely 5 és 1% dimetil-amino-etil oldalcsoportokat tartalmaz (PHEG5%DG és PHEG1%DG). Még előnyösebb polimerek a homopolimerek, így a poli[N-(2-hidroxil-etil)-L-glutamin] (PHEG), poli(2-hidroxil-etil)-L-aszparagin (PHEA) és a poli(D,L-metionin-szulfoxid) (PDLMS).

A polimer-lánc 5 és 500 közötti monomer alegységet tartalmaz, előnyösen 20 és 100 közöttit. A polimer átlag molekulatömege 500 és 75000 között változik, előnyösen 2000 és 15000 között. Az átlag molekulatömeget különböző módokon becsülhetjük meg, mint az a technika állásából ismert. A jelen találmány példáiban a molekulatömeg becsülését az NMR-adatokon alapulva végezzük.

A találmány szerinti kompozíciókba beépített lipid-polimer-konjugátumok előállítására előnyösen olyan gyártási eljárásokat alkalmazunk, amelyekben az aminosav-monomerek oldalláncain lévő

reaktív csoportokat megvédjük a polimerizáció és a lipid kapcsolása előtt.

A lipid-polimer-konjugátumokat a szakterületen ismert eljárások szerint állíthatjuk elő. Egy jól-ismert módszer az aminosav-polimerek előállítására magában foglalja a megfelelő aminosav N-karboxi-anhidridek (NCA) gyűrű-felnyitó polimerizációját, adott esetben egy vagy több védőcsoporttal védve, nukleofillekkel, mint pl. (C₁-C₄)-alkil primer aminokkal iniciálva. Egy másik módszer, hogy lipid-polimer-konjugátumokat kapjunk, magában foglalja egy védett funkcionális csoporttal rendelkező amin, mint pl. N-Boc-1,4-diamino-bután, alkalmazását iniciátorként a gyűrű-felnyitó NCA polimerizációban. Habár két extra lépés, nevezetesen a funkciós csoport eltávolítása és az ezt követő kapcsolás a lipidhez a reaktív csoporttal, szükséges ebben az eljárásban, az ily módon előállított lipid-polimer-konjugátumok szintén alkalmasak a találmány szerinti kolloidális hordozó kompozíciókba történő beépítésre.

Ha az amfifil lipid egy C₈-C₃₀ egyenes vagy elágazó láncú mono- vagy dialkil-, di(hidroxi-alkil)- vagy dialkilén-amin, egy alkanol vagy egy ceramid, ezt előnyösen alkalmazhatjuk iniciátorként a gyűrű felnyitási polimerizációs reakcióban. Ez azt jelenti, hogy a polimerizációs reakció alatt az amfifil lipidet egylépésben kapcsoljuk a polimerhez. A poli-aminosavak molekulatömege erősen függ az oldószertől vagy az oldószerkombinációtól, a használt vegyszerek tisztaságától és a monomer/polimerizációs iniciátor aránytól. Általában elmondhatjuk,

hogy ha magasabb a monomer/polimerizációs iniciátor arány, magasabb lesz a polimer molekulatömege.

Amikor egy előre-meghatározott kompozíció polimerét kell előállítani, előnyösen alkalmazzuk a szilárdfázisú peptidszintézis módszert.

A polimer ismétlődő egységein jelenlévő védőcsoportokat aminoszálizással távolíthatjuk el egy amino-alkohol alkalmazásával, mint pl. 2-amino-etanol, 3-amino-propanol vagy 2,3-dihidroxi-propil-amin.

A találmány szerinti lipid-polimer konjugátuokat előnyösen beépíthetjük a találmány szerinti kolloidális hordozó kompozíciókba, így pl. vezikuláris kettősrétegű rendszerekbe, mint pl. liposzómák, nioszómák és fordított vezikulumok, micelláris rendszerek, nanokapszulák, nanogömbök, stb. Előnyös kolloidális hordozó rendszerek a vezikuláris kettősrétegű rendszerek. A liposzómák előállítása során a találmány szerinti lipid-polimer-konjugátumot összekeverjük a komponensekkel, melyeket normálisan a liposzómák készítése során használunk, mint pl. vezikulumformáló lipidek, stabilizátorok, stb. A konjugátumot moláris koncentrációban alkalmazzuk, mely elegendő ahhoz, hogy kiterjesszük a liposzómák keringési idejét a vérben néhányszorosára azoknak a liposzómákénak, amelyek polimer-lipid-konjugátumot nem tartalmaznak. A polimer konjugátumot tipikusan 1-15 mólszázalékban, előnyösen 3-10 mólszázalékban és legelőnyösebben 5-7,5 mólszázalékban alkalmazzuk.

A liposzómák átlagos mérete, Dynamic Light Scattering (DLS) technikákkal meghatározva, 200 nm alatti, előnyösen 150 nm alatti.

ti és legelőnyösebben 100 nm alatt van. Az ilyen típusú kolloidális hordozó részecskék méretének alsó határa 20 nm.

A polimer-lipid-konjugátumok, amikor a töltéssel bíró liposzómákba beépítettük, képességet mutattak arra, hogy redukálják a zeta-potenciált, ezáltal bizonyítva, hogy a polimer beépülve pajzsszerűen védi a felületi töltést.

A kompozíciókat számos módon beadhatjuk, azonban a parenterális beadási mód az előnyös. A hatóanyagtól és orvosi indikációtól vagy kezelendő rendellenességtől függően, a beadás intravénás, szubkután, intramuszkuláris, intraperitoneális, intra-artikuláris, stb. injekcióval történhet.

A jelen találmánnyal összhangban a liposzómális készítmények patkányoknak történő intravénás beadása után azt találtuk, hogy a liposzómák keringési ideje a vérben a kívánt céllal összhangban variálható. A keringési idő a vérben függ az alkalmazott lipid-polimer-konjugátumtól, különösen a lipid/polimer kombináció megválasztásától, a polimer molekulatömegétől és a beépülési sűrűségtől. Az eredmények hasonlóak azokhoz, melyeket a megfelelő PEG-beültetett liposzómáknál megfigyeltünk, pl. a lipid-PHEG-konjugátumokra, lipid-PHEA-konjugátumokra és a lipid-PDLMS-konjugátumokra, amelyekben az amfifil lipid egy kettős hidrofób farkat tartalmaz (PHEG-diaminobután-DODASuc, PHEA-DODASuc és PDLMS-DODASuc).

A találmány szerinti lipid-polimer-konjugátumokkal készített liposzómális készítmények stabilitása általában növekszik a konvencionális liposzómális készítményekkel összehasonlítva. Ráadásul a liposzómális készítmények stabilitását tovább növelhetjük

a lipid-polimer-konjugátum megfelelő kiválasztásával. Azt hangsúlyozni kell, hogy ez a kiválasztás a hatóanyag megválasztásától is függ. Így például egy kortikoszteroid vízzoldható származékának enkapszulációja maga a kortikoszteroid helyett egy liposzómális készítménybe, a liposzómális készítmény megnövekedett stabilitását fogja eredményezni. A prednisolon-foszfát enkapszulációja egy poli(hidroxi-etil)-aszparagin-DODASuc-konjugátumot tartalmazó liposzómába kissé jobb eredményt ad, mint a poli(2-hidroxi-etil)-L-glutamin-diaminobután-DODASuc-konjugátumot tartalmazó liposzómába történő beépítés. A stabilitás egy további növelését azáltal érhetjük el, hogy eltávolítjuk a vizes vezikulumot a liposzómális kompozícióból a szakterületen jól-ismert eljárásokkal, mint pl. permetezve-száritás, fagyasztva-száritás, rotációs bepárlás, stb..

A lipid-polimer-konjugátumok, melyeket a találmány szerinti kolloidális hordozó kompozíciókba beépítettünk, hosszú kerigési tulajdonságokat biztosítanak ezeknek a kompozícióknak. A hosszú kerigési tulajdonságok alatt a kolloidális hordozó kompozíció vérben való kerigési idejének növekedését értjük, összehasonlítva egy olyan kompozícióval, amely nem tartalmazza a lipid-polimer-konjugátumot. A hosszú keringési tulajdonságokata szakterületen ismert módszerekkel határozhatjuk meg (Torchilin VP, Shtilman MI, Trubetskoy VS, Whiteman K, Milstein AM.: Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo (Amfifil vinil-polimerek hatékonyan meghosszabbítják a liposzóma kerigési időt in vivo). Biochimica et Biophysica Acta 1195, 181-184 (1994); Torchilin VP,

Trubetskoy VS, Whiteman KR, Caliceti P, Ferruti P, Verones FM.>
New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of
liposomes in vivo (Új szintetikus amfifil polimerek a liposzómák
in vivo sztérikus védelmére). Journal of pharmaceutical sciences
84(9), 1049-1053 (1995)). A példákban egy eljárást ismertetünk a
liposzómák előállítására. Ezért az ilyen kompozíciókat, és külö-
nösen a vezikulárisakat felhasználhatjuk a készítmények variálá-
sához. Kivéve mint egy keringő drug rezervoárt, felhasználhatjuk
azokat a patológiás helyekre (tumorok, fertőzés, gyulladás) tör-
ténő passzív célbajuttatáshoz, és a véráramban a sejtekbe törté-
nő aktív célbajuttatásra, az endotéliumhoz történő juttatásra
(pl. angiogenezis-kapcsolt receptorokhoz), pl. irányító eszközök
kapcsolásával, így pl. monoklonális antitestekkel. További al-
kalmazás lehet egy mesterséges oxigén-szállító rendszer, vér-
pool leképezés és bioanyagok összetapadás elleni bevonása, mint
pl. katéterek és ér-protézisek.

Emellett a lipid-polimer-konjugátumok biodegradálhatók és ezért
igen nagy előnnyel rendelkeznek, különösen annak ténynek köszön-
hetően, hogy nem áll fenn az emberi vagy állati szervezet sejt-
jeiben a felhalmozódás rizikója.

Továbbá a lipid-polimer-konjugátumok azt mutatják, hogy egy
csökkent lipid-dózis függőség áll fenn a PEG-liposzómákkal ösz-
szehasonlítva.

Másik további, de igen lényeges előny lehet, hogy a találmány
szerinti kompozíciók második injekciója utáni fokozott kiválasz-
tást nem minden esetben figyeltük meg, és hogy a vérben a kering-
ési idő csökkenése mérsékelte. Ez szignifikáns előnyt jelenthet

a PEG-gel bevont, kolloidális hordozó kompozíciókkal összehasonlítva.

A találmány szerinti kolloidális hordozó kompozíciók a lehetőségek variációit biztosítják a terápiában, diagnosztikában, profilaxisban, stb. történő alkalmazáshoz. A lipid-polimer-konjugátumok sokoldalúságának köszönhetően, melynek komponenseit a céllal összhangban választhatjuk ki, és a kolloidális hordozó rendszerek variabilitására visszavezetve, melyekből az egyiket lehet kiválasztani, könnyen kitűnik, hogy általánosságban lehetséges minden hatóanyagra egy megfelelő kolloidális hordozó kompozíciót megtervezni. Első példaként, ha a találmány szerinti kompozíciók intravénás beadása után semmilyen vagy csak gyenge hatást figyelünk meg a vér-keringési időben, a területen jártas szakember képes variálni nagyszámú különböző paramétert a lipid-polimer-konjugátumban (pl. molekulatömeg, beépülési sűrűség, polimer, lipid, stb.) és a kolloidális hordozó kompozíciójában, hogy a standard készlet szerinti keringési időt növelje. Egy nagyon érdekes hatás látható, amikor a találmány szerinti kompozíciók egy vízoldható kortikoszteroidot tartalmaznak hatóanyagként. Egy in vivo kísérletes arthritis modellben az ilyen kompozíció egyetlen intravénás injekciója ugyanolyan hatásos, mint a nem-enkapszulázott kortikoszteroid vegyület ismételt injekciói, vagy amikor konvencionális liposzómákba enkapszuláztuk. Érdeklődésre számot tartó vízoldható kortikoszteroidok a budenosid-foszfát és a flunisolid vízoldható származékai és a fluticason-propionát. Kedvező hatások lehetnek az arthritiszhez kapcsolódó tünetek komplett és hosszan-tartó remissziója, miközben a

kortikoszteroid-alapú terápiával kapcsolatos mellékhatások csökkenni fognak a kortikoszteroid beadandó mennyiségében történő csökkenésre visszavezethetően, és mivel a kortikoszteroidok, amelyek normálisan gyorsan kiürülnek a vérből, így használhatók. Más betegségekben is, amelyekben a kortikoszteroidok a kiválasztott szerek vagy ko-terápiában kerülnek alkalmazásra, a találmány szerinti kompozíciók előnyös hatásai könnyen felismerhetők. Azonban, egyéb hatóanyagok is figyelemreméltó hatásokat mutatnak a találmány szerinti kompozíciókban.

Jóllehet a találmányt néhány részletében a szemléltetés és példa útján a megvilágítás és megértés céljából ismertettük, a területen jártas szakember számára a találmány kitanításának fényében magától értetődik, hogy bizonyos változtatások és módosítások megtehetőek anélkül, hogy az igénypontok oltalmi körétől eltérnénk.

Az alábbi példákkal tovább illusztráljuk a találmányt.

1. példa

Heptadecil-oktadecil-amin végcsoportot tartalmazó poli(γ -benzil-L-glutamát) (PBLG-heptadecil-oktadecil-amin)

0,94 g (3,6 mmol) γ -benzil-L-glutamát-N-karboxi-anhidridet (NCA) feloldunk 5 ml vízmentes DMF-ban nitrogén-atmoszféra alatt. Egyszerre hozzáadjuk 25 mg (0,05 mmol) 1-heptadecil-oktadecil-amin (Sigma Aldrich) 1 ml vízmentes kloroformban készült oldatát. Majdnem azonnal megindul a gázképződés (CO_2). Az oldatot 1 napig keverjük szobahőmérsékleten, majd 10-20-szoros feleslegben vett vízzel kicsapjuk. A fehér csapadékot összegyűjtjük és vákuumban szárítjuk. Hozam: 0,75 g.

$^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 -ban (δ ppm-ben az oldószer-csúcsra vonatkoztatva):

Benzil-glutamát: 7,2 (C_6H_5), 5,0 (benzil CH_2), 3,9 ($\alpha\text{-CH}$), 2,8 & 2,2 (β & γCH_2),

alkillánc: 1,2 (CH_2 alkillánc), 0,8 (CH_3).

2. példa

Heptadecil-oktadecil-amin végcsoportot tartalmazó poli[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamin] (PHEG-heptadecil-oktadecil-amin)

0,60 g PBLG-heptadecil-oktadecil-amin (lásd fent) 5 ml vízmentes DMF-ban készült oldatához hozzáadunk 0,15 g 2-hidroxipiridint és 0,8 ml etanol-amint. Ezt az oldatot 3 órán át keverjük szobahőmérsékleten nitrogén-atmoszféra alatt. Az oldatot 10-20-szoros feleslegű dietil-éterrel kicsapatjuk. A terméket kiszűrjük és vákuumban szárítjuk. A vízzoldható polimer terméket vízzel szemben 2 napig dializáljuk cellulóz-észter dialízis csövekben (MWCO 500). A tisztított, heptadecil-oktadecil-végcsoportot tartalmazó PHEG-et fagyasztva szárítás után kapjuk meg. Hozam: 0,30 g.

Jellemzés:

$^1\text{H-NMR}$ DMSO-d_6 -ban (δ ppm-ben az oldószer-csúcsra vonatkoztatva):

Hidroxi-etil-amin: 4,1 ($\alpha\text{-CH}$), 2,2 és 1,8-1,9 (β és γCH_2), 3,4 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 3,1 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$),

alkillánc: 1,2 (CH_2 alkillánc), 0,8 (CH_3).

A sztearil-szignálok és az $\alpha\text{-CH}$ szignál integráljának arányából a PHEG molekulatömegét 12000-re becsültük.

3. példa



**Di(sztearil-amin) végcsoportot tartalmazó poli[N-(2-hidroxi-
-etil)-L-glutamin], amelyet iniciátorként N-Boc-1,4-diamino-
bután útján vezetünk be (PHEG-diaminobután-DODASuc)**

2,5 g (9,5 mmol) γ -benzil-L-glutamát-N-karboxi-anhidridet feloldunk 2,5 ml vízmentes etil-acetát és 12,5 ml vízmentes diklór-metán elegyében és 0,95 ml (0,95 mmol) 1 mólos N-Boc-1,4-diamino-bután diklór-metános oldatát adjuk hozzá iniciátorként. Az elegyet 3 napon át nitrogén-atmoszférában szobahőmérsékleten keverjük és ezután metanolban kicsapjuk. Hozam: 1,48 g PBLG-N-Boc-diamino-bután.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrum az N-Boc-1,4-diaminobután jeleket δ 1,4-1,3-nál mutatja.

Maldi TOF ms:

Ismétlődő benzil-glutaminsav egység tömege: $n \times 219$.

m/z 1417 ($n=5$), 1636 ($n=6$), 1855 ($n=7$), 2074 ($n=8$), megfelelnek az N-Boc-1,4-diamino-bután csoportot (187 Da) és egy ciklikus peptid végcsoportot (112 Da) tartalmazó nátrium-addukt tömegeinek.

m/z 1433 ($n=5$), 1652 ($n=6$), 1872 ($n=7$), megfelelnek az N-Boc-1,4-diamino-bután csoportot (187 Da) és egy ciklikus peptid végcsoportot (112 Da) tartalmazó nátrium-addukt tömegeinek.

Védőcsoport-eltávolítás a PBLG-N-Boc-diamino-butánról:

738 mg PBLG-N-Boc-diamino-butánt 3,5 órán át keverünk 5 ml 4N sósavas dioxánban. Ezt követően a reakcióelegyet egy Rotavapor bepárlóban vákuumban bepároljuk. A párlási maradékot 5 ml tetrahidrofuránban feloldjuk és cseppenként 80 ml NaHCO_3 -oldatot

(6,5 g vízben) adunk hozzá. A terméket kiszűrjük, vízzel mossuk és vákuumban szárítjuk. Hozam: 677 mg PBLG-diamino-bután.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrum azt mutatja, hogy a védőcsoportot teljesen eltávolítottuk.

Maldi TOF tömeganalízis a kívánt molekulatömegeket mutatja.

Ismétlődő benzil-glutaminsav egység tömege: $n \times 219$.

m/z 1318 ($n=5$), 1537 ($n=6$), 1756 ($n=7$), 1976 ($n=8$), megfelelnek az 1,4-diamino-bután csoportot (87 Da) és egy ciklikus peptid végcsoportot (112 Da) tartalmazó nátrium-addukt tömegeinek.

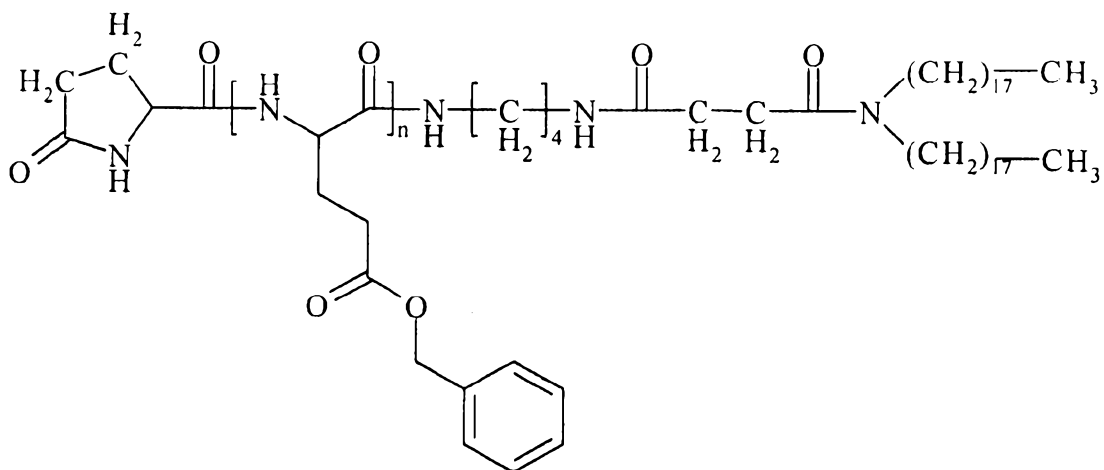
DODASuc-hoz történő kapcsolás:

62 mg (0,1 mmol) N-szukcinil-dioktadecil-amint (DODASuc, Schmitt et al.: J. Am. Chem. Soc. 116, 19, 8485-8491, 1994), 13,7 mg (0,12 mmol) N-hidroxi-szukcinimidet és 0,66 mg dimetil-amino-piridint (DMAP) feloldunk 2 ml diklór-metánban. Miután lehűtöttük 0°C -ra, 24,6 mg (0,12 mmol) N,N'-diciklohexil-karbodiimidet (DCC) adunk hozzá. Az oldatot 1 órán át 0°C -on és egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután az oldhatatlan diciklohexil-karbamidot kiszűrjük, és a szűrletet hozzáadjuk 200 mg PBLG-diamino-bután 3 ml diklór-metánban és 14 μl trietil-aminnal készült oldatához. Az oldatot egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük, majd metanolba csepegtetjük, a kivált anyagot szűrjük és szárítjuk. Hozam: 135 mg. Az $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrum azt mutatja, hogy a disztearil jelen van, CH_2 jelek δ 1,4-1,2-nél és CH_3 jelek δ 0,9-0,8-nál.

Maldi TOF tömeganalízis a kívánt molekulatömegeket mutatja, ami azt jelzi, hogy a DODASuc kapcsolódott a PBLG-diamino-butánhoz.

m/z 1922 ($n=5$), 2141 ($n=6$), 2360 ($n=7$), 2580 ($n=8$), 2799 ($n=9$), 3018 ($n=10$) megfelelnek egy ciklikus peptid végcsoportot (112 Da) tartalmazó PBLG-diaminobután-DODASuc nátrium-addukt tömegeinek.

Szerkezet:



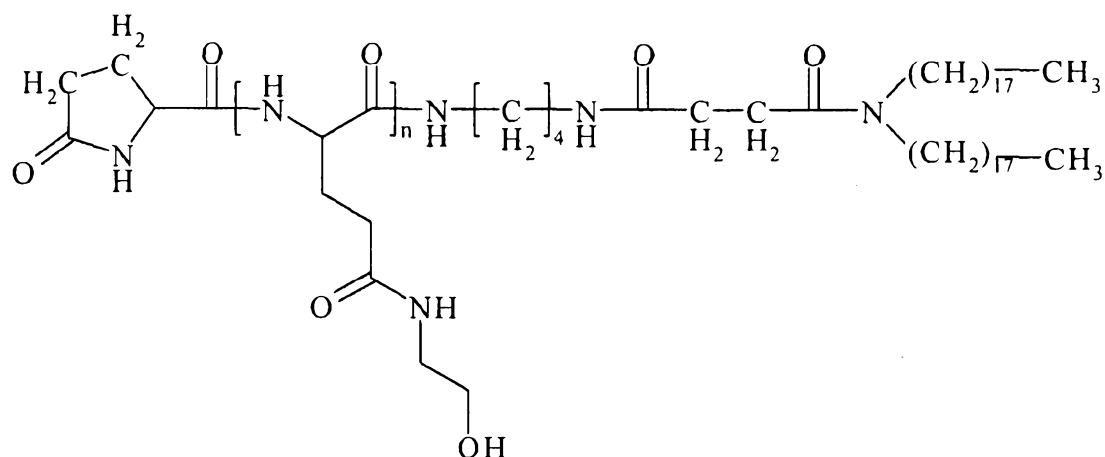
Aminolízis:

120 mg PBLG-diaminobután-DODASuc-ot és 10,8 mg 2-HP-t feloldunk 1,3 ml dimetil-formamidban és 0,68 ml 2-amino-etanolt adunk hozzá. Miután 24 órán át 40°C-on nitrogén-atmoszférában kevertük, becsepegtetjük kloroformba. A terméket kiszűrjük és vákuumban szárítjuk. Hozam: 83 mg PHEH-diaminobután-DODASuc.

Az $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) disztearil jeleket mutat δ 1,2-1,4-nél (CH_2) és δ 0,8-0,9-nél (CH_3).

A sztearil jelek és az $\alpha\text{-CH}$ jel integráljainak arányából a PHEG molekulatömegét 4000-re becsültük.

Szerkezet:



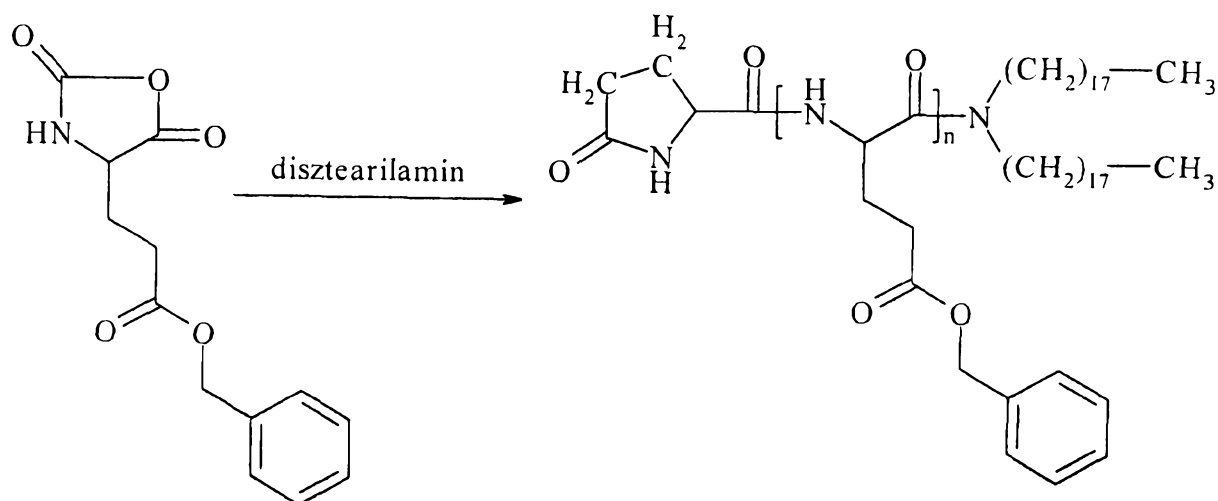
4. példa

Amin végcsoporttal rendelkező poli[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamin], melyet iniciátorként disztearil-ammal vezettünk be (PHEG-disztearil-amin)

1,0 g (3,8 mmol) γ -benzil-L-glutamát-N-karboxi-anhidridet feloldunk 1 ml vízmentes etil-acetát és 5 ml vízmentes diklór-metán elegyében. Ezt követően 163 mg disztearil-amin 3,26 ml diklór-metánban készült oldatából 2 ml-et (0,19 mmol) adunk hozzá. A lombikot CaCl_2 -dal töltött csővel látjuk el, és az elegyet 4 napig szobahőmérsékleten nitrogén atmoszféra alatt keverjük. Ezután a keveréket cseppenként metanolhoz adjuk, a kivált polimert szűrjük és vákuumban szárítjuk.

Hozam: 757 mg PBLG-disztearil-amin

Reakció:



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) analízis azt mutatja, hogy a sztearil jelen van a termékben: CH_3 jel δ -nál 0,9 (t) és a CH_2 jel δ -nál 1,3-1,2.

Maldi TOF ms:

Az ismétlődő benzil-glutaminsav-egység tömege: $n \times 219$.

m/z 1971 ($n=6$), 2190 ($n=7$), 2410 ($n=8$), 2629 ($n=9$), 2848 ($n=10$), megfelelnek a disztearil-amin csoportot (521 Da) és egy ciklikus peptid végcsoportot (112 Da) tartalmazó nátrium-addukt tömegeinek.

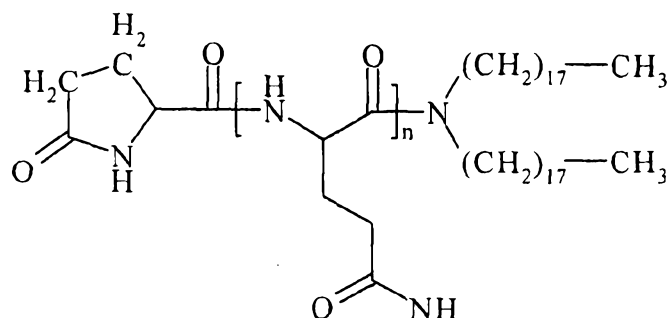
m/z 2206 ($n=7$), 2427 ($n=8$) megfelelnek a disztearil-amin csoportot (521 Da) és egy ciklikus peptid végcsoportot (112 Da) tartalmazó kálium-addukt tömegeinek.

Aminolízis:

A fent-előállított PBLG-disztearil-amin (600 mg) aminolízisét amino-etanollal és katalizátorként 2-hidroxipiridinnel dimetil-formamidban végezzük, így 430 mg PHEG-disztearil-amint kapunk.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) analízis disztearil-amin jeleket mutatott.

Szerkezet:



5. példa

Diaminobután-DODASuc végcsoportot tartalmazó poli[N-(hidroxialkil)-L-glutamin]

PBLG-(Boc)-diaminobután:

3 g γ -benzil-L-glutamát-N-karboxi-anhidrid (NCA) 8 ml vízmentes DMF-ban készült oldatához hozzáadjuk 0,1 g N-Boc-1,4-diaminobután 1 ml kloroformban készült oldatát. Az első órákban gázképződés (szén-dioxid) figyelhető meg. Ezt az oldatot 1 napon át nitrogén-atmoszférában szobahőmérsékleten keverjük. Miután kb. 100 ml metanollal a polimert kicsaptuk, kiszűrjük és szárítjuk, így 2 g Boc-védett aminocsoportot tartalmazó PBLG-t kapunk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ az oldószer-csúcsra vonatkoztatva):

Boc: 1,4 (CH_3)

PBLG: 2,2 és 2,6 ($\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 4,0 ($\alpha\text{-CH}$), 5,0 (benzil CH_2), 7,3 (fenil).

PBLG-diaminobután (Boc-védőcsoport eltávolítása):

1,1 g PBLG-N-Boc-diamino-butánt 3-4 órán át keverünk 5 ml 4N sósavas dioxánban, és ezután cseppenként hozzáadjuk kb. 80 ml NaHCO_3 -oldathoz (6,5 g vízben). A terméket kiszűrjük, vízzel mosuk és vákuumban szárítjuk. Hozam: 1 g PBLG-diamino-bután.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ az oldószer-csúcsra vonatkoztatva)

PBLG: 2,2 és 2,6 ($\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 4,0 ($\alpha\text{-CH}$), 5,0 (benzil CH_2), 7,3 (fenil).

Boc szignálok hiányoznak.

PBLG-diaminobután-DODASuc (DCC-s kapcsolás):

170 mg N-szukcinil-dioktadecil-amint (DODASuc), 90 mg DCC-t és 10 mg 4-(dimetil-amino)-piridinium-4-toluol-szulfonátot (DPTS) feloldunk 4 ml diklór-metánban. Az oldatot 1 órán át szobahőmérsékleten keverjük. 0,73 g PBLG-diamino-bután és 40 μl trietil-amin 3 ml diklór-metánban készült oldatát adjuk hozzá. A kivált diciklohexil-karbamidot tartalmazó oldatot egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük, majd feleslegben vett metanolba (kb. 100 ml) csepegtetjük. A polimer terméket kiszűrjük és szárítjuk. Hozam: 0,5 g.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ oldószer-csúcsra vonatkoztatva):

disztearil jelek 0,8-0,9-nél (CH_3) és 1,2-1,4-nél (metilén protonok)

PBLG: 2,2 és 2,6 ($\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 4,0 ($\alpha\text{-CH}$), 5,0 (benzil CH_2), 7,3 (fenil).

5.1. PHEG-diaminobután-DODASuc

A PHEG-diaminobután-DODASuc terméket a PBLG-diaminobután-DODASuc aminolízisével kapjuk meg az alábbiak szerint:

0,5 g PBLG-diaminobután-DODASuc-ot és 15 mg 2-hidroxi-piridint 4 ml DMF-ban feloldunk. Azután 2 ml etanol-amint adunk hozzá. Az oldatot 24 órán át 40°C-on nitrogén-atmoszférában keverjük és kb. 100 ml dietil-éterhez adva kicsapjuk. A PHEG-diaminobután-DODASuc-ot vízben feloldjuk, dializáljuk (MWCO 500) és ezt követő fagyasztva-szárítás 0,35 g tisztított PHEG-diaminobután-DODASuc konjugátumot eredményez.

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

diasztearil-szignálok 0,8-0,85-nél (CH₃) és 1,2-1,5-nél (metilén-protonok)

PHEG: 1,7-2,2 (β,γ-CH₂), 3,1 & 3,3 (hidroxi-etil), 4,2 (α-CH), 4,7 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

A disztearil-szignálok és az α-CH szignál integráljainak értelmezéséből a PHEG molekulatömegét kb. 4000-nek számítottuk.

A MALDI-TOF megfelel a PHEG-diaminobután-DODASuc konjugátum molekula-szerkezetének.

Na⁺-addukt: m/z 3064,5 (n=13), 3236,1 (n=14), 3408,7 (n=15), 3580,6 (n=16), 3752,9 (n=17), 3924,7 (n=18), 4096,7 (n=19), 4268,4 (n=20), 4441,1 (n=21), 4613,3 (n=22), 4785,1 (n=23), stb.

5.2. Poli[(2-hidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc

A poli[(2-hidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc cím szerinti terméket a PBLG-diaminobután-DODASuc 2-propanol-aminnal (izopropanol-amin) végzett aminolízisével kapjuk meg az alábbiak szerint:

0,15 g PBLG-diaminobután-DODASuc-ot és 0,05 g 2-hidroxi-piridint 4 ml DMF-ban feloldunk. Azután 1 ml 2-propanol-amint

adunk hozzá. Az oldatot 24 órán át 40°C-on nitrogén-atmoszférában keverjük és kb. 100 ml dietil-éterhez adva kicsapjuk. Szárítás után 0,1 g PHizoPG-diaminobután-DODASuc-ot kapunk. A polimert vízben feloldjuk, dializáljuk (MWCO 500) és ezt követő fagyasztva-szárítás tisztított poli[(2-hidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc-ot eredményez.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

diasztearil-szignálok 0,8-0,85-nél (CH_3) és 1,2-1,5-nél (metilén-protonok)

PHPG: 1,7-2,2 ($\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 1,0 (CH_3) & 3,0 & 3,3 & 3,7 (hidroxipropil), 4,2 ($\alpha\text{-CH}$), 4,7 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

Számított molekulatömeg: kb. 4000.

5.3 Poli[(3-hidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc

A poli[(3-hidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc cím szerinti terméket a PBLG-diaminobután-DODASuc 3-propanol-ammal végzett aminolízisével kapjuk meg az alábbiak szerint:

0,3 g PBLG-diaminobután-DODASuc-ot és 0,1 g 2-hidroxipiridint 4 ml DMF-ban feloldunk. Azután 2 ml 3-propanol-amint adunk hozzá. Az oldatot 24 órán át 40°C-on nitrogén-atmoszférában keverjük és kb. 100 ml dietil-éterhez adva kicsapjuk. Szárítás után 0,25 g PHPG5000-diaminobután-DODASuc-ot kapunk. A polimert vízben feloldjuk, dializáljuk (MWCO 500) és ezt követő fagyasztva-szárítás tisztított poli[(3-hidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc-ot eredményez.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

diasztearil-szignálok 0,8-0,85-nél (CH_3) és 1,2-1,5-nél (metilén-protonok)

PHPG: 1,7-2,2 ($\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 1,5 & 3,1 & 3,3 (hidroxipropil), 4,2 ($\alpha\text{-CH}$), 4,6 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

Molekulatömeg: kb. 5000.

Maldi-TOF:

Na^+ -addukt: m/z 3623 ($n=15$), 3810 ($n=16$), 3996 ($n=17$), 4182 ($n=18$), 4368 ($n=19$), 4555 ($n=20$), stb.

5.4 Poli[(4-hidroxipropil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc

A poli[(4-hidroxipropil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc cím szerinti terméket a PBLG-diaminobután-DODASuc 4-propanol-aminnal végzett aminolízisével kapjuk meg az alábbiak szerint:

0,3 g PBLG-diaminobután-DODASuc-ot és 0,1 g 2-hidroxipiridint 4 ml DMF-ban feloldunk. Azután 2 ml 4-butanol-amint adunk hozzá. Az oldatot 24 órán át 40°C -on nitrogén-atmoszférában keverjük és kb. 100 ml dietil-éterhez adva kicsapjuk. A polimert vízben feloldjuk, dializáljuk (MWCO 500) és ezt követő fagyasztva-száritás 0,2 g tisztított poli[(4-hidroxipropil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc-ot eredményez.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

diasztearil-szignálok 0,8-0,85-nél (CH_3) és 1,2-1,5-nél (metilén-protonok)

PHBG: 1,7-2,2 ($\beta, \gamma\text{-CH}_2$), 1,4 & 3,1 & 3,3 (hidroxibutil), 4,2 ($\alpha\text{-CH}$), 4,5 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

Molekulatömeg: kb. 4000.

5.5 Poli[(2,3-dihidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc

Poli[(2,3-dihidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc cím szerinti terméket a PBLG-diaminobután-DODASuc 2,3-dihidroxi-propil-aminnal végzett aminolízisével kapjuk meg az alábbiak szerint:

0,15 g PBLG-diaminobután-DODASuc-ot és 0,06 g 2-hidroxi-piridint 3 ml DMF-ban feloldunk. Azután 1 ml 2,3-dihidroxi-propil-amint adunk hozzá. Az oldatot 1 napon át 40°C-on nitrogén-atmoszférában keverjük és kb. 100 ml dietil-éterhez adva kicsapjuk. A polimert vízben feloldjuk, dializáljuk (MWCO 500) és ezt követő fagyasztva-száritás 0,1 g tisztított poli[(2,3-dihidroxi-propil)-L-glutamin]-diaminobután-DODASuc-ot eredményez.

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

diasztearil-szignálok 0,8-0,85-nél (CH₃) és 1,2-1,5-nél (metilén-protonok)

Poli(dihidroxi-propil)G: 1,7-2,2 (β,γ-CH₂), 3,1 & 3,3-3,6 (dihidroxi-propil), 4,2 (α-CH), 4,6 & 4,8 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

Molekulatömeg: kb. 4000.

6. példa

Koleszteril-PHEG

0,2 g PBLG-NH₂ és 20 µl trietil-amin 2 ml kloroformban készült oldatához 0,07 g klór-hangyasav-koleszteril-észter 1 ml kloroformban készült oldatát adjuk. Az oldatot kb. 1 órán át szobahőmérsékleten keverjük és ezután dietil-éterhez adva kicsa-

patjuk. A csapadékot összegyűjtjük és szárítjuk, így 0,13 g polimer terméket kapunk.

Az etanol-aminnal (2-hidroxi-piridin katalizátorként szerepel) 1 napig 40°C-on végzett aminolízis koleszteril-PHEG-t eredményez. A polimer terméket dialízissel tisztítjuk (MWCO 500).

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

PHEG: 1,7-2,2 (β,γ-CH₂), 3,1 & 3,3 (hidroxi-etil), 4,2 (α-CH), 4,7 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

Koleszteril: 0,6-1,6

Molekulatömeg: kb. 4000

Maldi-TOF megfelel a koleszteril-PHEG-konjugátum molekulaszerkezetének.

Na⁺-addukt: *m/z* 3046 (n=14), 3218 (n=15), 3390 (n=16), 3562 (n=17), 3735 (n=18), 3907 (n=19), 4080 (n=20), stb.

7. példa

Poli(2-hidroxi-etil)-DL-glutamin-diaminobután-DODASuc

A szintézis analóg a poli(2-hidroxi-etil)-L-glutamin-diaminobután-DODASuc szintézisével (5. példa) néhány eltéréssel: γ-benzil-DL-glutamin NCA-t állítunk elő γ-benzil-L- és γ-benzil-D-glutamát 1:1 arányú keverékéből és etil-acetát/hexánból (kb. 1:5) átkristályosítjuk (lásd 1. példa). A poli(benzil-DL-glutamin)-diaminobután-BOC-ot metanol helyett vízzel csapjuk ki. A poli(benzil-DL-glutamin)-diaminobután-DODASuc-ot metanollal csapjuk ki.

NMR-spektrum látszólag azonos a poli(2-hidroxi-etil)-L-glutamin-diaminobután-DODASuc spektrumával (5.1. példa)

Molekulatömeg: kb. 3000.

8. példa

PHEG-kopolimer: poli(HEG-ko-glutaminsav)-diaminobután-DODASuc;
5% glutaminsav

0,14 g PBLG-diaminobután-DODASuc, 0,05 g 2 hidroxipiridin, kb. 1 ml etanol-amin 1,5 ml DMF-ban készült oldatát nitrogén-atmoszférában keverjük 1 napig szobahőmérsékleten. Az oldatot dietil-éterbe öntve kicsapjuk. A terméket, a részlegesen etanol-aminnal aminolizált PBLG-diaminobután-DODASuc-ot (PHEG 5% benzil-észter oldalcsoportokkal) összegyűjtjük és szárítjuk. Az DMSO-ban felvett NMR 5% nem-reagált benzilcsoport jelenlétét mutatta ki.

Az említett polimert 8,5 ml 1M NaOH-ban feloldjuk és 4 órán keresztül keverjük. Az oldatot 1N HCl-lel neutralizáljuk, és ezután néhány napig dializáljuk (MWCO 500). Negatívan töltött (fiziológiás pH-n) kopolimer-lipid-konjugátumot (0,1 g) kapunk a dializált oldat fagyasztva szárítása után.

A DMSO-ban felvett NMR a benzilcsoportok teljes konverzióját mutatja.

A MaldiTOF-ot használtuk mindkét glutaminsav és a hidroxietil-glutamin ismétlődő egységek jelenlétének kimutatására.

Molekulatömeg: kb. 3500.

9. példa

PHEG-kopolimer: poli(HEG-ko-(dimetil-amino-etil-glutamin))-diaminobután-DODASuc; 5% (dimetil-amino-etil)-oldalcsoportok

0,25 g PBLG-diaminobután-DODASuc, 0,08 g 2-hidroxi-piridin, kb. 1 ml etanol-amin 2,5 ml DMF-ban készült oldatát nitrogén-atmoszférában keverjük 2 napig szobahőmérsékleten. A kapott oldatot dietil-éterbe öntve kicsapjuk. Az etanol-aminnal részlegesen aminolizált PBLG-diaminobután-DODASuc-ot (PHEG 5% benzil-észter oldalcsoporthoz) összegyűjtjük és szárítjuk. Az CDCl_3 -ban felvett NMR 5% nem-reagált benzilcsoport jelenlétét mutatta ki.

0,16 g etanol-aminnal részlegesen aminolizált PBLG-diaminobután-DODASuc, 0,06 g 2-hidroxi-piridin, kb. 1 ml N,N-dimetil-etilén-diamin 2,5 ml DMF-ban készült oldatát nitrogén-atmoszférában keverjük 1 napig 40°C-on. A dietil-éterrel történő kicsapás egy port eredményez, amelyet összegyűjtünk és vákuumban szárítunk. A DMSO-ban felvett NMR a maradék benzilcsoportok teljes konverzióját mutatja. A terméket vízben feloldjuk és néhány napig dializáljuk (MWCO 500) és ezt követően fagyasztva szárítjuk. Hozam: 0,1 g pozitívan töltött PHEG-kopolimer-lipid-konjugátum.

Molekulatömeg: kb. 4000.

10. példa

Poli(2-hidroxi-etil)-L-aszparagin (PHEA) egy sztearil-amin vagy egy heptadecil-oktadecil-amin végcsoporttal

β -Benzil-L-aszpartát-N-karboxi-anhidrid (NCA):

5 g β -benzil-L-aszpartát 50 ml desztillált THF-ban, amely kb. 16 ml 20%-os toluolos foszgén-oldatot tartalmaz, készített szuszpenzióját 60-65°C-ra melegítjük (az oldat fölött nitrogén-

gázt vezetünk át). Kb. tíz perc múlva tiszta oldatot kapunk. Majd kb. másfél óra múlva az oldatot lassan kb. 140 ml n-hexánba csurgatjuk. Azonnal kristályok képződnek. A további kristályosodáshoz egy éjszakán át -20°C -on állni hagyjuk, majd az NCA kristályokat izoláljuk. Tovább kristályosítjuk THF/hexánból és forró kloroformból, így 4,3 g finom tű-alakú kristályokhoz jutunk (Biopolymers 15(9), 1869-71, 1976).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

benzilcsoport: 7,3 (fenil), 5,1 (CH_2)

aszpartát-NCA: 2,8 & 3,0 ($\beta\text{-CH}_2$), 4,5 ($\alpha\text{-CH}$), 6,4 (NH).

Sztearil-PBLA:

0,95 g β -benzil-aszpartát-NCA 2 ml DMF-ban készült oldatához 0,04 g sztearil-amin 0,5 ml kloroformban készített oldatát adjuk. Néhány órás keverés után 60°C -on a zavaros oldatot metanolhoz adva kicsapjuk. Szárítás után 0,56 g poli(benzil-L-aszpartát)-sztearil-aminhoz jutunk.

Heptadecil-oktadecil-PBLA:

0,5 g β -benzil-aszpartát-NCA 2 ml DMF-ban készült oldatához 0,1 g heptadecil-oktadecil-amin kb. 1 ml kloroformban készített oldatát adjuk. Három napig keverjük szobahőmérsékleten és a zavaros oldatot metanolhoz adva kicsapjuk. Hozam: 0,2 g polimer termék, PBLA-heptadecil-oktadecil-amin.

Sztearil-/heptadecil-oktadecil-PHEA:

A PBLA-konjugátumok aminolízisét etanol-ammónium- és katalizátorként 2-hidroxi-piridinnel végezzük 40°C -on 1 napig, ezt követően dietil-éterben kicsapjuk, ami vízzeloldható poli(hidroxi-etil)-L-aszparagint (PHEA) eredményez, amely egy sztearil- vagy

egy heptadecil-oktadecil-farkat hordoz. A lipid-polimer-konjugátumokat dialízissel (MWCO) tisztítjuk.

sztearil-PHEA:

Maldi-TOF: Na^+ -addukt: m/z 2823 ($n=16$), 2981 ($n=17$), 3139 ($n=18$), 3297 ($n=19$), 3455 ($n=20$), 3613 ($n=21$), stb.

A Maldi-TOF analízisből arra következtettünk, hogy mindegyik PHEA-lánc egy szabad amino-végcsoportot tartalmaz.

heptadecil-oktadecil-PHEA:

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

heptadecil-oktadecil: 0,8 & 1,2

PHEA: 2,2-2,6 ($\beta\text{-CH}_2$), 3,1 & 3,4 (hidroxi-etil), 4,5 ($\text{OH}+\alpha\text{-CH}$), 7,8 & 8,3 (NH)

Molekulatömeg: kb. 6000.

11. példa

Poli(2-hidroxi-etil)-L-aszparagin-DODASuc

PBLA-DODASuc:

1,7 g β -benzil-L-aszpartát-N-karboxi-anhidrid (NCA) 5 ml DMF-ban készült oldatához 0,2 ml 2M THF-os dimetil-amin-oldatot adunk. A tiszta oldatot 1 napig keverjük és ezután metanol (kb. 100 ml) és víz (250 ml) elegyéhez adva kicsapjuk. Hozam: 1,3 g PBLA, amely egy metil-amid és egy amino-végcsoportot tartalmaz.

0,4 g PBLA, 30 mg DCC, 10 mg DPTS és 100 mg N-szukcinil-disztearil-amin 5 ml DMSO-ban és 1 ml kloroformban készült oldatát 1 napig keverjük, majd vízben kicsapjuk. A polimer terméket keverjük/mossuk dietil-éterrel és szárítjuk.

PHEA-DODASuc:

A PBLA-DODASuc aminolízisét etanol-ammal (katalizátorként 2-hidroxi-piridint használva) DMF-ban 40°C-on 1 napon keresztül végezzük, ami PHEA-DODASuc-ot eredményez (0,2 g dialízis és fagyasztva szárítás után).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

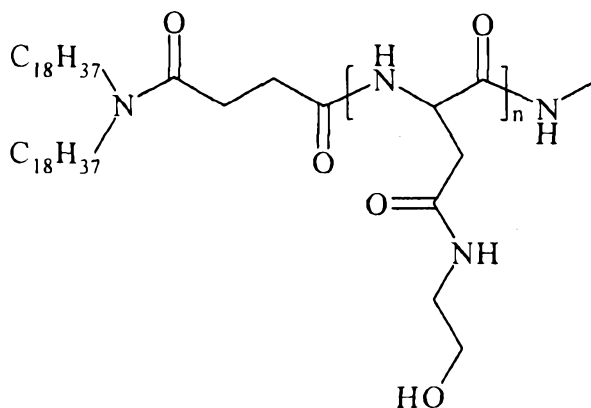
disztearil: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

PHEA: 2,4-2,8 ($\beta\text{-CH}_2$), 3,2 & 3,4 (hidroxi-etil), 4,6 ($\alpha\text{-CH+OH}$), 7,8 & 8,5 (NH)

Számított molekulatömeg: kb. 3000.

Maldi-TOF. megfelel a PHEA-DODASuc-konjugátum molekulaszerkezetének

Na^+ -addukt: m/z 2084 ($n=9$), 2243 ($n=10$), 2401 ($n=11$), 2559 ($n=12$), 2718 ($n=13$), 2876 ($n=14$), stb.



12. példa

Poli (2-hidroxi-etil) -L-aszparagin-DSPEsuc-konjugátum

A benzil-L-aszpartát-NCA metil-amin-iniciált polimerizációjával nyert PBLA (polibenzil-L-aszpartát) aminolízise után amino-terminálissal rendelkező PHEA-t kapunk. Szukcinilezett DSPE-t (szintézise analóg ahhoz, melyet a DPPE-re leírtak: JACS



116, 8485, 1994) először NHS-észterévé alakítunk át *in situ* DCC-vel (diciklohexil-karbodiimid):

70 mg szukcinilezett DSPE-t, 20 mg NHS-t (N-hidroxiszukcinimid), 5 mg DMAP-t és 30 mg DCC-t 2 ml diklór-metánban feloldunk és kb. 3-4 órán keresztül keverünk. Ehhez a reakcióelegyhez 0,13 g amino-végcsoportú PHEA-t adunk (molekulatömeg kb. 4000) 2 ml DMSO-ban. Egy éjszakán át keverjük, majd éterhez adva kicsapjuk. A csapadékot összegyűjtjük és vízben feloldjuk, majd néhány napig dializáljuk (MWCO 500). Fagyasztva szárítás után kb. 80 mg PHEA-DSPE-t kapunk.

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

DSPE: 0,8 (CH₃), 1,2 (CH₂), 1,4 (CH₂-N)

PHEA: 2,4-2,8 (β-CH₂), 3,2 & 3,4 (hidroxietil), 4,6 (α-CH+OH), 7,8 & 8,4 (NH)

Számított molekulatömeg: kb. 4000.

13. példa

Poli (DL-szerin) -DODASuc

O-Benzil-DL-szerin-N-karboxi-anhidrid (NCA):

2,5 g O-benzil-DL-szerin 30 ml desztillált (vízmentes) THF-ban, amely kb. 10 ml 20%-os toluolos foszgén-oldatot tartalmaz, készített szuszpenzióját 60-65°C-ra melegítjük (az oldat fölött nitrogén-gázt vezetünk át). Kb. öt perc múlva tiszta oldatot kapunk. Majd kb. másfél óra múlva az oldatot lassan kb. 100 ml n-hexánba öntjük. A termék olaj formájában kiválik. Az oldószert dekantáljuk és az olajat kb. 25 ml etil-acetátban feloldjuk, amelyhez lassan 100 ml hexánt adunk. A lombik erőteljes rázása



és -20°C -on történő tartása után az O-benzil-DL-szerin-NCA kezd kikristályosodni. Hasonló átkristályosítás etil-acetát/hexán elegyből és/vagy kloroform/hexán elegyből 2 g kritályos anyagot eredményez (Biopolymers 15(9), 1869-71, 1976).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

benzilcsoport: 4,5 (CH_2), 7,2 (fenil)

szerin-NCA: 3,7 ($\beta\text{-CH}_2$), 4,4 ($\alpha\text{-CH}$), 5,8 (NH)

Poli(O-benzil-DL-szerin):

0,9 g O-benzil-DL-szerin-NCA 2,5 ml DMF-ben készült oldatához 0,08 ml-t adunk 2 M metil-amin THF-ban készült oldatából. Néhány óráig tartó szobahőmérsékleten való keverés után az oldat zavarossá és viszkózussá válik. Egy nap után a viszkózus, "kristályosodott" oldatot összekeverjük metanol/víz eleggyel, hogy a polimer terméket teljesen kicsapjuk. Hozam: 0,6 g poli(O-benzil-DL-szerin) polimer termék.

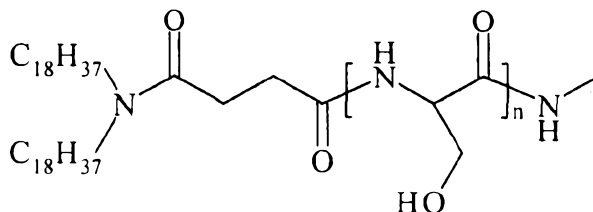
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

benzilcsoport: 4,4 (CH_2), 7,2 (fenil)

poliszerin: 3,5 ($\beta\text{-CH}_2$), 4,7 ($\alpha\text{-CH}$), 8,2 (NH)

Poli(O-benzil-DL-szerin)-DODASuc:

150 mg N-szukcinil-dioktadecil-amint (DODASuc), 80 mg DCC-t és 5 mg DPTS-t feloldunk 4 ml kloroformban. Az oldatot 1 órán keresztül szobahőmérsékleten keverjük. Majd 0,6 g poli(O-benzil-DL-szerin) és kb. 50 μl trietil-amin kb. 5 ml kloroformban készült oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük (amely a kivált diciklohexil-karbamidot tartalmazza), majd cseppenként feleslegben metanolt (kb. 100 ml)



14. példa**Poli-L-treonin-DODASuc**

A szintézis analóg a poli(D,L-szerin)-DODASuc szintézisével és azt O-benzil-L-treonin.HCl-ből és foszgénből kiindulva O-benzil-L-treonin-N-karboxi-anhidriden (NCA) keresztül valósítjuk meg.

Poli-L-treonin-DODASuc (M = kb. 2000):

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

disztearil: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,6 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

politreonin: 1,0 (CH_3), 4,0 ($\beta\text{-CH}$), 4,3 ($\alpha\text{-CH}$), 5,0 (OH), 7,8 (NH).

15. példa**Poli(D,L-metionin-szulfoxid)-DODASuc**

D,L-metionin-N-karboxi-anhidrid (NCA):

2,5 g DL-metionin 40 ml desztillált (vízmentes) THF-ban, amely kb. 15 ml 20%-os toluolos foszgén-oldatot tartalmaz, készített szuszpenzióját 60-65°C-ra melegítjük (az oldat fölött nitrogén-gázt vezetünk át). Majdnem azonnal tiszta oldat keletkezik. Körülbelül 1 óra múlva az oldatot lassan kb. 140 ml n-hexánba öntjük. A DL-metionin-NCA -20°C-on kikristályosodik (néhány nap alatt). Etil-acetát/hexán elegyből átkristályosítva kb. 0,7 g kristályos anyaghoz jutunk (Biopolymers 15(9), 1869-71, 1976).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

metionin-NCA: 2,0-2,4 ($\beta\text{-CH}_2 + \text{CH}_3$), 4,5 ($\alpha\text{-CH}$), 6,8 (NH)

Poli(DL-metionin):

0,7 g DL-metionin-NCA 2,5 ml DMF-ben készült oldatához 0,1 ml-t adunk 2 M metil-amin THF-ban készült oldatából. Egy napig tartó keverés után a zavaros oldatot kb. 100 ml metanolhoz adva kicsapjuk, és ezt követően szárítjuk. Hozam: 0,33 g poli(DL-metionin) polimer termék.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{TF-d}$) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

polimetionin: 2,0-2,3 (CH_2 & CH_3), 2,6 (CH_2), 4,7 ($\alpha\text{-CH}$).

Poli(DL-metionin)-DODASuc:

80 mg N-szukcinil-dioktadecil-amint (DODASuc), 45 mg DCC-t és 5 mg DPTS-t feloldunk 2 ml kloroformban. Az oldatot 1 órán keresztül szobahőmérsékleten keverjük. Majd 0,33 g poli(DL-metionin) és kb. 20 μl trietil-amin kb. 2,5 ml DMSO-ban készült oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük (amely a kivált diciklohexil-karbamidot tartalmazza), majd cseppenként feleslegben metanolt (kb. 100 ml) adunk hozzá. A polimer terméket kiszűrjük és szárítjuk. Hozam: 0,22 g.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

disztearil: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

polimetionin: 1,8 ($\beta\text{-CH}_2$), 2,0 (CH_3), 2,4 ($\gamma\text{-CH}_2$), 4,4 ($\alpha\text{-CH}$), 8,1 (NH).

Poli(DL-metionin-szulfoxid)-DODASuc:

poli(DL-metionin)-DODASuc mono-oxidációja:

0,3 g nátrium-perjodát 2 ml vízben készült oldatát lassanként hozzáadjuk 0,22 g poli(DL-metionin)-diaminobután-DODASuc kb. 6 ml ecetsavban készült szuszpenziójához. Az így-kapott na-

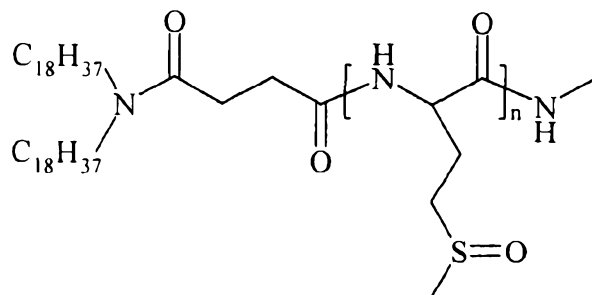
rancessárga/vörös oldatot (amely néhány óra múlva keletkezik) egy éjszakán át keverjük. Ezután kb. 15 ml vizet adunk hozzá, és kapott narancssárga/vörös oldatot néhány napig dializáljuk (MWCO 500). Fagyasztva szárítás után 0,25g terméket nyerünk.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

disztearil: 0,7 (CH_3), 1,2 (CH_2) (széles csúcsok)

polimetionin-szulfoxid: 2,0 ($\beta\text{-CH}_2$), 2,5 (CH_3), 2,8 ($\gamma\text{-CH}_2$), 4,3 ($\alpha\text{-CH}$), 8,5 (NH).

Számított molekulatömeg: kb. 4000



16. példa

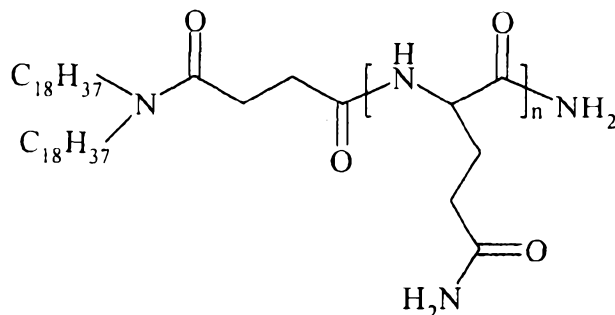
Poli (DL-glutamin) -DODASuc

A poli(DL-glutamin)-DODASuc-konjugátumot az Ansynth Service B.V. szintetizálta meg szilárd fázisú szintézis módszerrel (kb. 50 mg-os méretben). A poli(DL-glutamin)-t ($n=20$) egy gyantához kötve "step by step" építették fel Fmoc-védett aminosavakkal. Az N-terminálisához kapcsolták az N-szukcinil-disztearil-amint. A C-terminálist átalakították amiddá. Az $^1\text{H-NMR}$ spektrum igazolta a szerkezetet.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

disztearil: 0,8 (CH₃), 1,2 (CH₂), 1,4 (CH₂-N)

poliglutamin: 1,7-2,2 (β,γ-CH₂), 4,2 (CH), 6,8 & 7,3 (NH₂), 8,2 (NH).



17. példa

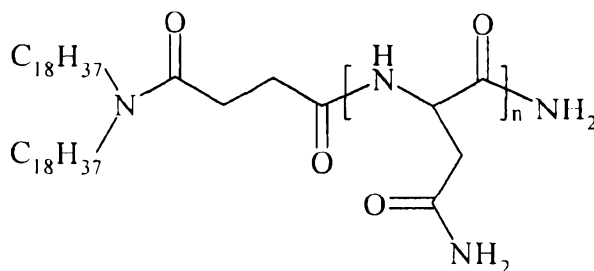
Poli (DL-aszparagin) -DODASuc

A poli(DL-aszparagin)-DODASuc-konjugátumot az Ansynth Service B.V. szintetizálta meg szilárd fázisú szintézis módszerrel (kb. 50 mg-os méretben). A poli(DL-aszparagin)-t (n=20) egy gyantához kötve "step by step" építették fel. Az N-terminálishoz kapcsolták az N-szukcinil-disztearil-amint. A C-terminálist átalakították amiddá. A DMSO-ban felvett ¹H-NMR spektrum igazolta a szerkezetet.

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ az oldószer csúcsra vonatkoztatva):

disztearil: 0,8 (CH₃), 1,2 (CH₂), 1,4 (CH₂-N)

poliaszparagin: 2,5 (CH₂), 4,5 (CH), 7,0 & 7,4 (NH₂), 8,1 (NH).



18. példa**Poli (DL-alanin) -DODASuc**

95 mg poli(DL-alanin)-t (Sigma; móltömeg: kb. 2000) 4 ml DMSO-ban feloldunk. 40 μ l trietil-amint adunk ehhez az oldathoz. Ezt követően ezt az oldatot hozzáadjuk 0,1 g DODASuc, 70 mg DCC és 5 mg DPTS 2 ml kloroformban készült oldatához, amelyet 1 órán át kevertünk. A reakcióelegyet 1 napig keverjük, majd metanol/dietil-éter elegyében kicsapjuk. A csapadékot kiszűrjük és szárítjuk.

^1H -NMR DMSO-ban felvéve:

disztearil: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 (CH_2N)

polialanin: 1,2 (CH_3), 4,2 (CH), 8,0 (NH).

19. példa **β -Alanin és (hidroxi-etil)-L-glutamin kopolipeptidje**

DODASuc-(β -Ala) $_3$ -Glu(OBzl)-(β -Ala) $_4$ -Glu(OBzl)-(β -Ala) $_3$ -Glu(OBzl)-
-(β -Ala) $_2$ -NH $_2$:

A β -alanin és benzil-L-glutamát kopolipeptidet szilárd fázisú szintézissel az Ansynth Service B.V.-vel szintetizáltattuk meg Fmoc-védett monomerekből kiindulva.

C-terminális: amid; N-terminális: DODASuc.

DODASuc-(β -Ala) $_3$ -HEG-(β -Ala) $_4$ -HEG-(β -Ala) $_3$ -HEG-(β -Ala) $_2$ -NH $_2$:

Ezután a benzil-glutamát-egységeket átalakítottuk hidroxietil-glutamin-egységekre (HEG) aminolízissel (etanol-aminnal) a reakciót DMF-ban kivitelezve.

A DMSO-ban felvett ^1H -NMR a benzilcsoportok hiányát/konverzióját bizonyította.

20. példa

PHEG-sztearil-amin-tartalmú liposzómák előállítása

33,8 mg tojás foszfatidil-kolint (EPC) (Lipoid Ludwigs-hafen), 9,67 mg koleszterolt (Sigma Aldrich) és 30,0 mg poli[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamin]-sztearil-amint (PHEG-sztearil-amin) (szintetizált) kimérünk és átvisszük egy 50 ml-es gömblombikba. 500 kBq tríciummal jelzett koleszteril-oleil-étert adunk hozzá lipid-markerként. A lipideket és a jelölő vegyületet kb. 10 ml etanolban feloldjuk. Ezután egy Rotavapor-ban 1 óra alatt, vákuumban, 40°C-on szárazra bepároljuk, ezt követően nitrogén-gázzal kiűzzük a levegőt egy órán keresztül.

PBS-t adunk a száraz lipid filmhez és egy órán keresztül rázatjuk üvegágy jelenlétében abból a célból, hogy teljessé tegyük a lipid film hidratációját.

A liposzómális szuszpenziót átvisszük egy extruderbe (Avestin, maximális térfogat 15 ml) és nyomás alatt extrudáljuk, nitrogént használva, 6-szor két polikarbon szűrőn keresztül, egyiket a másik tetejére helyezve, melyek pórusmérete 200 nm illetve 100 nm, és 18-szor olyan szűrőkön keresztül, melyek pórusmérete 100 nm és 50 nm. Ezt követően a liposzómális szuszpenziót dializáljuk egy dializáló készülékben (Slide-A-Lyzer, 10000 MWCO) 2-szer 24 órán keresztül 1 liter sterilizált PBS-sel szemben.

A liposzómák átlagos részecskeméretét fény szóródás segítségével határozzuk meg (Malvern Zeta-sizer), és azt $93,6 \pm 0,9$ nm-nek találtuk, a polidiszperzitási indexet pedig $0,099 \pm 0,02$ -nek. A lipid-veszteség a liposzómák elkészítése alatt 25%, ezt a ké-

szítmény végső radioaktivitásának az extrudálás előtti aktivitással való összehasonlításával határozzuk meg. A liposzóma-szuszpenziót nitrogén-atmoszférában 4°C-on tároljuk.

21. példa

További lipid-polimer-konjugátum-tartalmú liposzómák előállítása

Liposzómákat készítünk a film módszer alkalmazásával, amint a 23. példában leírtuk. Azonban tojás foszfatidil-kolin helyett dipalmitoil-foszfatidil-kolint használunk. 5 mM HEPES-puffert adunk a száraz lipid filmhez és 5 percig rázzuk üvegágy jelenlétében, hogy teljessé tegyük a lipid film hidratációját. A liposzómákat extrudálással méretezzük 12-szer 2 egymásra helyezett PC-membránokon keresztül, melyek pórusmérete 100 nm és 200 nm. A kapott liposzóma-diszperziót dializáljuk (MWCO 10000) és az átlagos részecske méretet dinamikus fény scattering technikával határozzuk meg. A liposzóma-készítmények tulajdonságait az 1. táblázatban mutatjuk be.

22. példa

A liposzómákba beépített ^3H -jelzett polimer-lipid-konjugátumok összehasonlító kinetikája egyetlen intravénás injekció után patkányokban

Hím patkányokat (Wistar, Cr1:(WI)BR (outbred, SPF-Quality) (Charles River, Sulzfeld, Németo.)) hagytuk szabadon hozzáférni a standard pelletizált laboratóriumi állat-eledelhez (Altromin, kód VRF 1, Lage, Németo.) és csapvízhez. A liposzómális készítményekből, melyek mindegyike 40-50 kBq radioaktivitású ^3H -jelzett



koleszteril-oleil-étert (Amersham) tartalmazott (a kompozíciókat per 50 μmol lipid az 1. táblázatban mutatjuk be) egyetlen-dózis intravénás injekcióban adjuk be a farokvénába. A beadott összes lipid 5 μmol , kivéve a jelzett esetekben.

Minden egyes patkány farokvénájából vérmintákat gyűjtünk a következő időpontokban: 5. percben és a 4., 24. és 48. órában. A gyűjtött minta mennyisége kb. 300 μl per mintánként.

A vérmintákat átviesszük heparinizált csövekbe és -20°C -on tároljuk.

Egyetlen 100 μl -es alikvótot szolubilizálunk az alábbi eljárással:

- 100 μl -t átviesszünk egy szcintillációs csőbe (20 ml).
- 100 μl Solvable-t adunk hozzá, majd legalább 1 órán keresztül inkubáljuk.
- 100 μl 1 mM EDTA-t és 200 μl 30%-os H_2O_2 -t adunk hozzá. Ezt a keveréket inkubáljuk 24 órán keresztül szobahőmérsékleten és ezután 50°C -on egy éjszakán át.
- Ultima Gold-ot (10 ml) adunk hozzá szcintillációs folyadéként.
- Mérjük a radioaktivitást LSC-vel.

Az összes radioaktív mérést Packard szcintillációs számlálóval (1900TR) mérjük. A számlálási idő statisztikai pontossága $\pm 0,2\%$ vagy maximum 5 perc, ahol ez először fordul elő. A Packard 1900TR-t úgy programozzuk, hogy automatikusan leszámítsa a háttért és átalakítsa a percenkénti beütések számát (CPM) percenkénti dezintegrációkká (DPM).

Az említett készítmények némelyikénél a patkányok máját és lépét eltávolítjuk 48 órával az injekció után és a liposzómák lokalizációját kiértékeljük az alábbi módszerrel:

A szerveket homogenizáljuk és a homogenizátumokat meghigítjuk 25 ml-re (máj) és 5 ml-re (lép). A homogenizátumok 1 ml-ét átviszszük szcintillációs csövekbe, amelyekhez a következőket adjuk:

- 200 ml Solvable (keverés és inkubálás 50°C-on éjszakán át)
- 200 ml 0,5 M EDTA-oldat
- 250 ml H₂O₂ (30%-os oldat) (inkubálás 50°C-on éjszakán át)
- 10 ml Ultima Gold szcintillációs folyadék (vortexelés és a minta inkubálása 24 órán át).

Ezután a mintákat egy béta-szcintillációs számlálóban 10 percig megszámláljuk. Az egyes liposzómákra kapott eredményeket a 6. ábrán mutatjuk be.

A 24. példa szerint előállított liposzómális készítmények kompozícióit és ennek a példának *in vivo* tesztjével kapott eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be. A vérben a keringési idő növekedését kiértékeljük, ahol:

- Jó azt jelenti, hogy hat a keringési időre a PEG-DSPE-tartalmú liposzómákkal összehasonlítva.
- Mérsékelt azt jelenti, hogy hat a keringési időre aközött, amit a PEG-DSPE-tartalmú liposzómák és a polimer bevonat nélküli csupasz liposzómák mutatnak.
- Csekély azt jelenti, hogy a keringési időre a szokásos körülmények között majdnem azonosan hat a csupasz liposzómák által mutatottal.

1. táblázat

50 μ mol lipidet tartalmazó liposzómák kompozíciói és tulajdonságaik

DPPC (mg)	Koleszterin (mg)	Lipid-polimer -konjugátum (mg)	Átlagos ré- szecskeméret (nm)	Polidisz- perzitási index	Keringési idő növe- kedése a vérben
23,1	6,4	Ex. 2:15	134 $\pm$ 0,5	0,100	csekély
23,1	6,4	Ex. 6:10	153 $\pm$ 0,5	0,056	jó
23,1	6,4	Ex. 5:30	143 $\pm$ 2	0,205	mérsékelt
23,1	6,4	Ex. 8,1:11,2	140,3 $\pm$ 2,2	0,090	jó
23,1	6,4	Ex. 8,2:13,8	153,0 $\pm$ 0,9	0,090	mérsékelt
23,1	6,4	Ex. 8,4:11,2	148,2 $\pm$ 1,7	0,071	csekély
23,1	6,4	Ex. 9:11,0	138,7 $\pm$ 1,8	0,116	csekély
23,1	6,4	Ex. 14:8,9	146,0 $\pm$ 2,1	0,092	jó
23,1	6,4	Ex. 14:13,8	147,0 $\pm$ 1,1	0,068	jó
23,1	6,4	Ex. 14:8,9	141,7 $\pm$ 2,3	0,044	jó
23,1	6,4	Ex. 8,2:11,2	163,9 $\pm$ 3,0	0,068	mérsékelt
23,1	6,4	Ex. 23:2,2	171,6 $\pm$ 2,5	0,167	csekély
23,1	6,4	Ex. 11:10,1	180,7 $\pm$ 6,1	0,113	csekély

DPPC (mg)	Kolesz- terin (mg)	Lipid-polimer -konjugátum (mg)	Átlagos ré- szecskeméret (nm)	Polidisz- perzitási index	Keringési idő növe- kedése a vérben
23,1	6,4	Ex. 8,2:11,2	159,0 $\pm$ 3,8	0,073	jó §
23,1	6,4	Ex. 14:8,9	152,9 $\pm$ 3,4	0,050	jó §

23,1	6,4	Ex. 12:11,2	170,3±2,5	0,039	mérsékelt
23,1	6,4	Ex. 12:2,24+ Ex. 8,1:8,96	166,0±0,9	0,056	mérsékelt
23,1	6,4	Ex. 11:10,1	167,7±0,6	0,170	csekély
23,1	6,4	Ex. 18:11,2	159,9±2,3	0,062	jó
23,1	6,4	Ex. 16:5,0	162,7±1,6	0,159	csekély
23,1	6,4	Ex. 19:8,8	156,3±3,2	0,059	mérsékelt
23,1	6,4	Ex. 20:8,8	164,7±4,0	0,116	mérsékelt
23,1	6,4	Ex. 10:8,8	159,0±3,8	0,073	csekély
23,1	6,4	Ex. 22:8,8	152,9±3,4	0,050	mérsékelt
23,1*	6,4*	Ex. 14:8,8*	167,7±0,6	0,170	jó
23,1**	6,4**	Ex. 14:8,8**	149,9±2,3	0,062	jó
23,1***	6,4***	Ex. 14:8,8***	162,7±0,024	0,159	csekély
23,1	6,4	PEG-DSPE: 6,9	156,3±3,2	0,059	jó
23,1*	6,4*	PEG-DSPE: 8,8*	170,3±2,5	0,039	jó
23,1**	6,4**	PEG-DSPE: 6,9**	166,0±0,9	0,056	jó
23,1***	6,4***	PEG-DSPE: 6,9***	170,5±0,3	0,110	<csekély

* : összes beadott lipid 0,5 μmol (lásd 1. és 2. ábra)

** : összes beadott lipid 0,05 μmol (lásd 1. és 2. ábra)

***: összes beadott lipid 0,005 μmol (lásd 1. és 2. ábra)

§: ha egy 2. injekciót (TL 1 μmol) adtunk 1 hét után, csökkenést figyeltünk meg a 5.1. példa szerinti lipid-polimer-konjugátumot tartalmazó liposzómák keringési idejében. Azok a liposzómák, melyek a 11. példa szerinti konjugátumot tartalmazták, szintén ilyen csökkenést mutattak, de 2 állatnál ez a hatás mérsékeltebb volt.

23. példa

Lipid-polimer-konjugátumot és prednisolon-foszfátot tartalmazó liposzómák előállítása

750 mg dipalmitoil-foszfátidil-kolint (DPPC) (Lipoid Ludwigshafen), 220,0 mg koleszterint (Sigma Aldrich) és 270,0 mg 11. példa szerinti lipid-polimer-konjugátumot, illetve 750 mg dipalmitoil-foszfátidil-kolint, 250,8 mg 1koleszterint és 267,6 mg PEG-disztearoil-foszfátidil-etanol-amint (PEG-DSPE) (Avanti Polar Lipids) bemérünk és összekeverünk 100 ml gömblombikban. A lipideket kb. 30 ml 1:1 arányú metanol-kloroform elegyben feloldjuk (a 11. példa szerinti lipid-polimer-konjugátum esetén) vagy etanolban (PEG-DSPE esetén). Ezután egy Rotavapor-ban szárazra pároljuk 1 óra alatt vákuumban, 40°C-on, majd ezután nitrogén gázzal légtelenítjük 1 órán keresztül.

1200 mg prednisolon-dinátrium-foszfátot (PLP) (OPG Nieuwegein) bemérünkés feloldunk 12 ml sterilizált PBS-ben. Az oldatot a száraz filmekhez adjuk és egy órán keresztül rázzuk üvegágy jelenlétében, hogy a lipid filmek hidratációját teljessé tegyük.

A liposzómális szuszpenziót átvisszük egy extruderbe (Avestin, maximális térfogat 15 ml) és nyomás alatt extrudáljuk, nitrogén gázt használva, 6-szor két polikarbon szűrőn keresztül, egyiket a másik tetejére helyezve, melyek pórusmérete 200 nm illetve 100 nm, illetve 100 nm és 50 nm, és amelyek mérete 50 nm illetve 50 nm. Ezt követően a liposzómális szuszpenziót dializáljuk egy dializáló készülékben (Slide-A-Lyzer, 10000 MWCO) 2-szer 24 órán keresztül 1 liter sterilizált PBS-sel szemben.

A liposzómák átlagos részecskeméretét fény szóródás segítségével határozzuk meg (Malvern Zeta-sizer), és azt kb. 85 illetve 90 nm-nek találtuk, a polidiszperzitási indexet pedig 0,1-nél kisebbnek. A prednisolon-foszfát enkapszulázási hatékonyságát HPLC-módszer segítségével határozzuk meg és 2,6%-nak találtuk. A liposzóma-szuszpenziót nitrogén-atmoszférában 4°C-on tároljuk és azt találtuk, hogy legalább 5 hétig stabilak, ahol a liposzómális készítmények a 14. példa szerinti lipid-polimer-konjugátumot tartalmazzák kissé még stabilabbak, mint azok a készítmények, amelyek a PEG-DSPE lipid-polimer-konjugátumot tartalmazzák (lásd 3. ábra).

24. példa

A prednisolon-foszfát-tartalmú liposzómális készítmények kerin- gési idejének és terápiás hatékonyságának értékelése patkány adjuváns arthritis modellben

Lewis patkányokat szubkután immunizálunk a farok tövéénél hő-
vel inaktivált *Mycobacterium tuberculosis*-sal inkomplett Freund-
adjuvánsban. A talp-gyulladás a 9. és 12. nap között kezdődik az
immunizálás után, és a maximális súlyosságot megközelítőleg a
20. nap után éri el, és ezután fokozatosan lepad.

A betegség kiértékelését vizuálisan a talp-gyulladás súlyos-
ságát az immunizálás után a 10. naptól a 35. napig tartóan pon-
tozva (score) végezzük. Amikor a talp-gyulladás pontok eléri a
maximális pontok körülbelül fél értékeit (14-15. nap), az összes
patkányt 5 csoportba osztjuk az azonos átlagos pontok szerint és

egyetlen intravénás injekcióval kezeljük az alábbi összetételekben:

1. 10 mg/kg PLP PHEA-DODASuc liposzómákban, a 23. példa szerint előállított vagy
2. 10 mg/kg PLP PEG-DSPE liposzómákban, a 23. példa szerint előállított (referencia) vagy
3. PBS (kontroll).

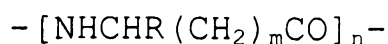
A 0., 24. és 48. órában vérmintákat veszünk és kiértékeljük a liposzómális PLP plazma-koncentrációját.

Mind a PHEA- mind a PEG-liposzómák keringési viselkedése a vérben megmutatkozik a PLP plazma-koncentráció profilok által, amelyeket a 4. ábrán mutatunk be. Mindkét liposzóma típus egyformán jól megfelelő keringési fél-életidőt eredményez.

Az 5. ábra a terápiás hatékonyságokat mutatja be patkány adjuváns arthritis-ben 10 mg/kg PLP-PHEA-liposzómákkal és 10 mg/kg PLP-PEG-liposzómákkal kezelt patkányokban a sóoldattal, mint kontrollal kezelt patkányokkal szemben.

Szabadalmi igénypontok

1. Lipid-polimer-konjugátum, amely legalább egy hidrofób apoláris egységből és egy hidrofil fejcsoporthoz álló amfifil lipidből és egy N- és egy C-terminális végcsoporthoz hordozó polimerből vagy ennek prekursorából nyerhető, azzal jellemezve, hogy a polimer egy poli(aminosav), poli(aminosav-származék) vagy egy poli(aminosav-analóg) és a lipid a polimer N- vagy C-terminális végcsoporthoz kapcsolódik, ahol a polimer az alábbi képlettel rendelkezik:



mely képletben

-R jelentése -H, -CH₃, -CHCH₃OR₁, -(CH₂)_xOR₁, -(CH₂)_x-CO-NHR₁,
-(CH₂)_x-NH-CO-R₁, -(CH₂)_x-SO_yCH₃, -OR-(CH₂)_xCOOH;

-R₁ jelentése -H vagy egy vagy több hidroxicsoporthoz szubsztituált (C₁-C₄)alkil-csoport vagy di(C₁-C₄)alkil-aminocsoport;

x jelentése 0-4;

m jelentése 1 vagy 0 és

y jelentése 1 vagy 2.

2. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy az amfifil lipidet a foszfolipidek, glikolipidek, ceramidok, koleszterin és származékai, telített vagy telítetlen, elágazó vagy egyenes szénláncú C₈-C₁₀₀ mono- vagy di(alkil-aminok), aril-alkil-aminok, cikloalkil-alkil-aminok, alkanolok, aldehidek, karbohalidok vagy alkánsavak és ezek anhidridjei közül választjuk ki és az össz C-atom szám 25 vagy ennél több.

3. A 2. igénypont szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy az amfifil lipid legalább két hidrofób apoláris egységet tartalmaz.

4. A 3. igénypont szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy az amfifil lipid 1-heptadecil-oktadecil-amin, N-szukcinil-di(oktadecil-amin) vagy disztearil-foszfatidil-etanol-amin.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer χ -paramétere $\leq 0,65$, előnyösen $\leq 0,5$ vízben.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer α -aminosavakból és ezek származékai-ból vagy analógjaiból épül fel.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer nem tartalmaz lényeges mennyiségben elektromos töltésű csoportokat a fiziológiás 4-8-as pH-n belül.

8. A 7. igénypont szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer aminosav monomerekből, aminosav-analóg monomerekből vagy aminosav-származék monomerekből áll, amelyek semlegesek vagy semlegesítődnek a fiziológiás 4-8-as pH-n.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer molekulatömege 500 és 75000 közötti, előnyösen 2000 és 15000 közötti.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer biodegradálható.

11. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer poli[N-(2-hidroxi-etil)]-L-glutamin.

12. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer poli(2-hidroxi-etil)-L-aszparagin.

13. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, azzal jellemezve, hogy a polimer poli(D,L-metionin-szulfoxid).

x 6 br m

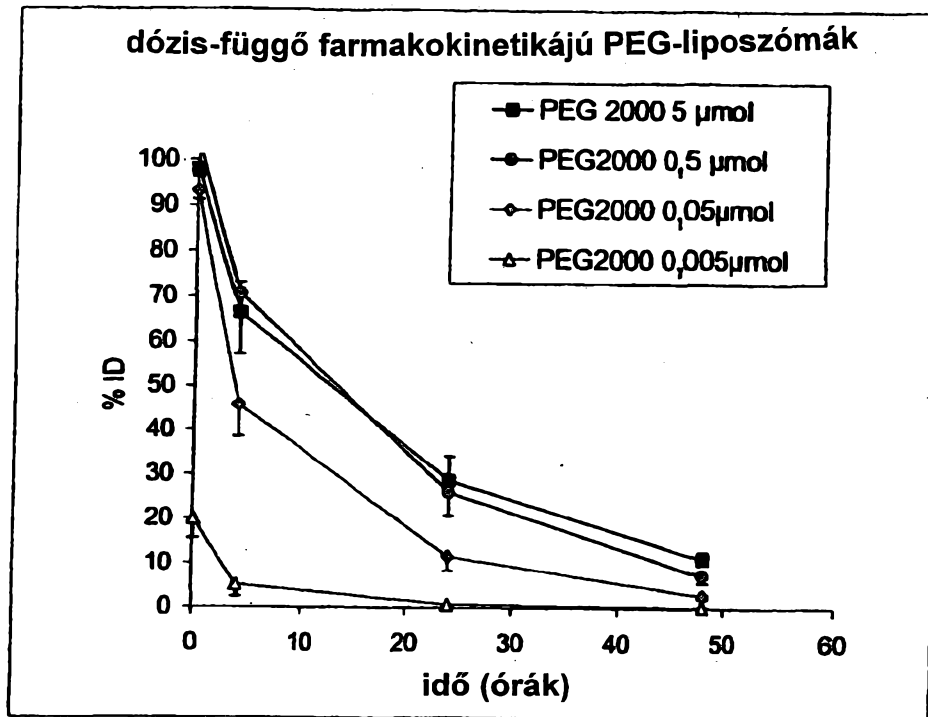
2005 DEC 18.

A meghatalmazott:

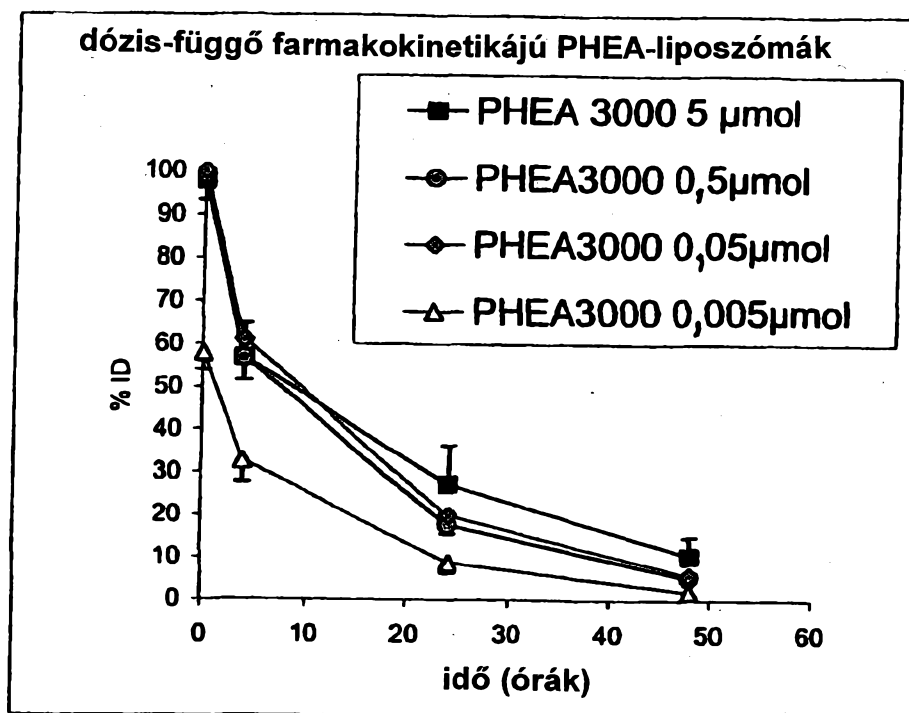
Dr. Láng Tivadarné

Dr. Láng Tivadarné

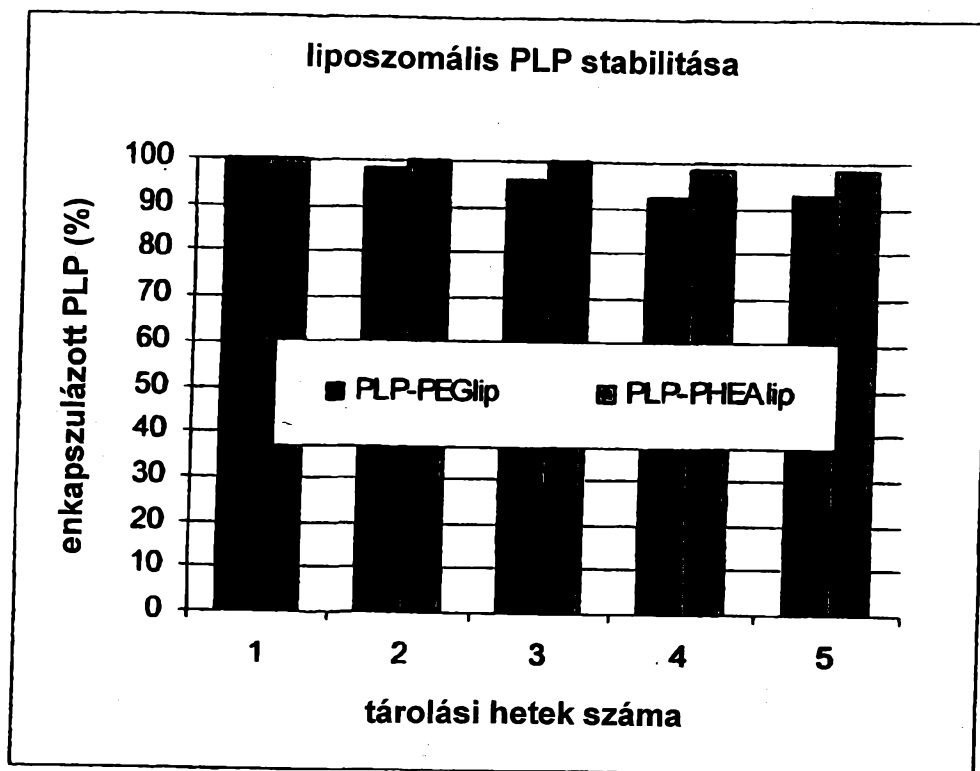
szabadalmi ügyvivő
S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099



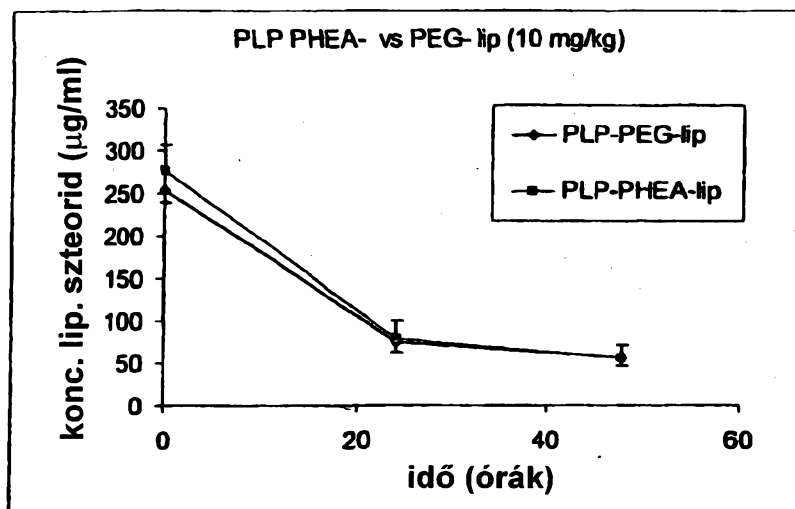
1. ábra



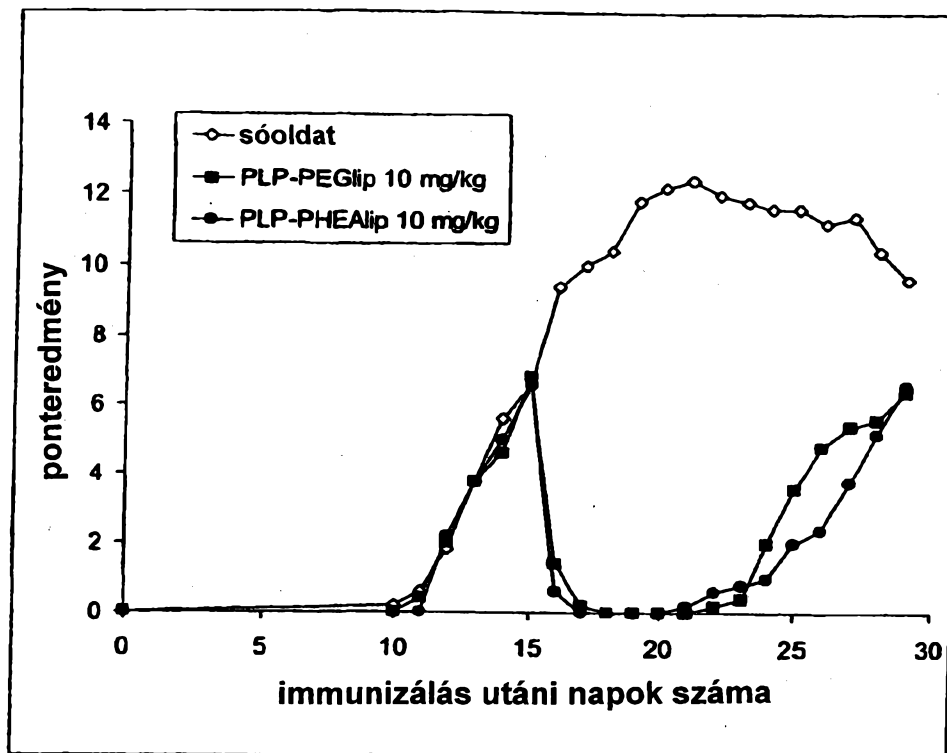
2. ábra



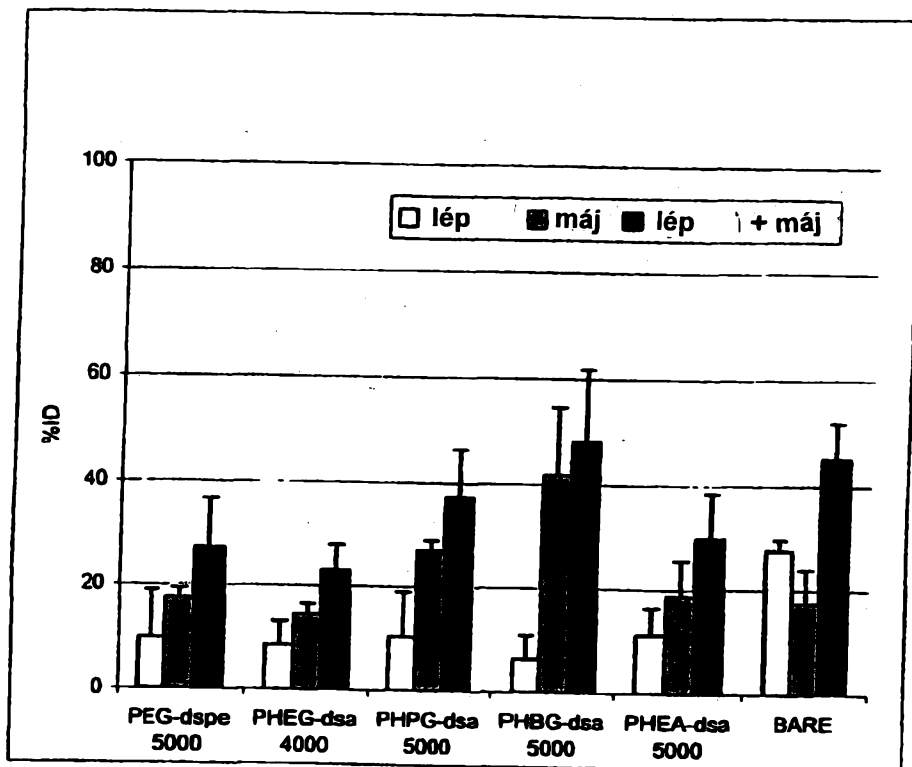
3. ábra



4. ábra



5. ábra



6. ábra