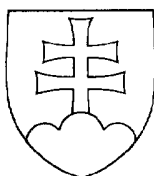


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **782-90**
 (22) Dátum podania: **19.02.90**
 (31) Číslo prioritnej prihlášky:
 (32) Dátum priority:
 (33) Krajina priority:
 (40) Dátum zverejnenia: **15.09.91**
 (45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **06.08.99**
 (86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

280 090(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. 6:

C 08G 69/08
C 07D 413/06

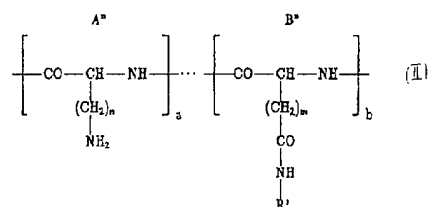
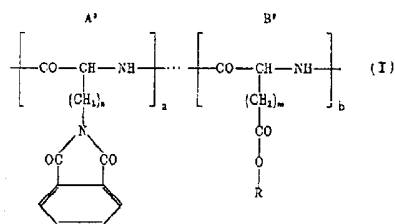
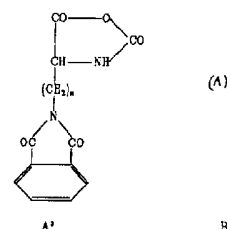
(73) Majiteľ patentu: Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha, CZ;

(72) Pôvodca vynálezu: Rypáček František, RNDr., CSc., Praha, CZ;
 Kotva Rudolf, RNDr., CSc., Praha, CZ;
 Metalová Marie, Ing., Praha, CZ;

(54) Názov vynálezu: **Monoméry a neutrálne, hydrofilné kopolyméry na báze α, ω -diaminokyselín**

(57) Anotácia:

Monoméry na báze α, ω -diaminokyselín so všeobecným vzorcom (A), kde $n = 2 - 4$, ďalej polyméry na báze α, ω -diaminokyselín, ktorých štruktúra sa skladá zo štruktúrnych jednotiek A' a B' so všeobecným vzorcom (I), kde a a b sú molárne zlomky štruktúrnych jednotiek A' a B', pričom a je väčšie ako 0 a menšie ako 1, výhodne v rozmedzí 0 až 0,8, pričom $a + b = 1$, n je v rozmedzí 2 až 4, m je 1 alebo 2 a R je alkyl vybraný zo skupiny zahŕňajúcej lineárne, vetvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atómami uhlíka, benzyl a 2,2,2-trichloroetyl, výhodne potom benzyl, pričom stredný polymerizačný stupeň je v rozmedzí 5 až 2000 monomérnych jednotiek, výhodne v rozmedzí 30 až 1200 monomérnych jednotiek, a lineárne, hydrofilné a biodegradabilné polyméry na báze α, ω -diaminokyselín so všeobecným vzorcom (II), kde a a b sú molárne zlomky štruktúrnych jednotiek A'' a B'', pričom a je väčšie ako 0 a menšie ako 1, spravidla je z intervalu 0 - 0,8, pričom $a + b = 1$, n je v rozmedzí 2 až 4, m je 1 alebo 2, R' je hydroxyalkyl s 2 až 5 atómami uhlíka obsahujúci jednu alebo aj viac hydroxylových skupín. Spôsob prípravy polymérov so všeobecným vzorcom (I) a (II) spočíva v príprave látky A, kopolymerizácii látky A s komonomermi B za vzniku kopolyméru so všeobecným vzorcom (I), ktorý reaguje s aminoalkoholom na kopolymér so všeobecným vzorcom (II).



Oblasť techniky

Vynález sa týka monomérov a neutrálnych, hydrofilných kopolymérov na báze α , ω -diaminokyselín a spôsobu ich prípravy. Týka sa teda syntetických, hydrofilných polyaminokyselín obsahujúcich popri bočných reťazcoch tvorených neutrálnymi hydroxyalkylovými skupinami aj bočné reťazce s primárnymi alifatickými aminoskupinami, hlavne kopolymérov N^5 -hydroxyalkylglutamínov a N^4 -hydroxyalkylasparagínov s α , ω -diaminokyselinami.

Doterajší stav techniky

Väzba biologicky aktívnych látok na vodou rozpustné syntetické polyméry bola už mnohokrát študovaná, napríklad ako vhodný spôsob prípravy makromolekulárnych liečiv. Také formy liečiv umožňujú predĺžený účinok liečiv v organizme, umožňujú ovplyvnenie jeho biodistribúcie, zníženie toxických účinkov a pod. Polyméry vhodné na tieto účely by mali byť netoxické a fyziologicky inertné, čo znamená, že ich vlastné interakcie so zložkami biologického prostredia sú minimálne. Ďalej je taktiež veľmi dôležité, aby tieto polyméry boli v organizme rozložiteľné na netoxické nízkomolekulárne produkty, t. j. aby boli biodegradabilné. Podmienka nízkej toxicity a fyziologickej inertnosti je spravidla dostatočne splnená v prípade hydrofilných neutrálnych polymérov tvoriacich vo vodných roztokoch konformáciu náhodného kĺbka. Vhodnými hydrofilnými skupinami v polyméri, ktoré nie sú vo fyziologickom prostredí nabité a pritom sú dostatočne hydrofilné, sú napríklad skupiny amidové a hydroxylové.

Biodegradovateľnosť je veľmi dôležitá pri polyméroch určených na parenterálne použitie, v prípade ktorých je nutné zaručiť, že polymér bude z organizmu vylúčený alebo bude metabolizovaný po splnení svojej funkcie.

Syntetické polyaminokyseliny, hlavne však polyméry odvodené od trifunkčných aminokyselín, ako je kyselina glutámová, asparagová a lyzín, sú perspektívnymi polymermi na tieto účely. Zatiaľčo dve funkčné skupiny týchto aminokyselín, t. j. α -aminoskupina a α -karboxyl, tvoria hlavný polypeptidický reťazec, tretia funkčná skupina týchto aminokyselín môže slúžiť na vytvorenie rôznych chemických modifikácií a na väzbu biologicky účinných látok. Polypeptidická štruktúra ich hlavného reťazca umožňuje ich degradáciu v organizme pôsobením enzýmov proteínáz a peptidáz. Tak napríklad na báze kyseliny glutámovej je možné pripraviť lineárne hydrofilné polyméry obsahujúce hydroxyalkylové bočné reťazce, napr. poly(N^5 -hydroxyetyl)glutamín (PHEG), ktoré vyhovujú požiadavkám jednak svojou biodegradovateľnosťou, ako aj fyziologickou inertnosťou. Svedčia o tom mnohé práce zaoberajúce sa týmito polymermi ako materiálmi na lekárske a farmaceutické účely. PHEG sa skúmal ako náhrada krvnej plazmy (A.Gerola, G.Antoni, F.Benvenuti, F.Cocola and P.Neri, in: „Shock: Biochemical, Pharmacological and Clinical aspects“, Plenum Press, New York, N.Y., 1970, p. 329), ako nosič cytostatických (J.Drobník, D.Nosková, F.Rypáček, M.Metalová and V.Saudek, Makromolekulární protirakovinné léčivo obsahující platinu a způsob jeho výroby, čs. AO 253069) a iných fyziologicky účinných látok, napr. catecholaminov (Goodman, M. et al., Water-soluble, physiologically active, synthetic polypeptides, U.S.Pat. 4116949). Ich biodegradabilita bola taktiež skúmaná a je

dobre známa (H.R.Dickinson, A.Hiltner, D.F.Gibbons and J.M.Anderson, Biodegradation of a poly (α -aminoacid)-hydrogel. *Lin vivo*, J.Biomed.mater.res., 15: 577-589, 1981; J.Pytela, V.Saudek, J.Drobník and F.Rypáček, Poly(N^5 -hydroxyalkylglutamines). IV Enzymatic degradation of N^5 -(2-hydroxyetyl)-L-glutamine homopolymers and copolymers, J.Controlled Release, 10: 17-25, 1989).

Popri inertnosti a biodegradovateľnosti ďalšou požiadavkou na polyméry využiteľné na väzbu fyziologicky účinných látok je prítomnosť vhodných reaktívnych skupín, ktoré umožňujú väzbu týchto látok za výhodných podmienok. Takéto skupiny je možné v prípade polyaminokyselín v zásade pripraviť buď modifikáciou bočných reťazcov, napr. v prípade poly(N-alkylglutamínov), modifikáciou γ -karboxylu jednotiek kyseliny glutámovej alebo kopolymerezáciou s inými derivátmi aminokyselín. Modifikáciou boli pripravené poly(N-hydroxyalkylglutamíny) obsahujúce v časti bočných reťazcov hydrazidové skupiny (V.Saudek, F.Rypáček and J.Drobník, Rozpustné a biodegradovateľné kopolyméry pre väzbu biologicky aktívnych látok, čs. AO 254355), skupiny 4-hydroxyfenetylové alebo aromatické amíny (J.Pytela, F.Rypáček, M.Metalová and J.Drobník, Synthesis of poly(N^5 -(2-hydroxyetyl)-L-glutamines] with modified side chains, Collect. Czech. Chem. commun., 54: 1640-1647, 1989). Kopolymerezáciou s derivátmi fenylalanínu boli pripravené kopolyméry N-hydroxyalkylglutamínu s p-amino-fenylalanínom a aromatické aminoskupiny boli využité na väzbu fyziologicky účinných látok vo forme azo-derivátov (U.S.Pat. 4116949). Azo-väzba, rovnako ako iné väzby, ktoré nie sú bežné v prirodzených látkach v organizme sa vyskytujúci, je nevýhodná, pretože neumožňuje odštiepenie fyziologicky účinnej látky v organizme.

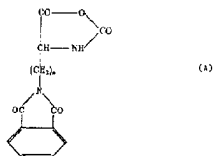
Mimoriadne výhodnou reaktívnou skupinou v polyméri by preto bola primárna alifatická aminoskupina. Na zavedenie tejto skupiny do bočných reťazcov polyaminokyselín sa ponúka kopolymerezácia s prirodzenými diaminokyselinami, napríklad lyzínom a ornitínom. Známe spôsoby prípravy polymérov obsahujúcich lyzín alebo ornitín spravidla využívajú chránenie α -aminoskupiny týchto diaminokyselín benzoyloxykarbonylovou skupinou a polymerizáciu N-karboxy-anhydridov (NCA) takto chránených aminokyselín. Pri príprave homopolymérov, napríklad polylyzínu alebo kopolymérov s niektorými inými aminokyselinami, je po polymerizácii chrániaca skupina odstránená, najčastejšie reakciou s brómovodíkom (HBr). Takto napríklad je možné pripraviť kopolyméry lyzínu s kyselinou glutámovou kopolymerezáciou N^5 -karbobenzoyl-lyzín-NCA s γ -benzyl-glutamát-NCA a následujúcim odstránením chrániacich skupín. Tento postup by bolo možné použiť aj na prípravu kopolymérov lyzínu (alebo ornitínu) s N^5 -hydroxyalkyl-glutamínom za predpokladu, že pri reakcii s HBr by zostali chrániace benzylesterové skupiny jednotiek kyseliny glutámovej zachované a tieto by mohli byť v nasledujúcej reakcii s aminoalkoholom premenené na hydroxyalkyl-glutamíny. Reakciou s HBr však dochádza aj k štiepeniu benzylesterov kyseliny glutámovej a v dôsledku toho je ťažké, ak nie nemožné, pripraviť týmto spôsobom hydrofilné kopolyméry neobsahujúce karboxylové skupiny. Použitie alkylesterov kyseliny glutámovej, ktoré viac odolávajú reakcii s HBr, napríklad použitie γ -metylglutamátu, γ -etylglutamátu síce túto nevýhodu čiastočne odstraňuje, ale polyméry týchto alkylglutamátov sú veľmi zle rozpustné. Napríklad poly(γ -metylglutamát) a kopolyméry

s prevahou γ -metyl-glutamátu sú po vysušení do pevného stavu prakticky nerozpustné v bežných rozpúšťadlách, ako sú napríklad dimetylformamid, dimetylacetamid, benzén, chloroform a pod. Táto skutočnosť je veľmi nevýhodná, pretože sťažuje ďalšie spracovanie polyméru, hlavne neumožňuje zvoliť vhodné reakčné prostredie na nasledujúce chemické modifikácie polyméru, napr. aminolýzu alkylglutamátu na hydroxyalkylglutamín.

Podstata vynálezu

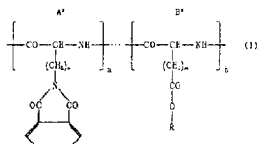
Tento vynález vznikol z dôvodu potreby pripraviť neutrálne, hydrofilné a biodegradovateľné polyméry obsahujúce v bočných reťazcoch voľne alifatické aminoskupiny vhodné na väzbu modifikujúcich látok, napr. látok fyziologicky aktívnych. Autori zistili, že polyméry s požadovanými vlastnosťami je možné pripraviť s použitím derivátov α,ω -diaminokyselín, uvedených v tomto vynáleze, ich kopolymerizáciou so známymi N-karboxyanhydridmi ω -alkylesterov kyseliny L-glutámovej alebo L-asparágovej, prípadne s N-karboxyanhydridmi iných L-aminokyselín uplatnením opísaných postupov.

Podstatou vynálezu sú monoméry na báze α,ω -aminokyselín so všeobecným vzorcom (A):



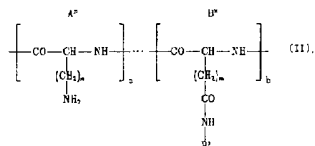
kde $n = 2 - 4$.

Podstatou vynálezu sú ďalej polyméry na báze α,ω -diaminokyselín, ktorých štruktúra sa skladá zo štruktúrnych jednotiek A' a B' so všeobecným vzorcom (I):



kde a a b sú molárne zlomky štruktúrnych jednotiek A' a B', pričom a je väčšie ako 0 a menšie ako 1, výhodne v rozmedzí 0 až 0,8, pričom $a + b = 1$, n je v rozmedzí 2 až 4, m je 1 alebo 2 a R je alkyl vybraný zo skupiny zahŕňajúcej lineárne, vetvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atómami uhlíka, benzyl a 2,2,2-trichlóroetyl, výhodne potom benzyl, pričom stredný polymerizačný stupeň je v rozmedzí 5 až 2000 monomérnych jednotiek, výhodne v rozmedzí 30 až 1200 monomérnych jednotiek.

Predmetom vynálezu sú ďalej lineárne, hydrofilné a biodegradabilné polyméry na báze α,ω -aminokyselín, ktorých podstata spočíva v tom, že sa skladajú zo štruktúrnych jednotiek A'' a B'' a obsahujú najmenej dva typy bočných reťazcov, pričom jeden typ bočných reťazcov nesie priamu alifatickú aminoskupinu a druhý typ je tvorený reťazcom hydroxyalkylovým podľa všeobecného vzorca (II):



kde a a b sú molárne zlomky štruktúrnych jednotiek A'' a B'', pričom a je väčšie ako 0 a menšie ako 1, spravidla je z intervalu 0-0,8, pričom $a + b = 1$, n je v rozmedzí 2 až 4, m je 1 alebo 2, R' je hydroxyalkyl s 2 až 5 atómami uhlíka obsahujúci jednu alebo aj viacej hydroxylových skupín a je zo skupiny zahŕňajúcej 2-hydroxyetyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, výhodne hydroxyalkyly a dihydroxyalkyly s 2 až 3 atómami uhlíka, a pričom stredný polymerizačný stupeň je v rozmedzí 5 až 2000 monomérnych jednotiek, spravidla v rozmedzí 10 až 1000 monomérnych jednotiek.

Predmetom vynálezu je ďalej postup prípravy polymérov so všeobecným vzorcom (I) a (II), ktorý spočíva v príprave látky A, kopolymerizácii látky A s vhodnými komonomermi za vzniku kopolymeru so všeobecným vzorcom (I), ktorý je potom reakciou s príslušným aminoalkoholom premenený na kopolymér so všeobecným vzorcom (II).

Monoméry na báze α,ω -diaminokyselín so všeobecným vzorcom A, ktoré sú schopné kopolymerizácie s N α -karboxyanhydridmi ω -alkylesterov dikarboxylových aminokyselín, je možné podľa vynálezu pripraviť ftaloyláciou ω -aminoskupiny známych α,ω -diaminokyselín a premenou získanej N ω -ftaloyl-aminokyseliny na príslušný N ω -ftaloyl-N α -karboxyanhydrid. Príkladom vhodných α,ω -diaminokyselín sú hlavne L-lyzín a L-ornitín, resp. ich D enantioméry. Postupom podľa vynálezu je možné N ω -ftaloyl-lyzín výhodne pripraviť reakciou N-etoxykarbonyl-ftalimidu s roztokom med'natého komplexu lyzinu, rozložením med'natého komplexu N ω -ftaloyl-lyzinu pôsobením kyseliny chlór vodíkovej a kryštalizáciou vo forme vnútornej soli z roztoku kyslého uhlíkatu sodného a vodného etanolu. N α -karboxyanhydrid, t. j. látka so všeobecným vzorcom (A), sa z N ω -ftaloyl-lyzinu pripraví pomocou niektorej zo známych metód prípravy N α -karboxyanhydridov, napríklad reakciou s fosgénom v prostredí dioxanu.

Podstata spôsobu prípravy polymérov so všeobecným vzorcom (I) podľa vynálezu spočíva v tom, že sa zlúčenina so všeobecným vzorcom (A) kopolymerizuje s látkou B vybranou zo skupiny látok zahŕňajúcich N α -karboxyanhydridy ω -alkylesterov dikarboxylových aminokyselín. Výhodne je možné použiť N α -karboxyanhydrid odvodený od β -alkylesterov kyseliny asparágovej alebo γ -alkylesteru kyseliny glutámovej, pričom spomínaný alkyl je vybraný zo skupiny zahŕňajúcej lineárne, vetvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atómami uhlíka, 2,2,2-trichlóretyl, 2,2,2-trifluóretyl a benzyl.

Látka B na prípravu polyméru so všeobecným vzorcom (I) je vybraná zo skupiny zahŕňajúcej hlavne ω -alkylestery dikarboxylových aminokyselín. Vhodnými aminokyselinami v zmysle vynálezu sú predovšetkým kyseliny L-glutámová a L-asparágová. Vhodnými ω -alkylestermi týchto aminokyselín sú také, kde alkyl je zvolený zo skupiny zahŕňajúcej lineárne, vetvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atómami uhlíka, 2,2,2-trichlóretyl, 2,2,2-trifluóretyl a benzyl, pričom obzvlášť vhodným je benzyl. Príprava týchto esterov je všeobecne známa. Taktiež na prípravu príslušných N α -karboxyanhydridov z týchto esterov je možné použiť postupy známe z literatúry. Príkladom typického postupu je reakcia s fosgénom rovnako, ako je uvedené pri príprave látky so vzorcom (A).

Kopolymerizácia látok A a B môže byť vykonaná v fúbovom aprotickom rozpúšťadle, v ktorom A aj B sú

rozpustné. Príklady vhodných rozpúšťadiel zahŕňajú metylénchlorid, dichlórétán, dioxán, benzén, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, dimetylsulfoxid a iné. Na iniciáciu polymerizácie je možné použiť látky bežne používané na tieto účely. Príkladom vhodných látok sú primárne, sekundárne a terciárne alkylamidy, napr. hexylamín, diaminohexán, trietylamin, alebo bázy, napr. metanolát sodný, organokovové zlúčeniny, napr. trietylaluminium a pod. Tieto postupy polymerizácie N-karboxyanhydridov sú všeobecne známe a nie je nutné ich podrobne opisovať.

Výhodnou vlastnosťou polymérov so všeobecným vzorcom (I), predovšetkým keď R je benzyl, je ich dobrá rozpustnosť v rade rozpúšťadiel vhodných na nasledujúce modifikačné reakcie, napr. na aminolýzu aminoalkoholom. Vhodnými rozpúšťadlami sú N, N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, dimetylsulfoxid, benzén, dioxán, chloroform, dichlórétán a ich zmesi.

Ďalšou výhodnou vlastnosťou polyméru so všeobecným vzorcom (I) je skutočnosť, že postupom podľa vynálezu je možné v jednom reakčnom kroku aminolyzovať alkylestery jednotiek B' aj ftalimidové skupiny jednotiek A' a získať tak kopolymér obsahujúci voľné aminoskupiny, ako je znázornené vo vzorci jednotiek A'' kopolyméru so všeobecným vzorcom (II).

Podstata spôsobu prípravy kopolyméru so všeobecným vzorcom (II) podľa vynálezu spočíva v tom, že sa kopolymér so všeobecným vzorcom (I) podrobí reakcii s vhodným aminoalkoholom typu R'-NH₂, kde R' je vybraný zo skupiny zahŕňajúcej hydroxyalkyl s jednou alebo viacerými hydroxylovými skupinami, 2-hydroxyetyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, a takto získaný produkt sa izoluje bežnými metódami. Voľbou alkylamínu R'-NH₂ pri aminolytickej reakcii je možné pripraviť kopolyméry rôznych vlastností.

Aminolýzu kopolyméru so všeobecným vzorcom (I) je možné postupom podľa vynálezu uskutočniť tak, že k rozkladu polyméru so všeobecným vzorcom (I) vo vhodnom rozpúšťadle vybranom zo skupiny zahŕňajúcej metylénchlorid, dichlórétán, dioxán, benzén, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, dimetylsulfoxid a iné, sa pridá nadbytok príslušného alkylamínu a zmes reaguje počas nevyhnutného času na úplnú aminolýzu všetkých alkylesterových a ftalimidových skupín. Vhodný pomer alkylamínu k polyméru je v rozmedzí 1 až 200 mólov (najlepšie v rozmedzí 10 až 100 mólov) alkylamínu na mól monomérnych jednotiek polyméru. Vhodný čas reakcie s alkylamínom závisí od teploty, pri ktorej sa reakcia uskutočňuje a od pomeru reaktantov. Napríklad pri teplote 25 °C a pri pomere alkylamínu k monomérnym jednotkám polyméru 50 : 1 je vhodný čas 16 dní, pri teplote 37 °C 10 dní a pri teplote 60 °C je vhodný reakčný čas 3 dni. Reakčná zmes sa potom zneutralizuje a polymér so všeobecným vzorcom (II) sa oddelí od reakčných zložiek obvyklými spôsobmi, napríklad precipitáciou, dialýzou, ultrafiltráciou, chromatograficky a pod., a izoluje sa z roztoku napríklad zrážaním, sušením vo vákuu, lyofilizáciou a pod. Zloženie kopolyméru sa overí obvyklými metódami. Vhodnými metódami sú analýza aminokyselín, stanovenie aminoskupín reakciou s trinitrobenzénsulfónovou kyselinou, titrácia, elementárna analýza a pod.

Výhodou postupu podľa vynálezu je možnosť voľiť množstvo jednotiek obsahujúcich aminoskupiny vo vý-

slednom polyméri so všeobecným vzorcom (II) pomocou vhodného pomeru látok A a B v kopolymerizačnej zmesi.

Postup podľa vynálezu taktiež zachováva pôvodnú konfiguráciu na asymetrickom uhlíku východiskových aminokyselín a preto, v prípade, že sa vyjde pri príprave z L-aminokyselín, získa sa polymér obsahujúci v hlavnom reťazci α,L-peptidické väzby, ktoré sú principiálne štiepiateľné enzýmy prítomné v organizme. Ak je napríklad polymérom so všeobecným vzorcom (II) kopolymér hydroxyalkyl-L-glutamínu s L-lyzínom, potom tento polymér je degradovateľný proteínázami cicavčích organizmov, hlavne enzýmami katepsínom, trypsínom, kallikreínom, plazmínom a ďalšími. Štiepenie polyméru endopeptidázovým mechanizmom, t. j. proteínázami, vedie k rýchlemu poklesu molekulovej hmotnosti polyméru. Štiepenie exopeptidázami, napr. leucinaminopeptidázou alebo inými aminopeptidázami, vedie k produkcii nízkomolekulárnych fragmentov s veľkosťou jednej monomérnej jednotky. Konečnými produktmi degradácie polymérov so všeobecným vzorcom (II) sú preto monomérne deriváty použitých aminokyselín, ktoré sú netoxické a ľahko sa z organizmu vylúčia.

Je v súlade s princípom predmetného vynálezu, ak s cieľom ovplyvnenia vlastností polyméru so všeobecným vzorcom (II), hlavne jeho biodegradovateľnosti, budú do polymérneho reťazca zavedené aj ďalšie aminokyseliny okrem tých, ktoré boli uvedené. Napríklad v tom zmysle, že v rámci zložky B' v kopolyméri so všeobecným vzorcom (I) je možné namiesto časti alkylesteru dikarboxylových aminokyselín použiť ešte ďalšie aminokyseliny, napríklad zo skupiny zahŕňajúcej L-alanín, L-valín, L-leucín, L-fenylalanín, pričom prevládajúcou súčasťou zložky B v kopolyméri so všeobecným vzorcom (I) budú alkylestery dikarboxylových aminokyselín umožňujúce prevedenie na hydroxyalkyl-deriváty aminolýzou.

Primárne alifatické aminoskupiny kopolyméru so všeobecným vzorcom (I) sú vhodnými nukleofilmi na chemické modifikácie, napríklad na väzbu fyziologicky aktívnych látok. Príkladom takých reakcií môžu byť reakcie s elektrofilnými skupinami, akými sú aktivované estery a chloridy karboxylových kyselín, izokyanáty, izotiokyanáty, azidy, aldehydy, epoxidy a pod. Reakcie primárnych aminoskupín na hydrofilných polyméroch sú široko preštudované a môžu byť aplikované na polyméry podľa vynálezu primerane ich vlastnostiam a požiadavkám na výsledný produkt. Je možné preto odvodiť, že ak bude elektrofilná skupina prítomná na fyziologicky aktívnej látke či na vhodnej spojke, potom reakcia s aminoskupinou polyméru podľa tohto vynálezu bude viesť k vzniku polymérneho produktu s naviazanou predmetnou fyziologicky aktívnou látkou. Je cieľom tohto vynálezu poskytnúť vhodný polymér na tento účel.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález je ďalej doložený príkladmi, ktoré majú slúžiť na jeho lepšiu zrozumiteľnosť a nie sú mienené tak, aby vynález alebo niektorý jeho znak boli nimi limitované, ak to nie je priamo špecifikované.

Príklad 1

Roztok 7,30 g L-lyzínu monohydrochloridu a 3,20 g hydroxidu sodného v 70 ml vody sa zmieša s roztokom 5 g síranu meďnatého v 70 ml vody. K výslednému tmavomodrému roztoku sa pridá 4 g kyslého uhličitánu sodného

a 10 g N-etoxykarbonylftalimidu a reakčná zmes sa mieša 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Modrý komplex sa odsaje, premyje vodou, etanolom, chloroformom a éterom a vysuší sa. Takto sa získa 9,21 g med'natého komplexu N^ε-ftaloyl-L-lyzínu, ktorý sa ďalej mieša so 45 ml 6N kyseliny chlorovodíkovej 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Produkt sa odfiltruje a premyje 6N HCl. Vysuší sa a kryštalizuje z vodného etanolu. Získaný hydrochlorid N^ε-ftaloyl-L-lyzínu (6,79 g) v 130 ml vody sa preleje pri miešaní 58,4 ml 0,5 N roztoku kyslého uhličitanu sodného. Zmes sa mieša 30 minút a pH sa upraví na 7,00 kyselinou octovú. Produkt sa odfiltruje, premyje vodou a vysuší vo vákuu nad P₂O₅. Po kryštalizácii z vodného etanolu sa získa 3,10 g N^ε-ftaloyl-L-lyzínu. Teplota topenia: 223-224 °C. Pre C₁₄H₁₀N₂O₄ vypočítané: 60,86 % C, 5,84 % H, 10,14 % N, nájdené 60,09 % C, 5,52 % H, 10,16 % N.

Príklad 2

20,0 g N^ε-ftaloyl-L-lyzínu pripraveného podľa príkladu 1 sa suspenduje v 300 ml dioxánu a za miešania sa pri teplote 55 °C zavádza plynň fosgén počas 2 hodín. Prebytok fosgénu sa odstráni plynňm dusíkom, roztok sa sfiltruje a filtrár sa odparí dosucha. Odparenina sa kryštalizuje zo zmesi chloroform-hexán a octan etylantý-hexán. Získa sa 13,8 g N^α-karboxyanhydridu N^ε-ftaloyl-L-lyzínu (látka A). Teplota topenia: 175-179 °C. Pre C₁₅H₁₄N₂O₅ vypočítané: 59,60 % C, 4,67 % H a 9,27 % N, nájdené 59,44 % C, 4,80 % H a 9,09 % N.

Príklad 3

0,97 g N^α-karboxyanhydridu N^ε-ftaloyl-L-lyzínu pripraveného podľa príkladu 2 (látka A) a 7,55 g N^α-karboxyanhydridu N^α-benzylglutamátu (B) sa rozpustilo v 300 ml bezvodého dioxánu a k roztoku sa pridalo 0,075 g (0,104 ml) trietylaminu. Reakčná nádoba bola uzatvorená chlór-kalciovým uzáverom a polymerizácia prebiehala pri laboratórnej teplote počas 6 dní. Polymér bol vyzrážaný do etanolu, premytý etanolom a vysušený. Získalo sa 5,34 g kopolyméru I. Analýzou aminokyselín vo vzorke polyméru hydrolyzovanom 6N HCl sa zistil molárny zlomok štruktúrnej jednotky A': a = 0,10 a molárny zlomok štruktúrnej jednotky B': b = 0,90.

Tabuľka 1. Obsah látky A v polymerizačnej násade v % a molárny zlomok a štruktúrnej jednotky A' vo výsledných kopolyméroch.

Polymerizačná násada % A	Kopolymér a
10,0	0,071
21,1	0,132
30,0	0,188
42,1	0,293
52,6	0,376
61,9	0,459
71,4	0,592
80,0	0,683
90,0	0,827

Príklad 4

2,76 g (0,01 mólov) N^α-karboxyanhydridu N^ε-ftaloyl-L-lyzínu pripraveného podľa príkladu 2 (látka A) a 22,41 g (0,09 mólov) N^α-karboxyanhydridu N^β-benzylaspartátu (B) sa rozpustilo v 500 ml bezvodého dioxánu a k roztoku

sa pridalo 0,255 g (2,5 mmólov) trietylaminu. Ďalší postup bol zhodný s postupom v príklade 3. Získalo sa 18,5 g polymérneho produktu so všeobecným vzorcom zodpovedajúcim kopolyméru I, kde a = 0,09, b = 0,91, n = 4 a m = 1.

Príklad 5

N^α-karboxyanhydrid N^ε-ftaloyl-L-lyzínu pripravený postupom podľa príkladu 2 (látka A) a N^α-karboxyanhydrid N^γ-benzylglutamátu (B) sa rozpustili v bezvodom dioxane na koncentráciu 0,1 mólov/l a ich roztoky sa zmiešali v pomeroch oboch zložiek tak, ako je uvedené v tabuľke 1. Polymerizácia bola iniciovaná metanolátom sodným. Reakcia prebiehala pri teplote 25 °C v priebehu 30 až 60 minút do dosiahnutia konverzie monomérov v rozmedzí 6 - 9 %. Výsledné kopolyméry so všeobecnou štruktúrou danou vzorcom (I) sa vyzrážali do etanolu, vysušili sa a ich zloženie sa stanovilo pomocou aminokyselinovej analýzy. Hodnoty molárneho zlomku a štruktúrnej jednotky A' v kopolyméroch sú uvedené v tabuľke 1.

Príklad 6

2,23 g kopolyméru I pripraveného postupom podľa príkladu 3 sa rozpustí v 22 ml N,N-dimetylacetamidu, k roztoku sa pridá 30 ml 2-aminoetanolu a reakčná zmes sa mieša pri teplote 60 °C počas 72 hodín. Reakčná zmes sa zriedi 30 ml 2N HCl a neutralizuje koncentrovanú HCl. Po dialýze proti vode sa polymér izoluje lyofilizáciou z vodného roztoku. Výsledný produkt je kopolymérom L-lyzínu a N⁵(2-hydroxyetyl)-L-glutamínu so zodpovedajúcou všeobecnou štruktúrou polyméru II, kde n = 4, m = 2, a = 0,10 a b = 0,9 (podľa analýzy aminokyselín). Stanovenie molárneho zlomku voľných aminoskupín pomocou reakcie s 2,4,6-trinitrobenzénsulfónovou kyselinou zodpovedá molárnemu zlomku lyzínových zvyškov v kopolyméri.

Príklad 7

1,55 g polyméru II pripraveného postupom podľa príkladu 6 sa rozpustí v 60 ml bezvodého N,N-dimetylacetamidu a pridá sa 0,12 ml trietylaminu. Roztok sa vychladí v ľadovom kúpeli a pridá sa 0,314 g (1,0 mmólov) 3-maleinimidobenzoyl-N-oxysuccinimidu. Reakčná zmes sa mieša pri teplote 0-4 °C počas 4 hodín. N,N-dimetylacetamid sa oddialyzuje a polymér sa ďalej zbaví nízkomolekulárnych reakčných zložiek ultrafiltráciou. Lyofilizáciou z vodného roztoku sa získa 1,2 g modifikovaného polyméru II, v ktorom 88 % pôvodne prítomných aminoskupín lyzínových zvyškov je modifikovaných naviazanými 3-maleinimido-benzoylovými skupinami.

Príklad 8

K roztoku 0,31 g polyméru II pripraveného postupom podľa príkladu 6 v 6 ml 0,1 M uhličitanového pufru pH 8,8 sa pridá 40 mg fluoresceínizotiokyanátu (FITO) a reakčná zmes sa mieša pri teplote 4 °C počas 16 hodín. Po dialýze a chromatografii na kolóne plnenej Sepadexom G-25 (Sepadex - obchodná značka fy Pharmacia, Uppsala) sa polymér lyofilizuje. Získa sa 0,25 g modifikovaného polyméru II obsahujúceho fluoresceín viazaný na 18 % pôvodne prítomných lyzínových zvyškov.

Príklad 9

50,1 mg (0,13 mmólov) succinyl-L-fenylalanyl-p-nitroanilidu (SPNA) sa rozpustí v 0,6 ml N,N-dimetylformamide a roztok sa vychladí na 0 °C. K roztoku sa pridá

30,2 mg (0,156 mmólov) N-etyl-N'-(dimethylaminopropyl)-karbodiimidu hydrochloridu (Pluka, AG). Reakčná zmes sa mieša v ľadovom kúpeli počas 40 minút, a potom sa pridá roztok obsahujúci 400 mg polyméru II pripraveného postupom podľa príkladu 6 a 20 µl trietylaminu v 2 ml N,N-dimetylformamidu. Reakcia pokračuje za miešania v chlade počas 4 hodín. Polymér sa izoluje analogicky ako v príklade 8. Získa sa 350 mg modifikovaného polyméru II obsahujúceho na 45 % pôvodne prítomných lyzínových zvyškov viazaný sukcinyl-L-fenylalanyl-p-nitroanilid, (SPNA). Takto pripravený polymér je možné použiť ako vodou rozpustný, makromolekulárny substrát na serínové proteínázy, napr. chymotrypsín, pôsobením ktorých sa z bočných reťazcov polyméru uvoľňuje p-nitroanilín.

Príklad 10

Analogicky k postupu uvedenému v príklade 3 sa pripraví kopolymér, ktorého štruktúra sa od štruktúry kopolyméru I líši tým, že popri jednotkách B' obsahuje tiež iné aminokyseliny, ak sa v polymerizačnej násade zodpovedajúca časť monoméru B, t. j. N α -karboxyanhydridu N γ -benzylglutamátu, podľa príkladu 3, nahradí N α -karboxyanhydridom príslušnej α -aminokyseliny. Takto sa pripravil kopolymér Ia obsahujúci okrem štruktúrnych jednotiek uvedených vo vzorci polyméru I aj 5,2 mólových % zvyškov L-alanínu, kopolymér Ib obsahujúci analogicky 8,4 mólových % zvyškov L-fenylalanínu, kopolymér Ic obsahujúci analogicky 3,8 mólových % zvyškov O-acetyl-L-tyrozínu.

Príklad 11

Analogicky k postupu uvedenému v príklade 6 sa pripraví hydrofilné, vodou rozpustné kopolyméry IIa, IIb a IIc vždy reakciou zodpovedajúceho z kopolymérov Ia, Ib a Ic, pripravených postupom podľa príkladu 10, s 2-amino-etanolom v prostredí N,N-dimetylacetamidu. Získané kopolyméry obsahujúce okrem štruktúrnych jednotiek uvedených vo všeobecnom vzorci kopolyméru II aj zvyšky ďalšej aminokyseliny, t. j. L-alanínu (IIa), L-fenylalanínu (IIb) alebo O-acetyl-L-tyrozínu (IIc) v množstve zodpovedajúcom obsahu týchto zvyškov v kopolyméroch Ia, Ib a Ic.

Príklad 12

Enzymatická degradácia kopolymérov II, IIa a IIb bola testovaná s použitím enzýmov papaínu, katepsínu B, trypsinu, chymotrypsínu, elastázy, pepsínu a pronázy E. Z jednotlivých kopolymérov sa pripravili roztoky v 0,05 M fosfátovom pufrí pH 7,8 s koncentráciou 2 mg/ml. K roztokom sa pridali prípadné ďalšie aktívatory, napr. EDTA, di-tiotreitol, chlorid vápenatý, podľa požiadaviek na optimálne podmienky na aktivitu jednotlivých enzýmov. Roztoky sa vytemperovali na teplotu 37 °C a jednotlivé enzýmy sa do reakčnej zmesi pridávali na výslednú koncentráciu 0,02 mg/ml. Pomocou gélovej permeačnej chromatografie (GPC) sa zmerali číselné priemery molekulových hmotností jednotlivých polymérov pred pridaním enzýmu (M_0) a po 16 hodinách inkubácie s enzýmom pri 37 °C (M_n). Z poklesu hodnôt číselných priemerov molekulovej hmotnosti je možné hodnotiť účinnosť jednotlivých enzýmov pri degradácii testovaných kopolymérov. Hodnoty priemerov molekulových hmotností pred inkubáciou a po nej s enzýmom sú uvedené v tabuľke 2.

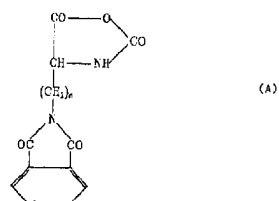
Tabuľka 2.

Degradácia kopolymérov II, IIa a IIb jednotlivými proteínázami. M_0 , východiskový priemer mólovej hmotnosti pred pôsobením enzýmu; M_n , číselný priemer mólových hmotností po 16 hodinách inkubácie s enzýmom.

Enzým	Molekulová hmotnosť M_n		
	II $M_0 = 72\ 000$	IIa $M_0 = 59\ 000$	IIb $M_0 = 64\ 500$
chymotrypsín	72 000	52 000	7 200
elastáza	72 000	9 200	24 000
pepsín	48 000	32 000	43 500
trypsin	8 200	17 000	12 800
katepsín B	16 200	12 000	18 600
papaín	8 400	4 600	6 800
pronáza E	3 200	4 800	4 800

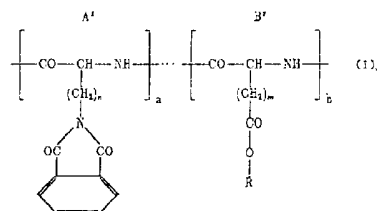
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Monoméry na báze α,ω -diaminokyselín so všeobecným vzorcom (A)



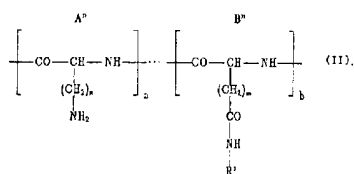
kde $n = 2 - 4$

2. Polyméry na báze α,ω -diaminokyselín, vyznačujúce sa tým, že ich štruktúra pozostáva zo štruktúrnych jednotiek A a B podľa všeobecného vzorca (I):



kde a a b sú molárne zlomky štruktúrnych jednotiek A' a B', pričom a je väčšie ako 0 a menšie ako 1, výhodne z intervalu 0-0,8, pričom $a + b = 1$, n je z intervalu 2 až 4, m je 1 alebo 2 a R je alkyl zo skupiny zahŕňajúcej lineárne, vetvené a cyklické alkyly s 1-18 atómami uhlíka, benzyl a 2,2,2-trichlóretyl, výhodne potom benzyl, pričom stredný polymerizačný stupeň kopolyméru I je v rozmedzí 5 až 2000 monomérnych jednotiek, výhodne v rozmedzí 30 až 1200 monomérnych jednotiek.

3. Lineárne, hydrofilné a biodegradabilné polyméry na báze α,ω -diaminokyselín, vyznačujúce sa tým, že pozostávajú zo štruktúrnych jednotiek A a B a obsahujú najmenej dva typy bočných reťazcov, pričom jeden typ bočných reťazcov nesie primárnu alifatickú aminoskupinu a druhý typ je tvorený reťazcom hydroxyalkylom so všeobecným vzorcom (II):



kde a a b sú molárne zlomky štruktúrnych jednotiek A'' a B'' , pričom a je väčšie ako 0 a menšie ako 1, výhodne je z intervalu 0-0,8, pričom $a + b = 1$, n je v rozmedzí 2 až 4, m je 1 alebo 2, R' je hydroxyalkyl s 2 až 5 atómami uhlíka obsahujúci jednu alebo aj viac hydroxylových skupín, vybraný zo skupiny zahŕňajúcej 2-hydroxyetyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-hydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, výhodne hydroxyalkyly a dihydroxyalkyly s 2 až 3 atómami uhlíka, a pričom stredný polymerizačný stupeň je v rozmedzí 5 až 2000 monomérnych jednotiek, výhodne v rozmedzí 10 až 1000 monomérnych jednotiek.

4. Spôsob prípravy polyméru so všeobecným vzorcom (I), **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že látka so všeobecným vzorcom (A) kopolymerizuje s látkou B, vybranou zo skupiny látok zahŕňajúcich N^α -karboxyanhydridy ω -alkylesterov dikarboxylových aminokyselín.

5. Spôsob prípravy polyméru so všeobecným vzorcom (I) podľa nároku 4, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že látkou B je N^α -karboxyanhydrid odvodený od β -alkylesteru kyseliny asparágovej alebo γ -alkylesteru kyseliny glutámovej, pričom spomínaný alkyl je vybraný zo skupiny zahŕňajúcej lineárne, vetvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atómami uhlíka, 2,2,2-trichlóroetyl, 2,2,2-trifluóretyl a benzyl.

6. Spôsob prípravy kopolyméru so všeobecným vzorcom (II), **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa kopolymér so všeobecným vzorcom (I) podrobí reakcii s vhodným aminoalkoholom typu $R'-NH_2$, kde R' je hydroxyalkyl s jednou alebo viacerými hydroxylovými skupinami, vybraný zo skupiny zahŕňajúcej 2-hydroxyetyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl a takto získaný produkt sa izoluje bežnými metódami.

7. Spôsob prípravy kopolyméru so všeobecným vzorcom (I) podľa nároku 4, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že látkou B je N^α -karboxyanhydrid γ -benzyl-L-glutamátu.

8. Spôsob prípravy polyméru so všeobecným vzorcom (I) podľa nároku 4, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že látkou so všeobecným vzorcom A je N^α -karboxyanhydrid N^ϵ -ftaloyl-lyzínu.

9. Polymér so všeobecným vzorcom (II) podľa nároku 3, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že štruktúrna jednotka A'' je tvorená zvyškom L-lyzínu a štruktúrna jednotka B'' je tvorená zvyškom N^5 -(2-hydroxyetyl)-L-glutamínu.

10. Polymér so všeobecným vzorcom (II) podľa nároku 3, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že 0 - 50 % štruktúrnych jednotiek B'' je nahradených zvyškami aminokyselín, vybraných zo skupiny zahŕňajúcej L-alanín, L-fenylalanín, L-leucín, L-valín a L-tyrozín.