

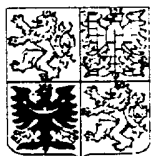
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 848

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **782-90**

(22) Přihlášeno: **19. 02. 90**

(40) Zveřejněno: **15. 09. 91**
(Věstník č. 9/91)

(47) Uděleno: **04. 09. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **12. 11. 97**
(Věstník č. 11/97)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 08 G 69/08

C 07 D 413/06

(73) Majitel patentu:

Ústav makromolekulární chemie AVČR,
Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Rypáček František RNDr. CSc., Praha, CZ;
Kotva Rudolf RNDr. CSc., Praha, CZ;
Metalová Marie ing., Praha, CZ;

(74) Zástupce:

Ústav makromolekulární chemie AVČR,
Heyrovského nám. 2. Praha 6, 16206;

(54) Název vynálezu:

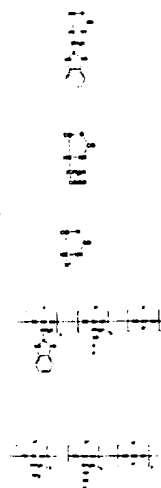
**Monomery a neutrální kopolymery na
bázi alfa, omega-diaminokyselin a způsob
jejich přípravy**

(57) Anotace:

Monomery na bázi α , ω -diaminokyselin obecného vzorce A, kde $n = 2 - 4$. Polymery na bázi α , ω -diaminokyselin, jejichž struktura sestává ze strukturních jednotek A', B' a C' podle obecného vzorce I, kde a, b a c jsou molární zlomky strukturních jednotek A', B' a C', přičemž a je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,8, b je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,9 a c je 0 nebo v rozmezí 0 až 0,45, přičemž $a + b + c = 1$, n je v rozmezí 2 až 4, m je 1 nebo 2 a R je alkyl ze skupiny, zahrnující lineární, větvené a cyklické alkyl s 1 - 18 atomy uhlíku, benzyl a 2,2,2-trichloroethyl, s výhodou pak benzyl, R'' je methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl nebo 2-methylpropyl, přičemž střední polymerizační stupeň polymeru I je v rozmezí 5 až 2000 monomerních jednotek, s výhodou v rozmezí 30 až 1200 monomerních jednotek, a lineární, hydrofilní a biodegradabilní polymery na bázi α , ω -diaminokyselin, obsahující nejméně dva typy bočních řetězců, přičemž jeden typ bočních řetězců nese primární alifatickou aminoskupinu a další typ je tvořen řetězcem hydroxyalkylovým podle obecného vzorce II, kde

a, b a c jsou molární zlomky strukturních jednotek A', B' a C', přičemž a je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v intervalu 0,01 - 0,8, b je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,9 a c je 0 nebo v rozmezí 0 až 0,45, přičemž $a + b + c = 1$, n je v rozmezí 2 až 4, m je 1 nebo 2 a R' je hydroxyalkyl s 2 až 5 atomy uhlíku, obsahující jednu nebo i více hydroxylových skupin, vybraný ze skupiny, zahrnující 2-hydroxyethyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, s výhodou hydroxyalkylu a dihydroxyalkylu s 2 až 3 atomy uhlíku, R'' je methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl nebo 2-methylpropyl, přičemž střední polymerizační stupeň polymeru je v rozmezí 5 až 2000 monomerních jednotek, s výhodou 10 až 1000 monomerních jednotek. Způsob přípravy polymerů obecného vzorce I a II, který spočívá v přípravě látky A a kopolymerizaci látky A s vhodnými komonomery B případně i C za vzniku polymeru obecného vzorce I, který je pak reakcí s příslušným aminoalkoholem vzorce R'-NH₂ přeměněn na polymer obecného vzorce II.

CZ 282 848 B6



Monomery a neutrální hydrofilní kopolymery na bázi α,ω -diaminokyselin a způsob jejich přípravy

5 Oblast techniky

Vynález se týká monomerů a neutrálních hydrofilních kopolymerů na bázi α,ω -diaminokyselin a způsobu jejich přípravy. Týká se tedy syntetických hydrofilních polyaminokyselin, obsahujících vedle bočních řetězců, tvořených neutrálními hydroxyalkylovými skupinami, i boční řetězce s primárními alifatickými aminoskupinami, zejména kopolymerů N^5 -hydroxyalkylglutaminů a N^4 -hydroxyalkylasparaginů s α,ω -diaminokyselinami.

15 Dosavadní stav techniky

Vazba biologicky aktivních látek na vodorozpustné syntetické polymery byla již mnohokrát studována, například jako vhodný způsob přípravy makromolekulárních léčiv. Takové formy léčiv umožňují prodloužený účinek léčiv v organismu, ovlivnění jeho biodistribuce, snížení jeho toxických účinků a pod. Polymery, vhodné pro tyto účely, by měly být netoxické a fyziologicky inertní, což znamená, že jejich vlastní interakce se složkami biologického prostředí jsou minimální. Dále je rovněž velmi důležité, aby tyto polymery byly v organismu rozložitelné na netoxické nízkomolekulární produkty, tj. aby byly biodegradabilní. Podmínka nízké toxicity a fyziologické inertnosti je zpravidla dostatečně splněna u hydrofilních neutrálních polymerů, tvořících ve vodných roztocích konformaci náhodného klubka. Vhodnými hydrofilními skupinami na polymeru, které nejsou ve fyziologickém prostředí nabitě a přitom jsou dostatečně hydrofilní, jsou například skupiny amidické a hydroxylové.

Biodegradovatelnost je velmi důležitá u polymerů, uvažovaných pro parenterální použití, u kterých je nutné zaručit, že polymer bude z organismu vyloučen či bude metabolizován po splnění své funkce. Syntetické polyaminokyseliny, zejména pak polymery, odvozené od trifunkčních aminokyselin, jako je kyselina glutamová, asparagová a lysin, jsou perspektivními polymery pro tyto účely. Zatímco dvě funkční skupiny těchto aminokyselin, tj. α -aminoskupina a α -karboxyl, tvoří hlavní polypeptidický řetězec, třetí funkční skupina těchto aminokyselin může sloužit k vytvoření různých chemických modifikací a vazbě biologicky účinných látek. Polypeptidická struktura jejich hlavního řetězce umožňuje jejich degradaci v organismu působením enzymů proteináz a peptidáz. Tak například na bázi kyseliny glutamové lze připravit lineární hydrofilní polymery, obsahující hydroxyalkylové boční řetězce, např. poly(N^5 -hydroxyethyl)glutamin (PHEG), které vyhovují požadavkům jak svou biodegradovatelností, tak i fyziologickou inertností. Svědčí o tom četné práce, zabývající se těmito polymery jako materiály pro lékařské a farmaceutické účely. PHEG byl studován jako náhražka krevní 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), jako 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 jiných fyziologicky účinných látek, např. katecholaminů (Goodman, M. et al., Water-soluble, physiologically active, synthetic polypeptides, U. S. Pat. 4116949). Jejich biodegradabilita byla rovněž studována a je dobře známa (H. R. Dickinson, A. Hiltner, D. F. Gibbons, and J. M. Anderson, Biodegradation of a poly(α -amino acid) hydrogel. I. in 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-hydroxyethyl)-L-glutamine homopolymers and copolymers, J. Controlled Release, 10: 17-25, 1989).

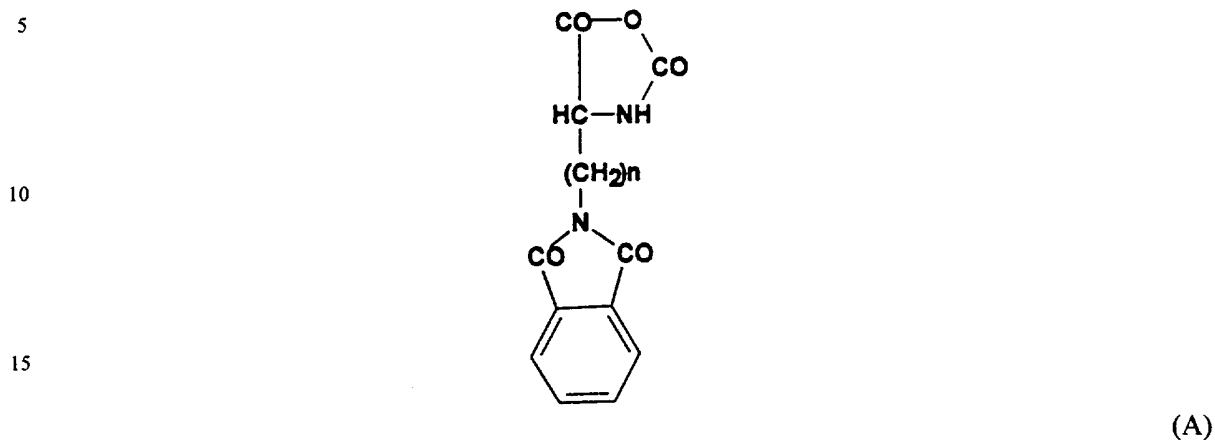
Vedle inertnosti a biodegradovatelnosti dalším požadavkem na polymery, využitelné pro vazbu fyziologicky účinných látek, je přítomnost vhodných reaktivních skupin, které umožňují vazbu těchto látek za výhodných podmínek. Takové skupiny lze u polyaminokyselin v zásadě připravit buďto modifikací bočních řetězců, např. u poly(N-alkylglutaminů) modifikací γ -karboxylu jednotek kyseliny glutamové, nebo kopolymerizací s jinými deriváty aminokyselin. Modifikací 5 byly připraveny poly(N-hydroxyalkylglutaminy), obsahující v části bočních řetězců hydrazidové skupiny (V. Saudek, F. Rypáček, and J. Drobník, Rozpustné a biodegradovatelné kopolymery pro vazbu biologicky aktivních látek, čs. AO 254355), skupiny 4-hydroxyfenethylové nebo aromatické aminy (J. Pytela, F. Rypáček, M. Metalová, and J. Drobník, Synthesis of poly[N⁵-(2-hydroxyethyl)-L-glutamines] with modified side chains, Collect. Czech. Chem. Commun., 54: 10 1640-1647, 1989). Kopolymerizací s deriváty fenylalaninu byly připraveny kopolymery N-hydroxyalkyl-glutaminu s p-amino-fenylalaninem a aromatické aminoskupiny byly využity pro vazbu fyziologicky účinných látek ve formě azo-derivátů (U. S. Pat. 4116949). Azo-vazba, stejně tak jako jiné vazby, které nejsou běžné v přirozených látkách v organismu se vyskytujících, je 15 nevýhodná, protože neumožňuje odštěpení fyziologicky účinné látky v organismu.

Mimořádně výhodnou reaktivní skupinou na polymeru by proto byla primární alifatická aminoskupina. Pro zavedení této skupiny do bočních řetězců polyaminokyselin se nabízí kopolymerace s přirozenými diaminokyselinami, například lysinem a ornithinem. Známé 20 způsoby přípravy polymerů, obsahujících lysin nebo ornithin, zpravidla využívají chránění ω -aminoskupiny těchto diaminokyselin benzoyloxykarbonylovou skupinou a polymerace N^α-karboxyanhydridů (NCA) takto chráněných aminokyselin. Při přípravě homopolymerů, například polylysinu, nebo kopolymerů s některými jinými aminokyselinami, je po polymeraci chránicí skupina odstraněna, nejčastěji reakcí s bromovodíkem (HBr). Takto například lze připravit 25 kopolymery lysinu s kyselinou glutamovou kopolymerizací NCA N⁵-karbobenzoxylýsinu s NCA γ -benzylglutamátu a následným odstraněním chránicích skupin. Tento postup by bylo možné použít i pro přípravu kopolymerů lysinu (či ornithinu) s N⁵-hydroxyalkyl-glutaminy za předpokladu, že při reakci s HBr by zůstaly chránicí benzylesterové skupiny jednotek kyseliny glutamové zachovány a tyto mohly být v následné reakci s aminoalkoholem přeměněny na 30 hydroxyalkyl-glutaminy. Reakcí s HBr však dochází i ke štěpení benzyl esterů kyseliny glutamové a v důsledku toho je obtížné, ne-li nemožné, připravit tímto způsobem hydrofilní kopolymery, neobsahující karboxylové skupiny. Použití alkylesterů kyseliny glutamové, které více odolávají reakci s HBr, například γ -methylglutamátu, γ -ethylglutamátu, sice tuto nevýhodu částečně odstraňuje, ale polymery těchto alkylglutamátů jsou velmi špatně rozpustné. Například 35 poly(γ -methylglutamát) a kopolymery s převahou γ -methylglutamátu jsou po vysušení do pevného stavu prakticky nerozpustné v běžných rozpouštědlech, jakými jsou například dimethylformamid, dimethylacetamid, benzen, chloroform a pod. Tato skutečnost je velice nevýhodná, protože ztěžuje další zpracování polymeru, zejména neumožňuje zvolit vhodné reakční prostředí pro následné chemické modifikace polymeru, např. aminolýsu alkylglutamátu 40 na hydroxyalkylglutamin.

Tento vynález vznikl z potřeby připravit neutrální hydrofilní a biodegradovatelné polymery, obsahující v bočních řetězcích volné alifatické aminoskupiny, vhodné pro vazbu modifikujících 45 látek, např. látek fyziologicky aktivních. Autoři nyní zjistili, že polymery požadovaných vlastností lze připravit s použitím derivátů α,ω -diaminokyselin, uvedených v tomto vynálezu, jejich kopolymerizací se známými N-karboxyanhydridy ω -alkylesterů kyseliny L-glutamové nebo L-asparagové, případně N-karboxyanhydridy jiných L-aminokyselin, uplatněním postupů dále popsaných.

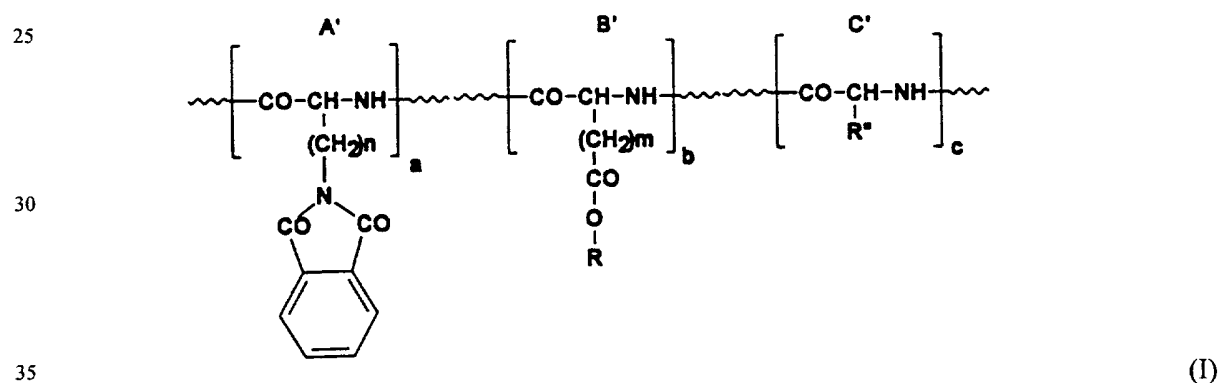
Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou monomery na bázi α,ω -diaminokyselin obecného vzorce A:



kde $n = 2 - 4$.

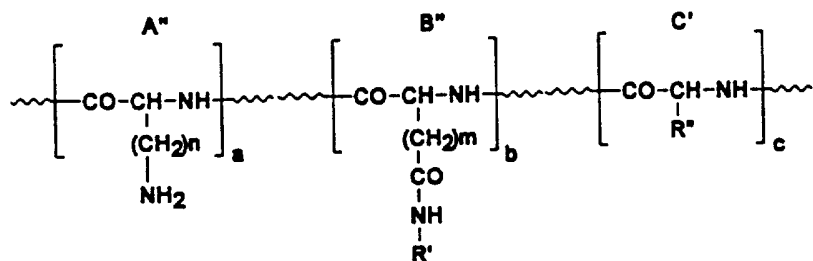
20 Podstatou vynálezu jsou dále polymery na bázi α,ω -diaminokyselin, jejichž struktura sestává ze strukturních jednotek A', B' a C' podle obecného vzorce I:



40 kde a, b a c jsou molární zlomky strukturních jednotek A', B' a C', přičemž a je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,8, b je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,9 a c je 0 nebo v rozmezí 0 až 0,45, přičemž $a + b + c = 1$, n je v rozmezí 2 až 4, m je 1 nebo 2 a R je alkyl ze skupiny, zahrnující lineární, větvené a cyklické alkyly s 1-18 atomy uhlíku, benzyl a 2,2,2-trichloroethyl, s výhodou pak benzyl, R'' je methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl nebo 2-methylpropyl, přičemž střední polymerizační stupeň polymeru I je v rozmezí 5 až 2000 monomerních jednotek, s výhodou v rozmezí 30 až 1200 monomerních jednotek.

45 Dále jsou předmětem vynálezu lineární, hydrofilní a biodegradabilní polymery na bázi α,ω -aminokyselin, jejichž podstata spočívá v tom, že sestávají ze strukturních jednotek A'', B'' a C'', a obsahují dva typy bočních řetězců, přičemž jeden typ bočních řetězců nese primární alifatickou aminoskupinu a další typ je tvořen řetězcem hydroxyalkylovým ve shodě s obecným vzorcem II:

50



(II)

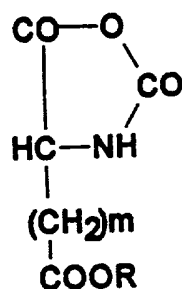
kde a, b a c jsou molární zlomky strukturních jednotek A'', B'' a C'', přičemž a je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v intervalu 0,01 - 0,8, b je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,9 a c je 0 nebo v rozmezí 0 až 0,45, přičemž a + b + c = 1, n je v rozmezí 2 až 4, m je 1 nebo 2 a R' je hydroxyalkyl s 2 až 5 atomy uhlíku, obsahující jednu nebo i více hydroxylových skupin, vybraný ze skupiny, zahrnující 2-hydroxyethyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, s výhodou hydroxyalkyly a dihydroxyalkyly s 2 až 3 atomy uhlíku, R'' je methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl nebo 2-methylpropyl, přičemž střední polymerizační stupeň polymeru je v rozmezí 5 až 2000 monomerních jednotek, s výhodou 10 až 1000 monomerních jednotek.

Předmětem vynálezu je dále postup přípravy polymerů obecného vzorce I a II, který spočívá v přípravě látky A, kopolymerizaci látky A s vhodnými komonomery B případně i C za vzniku polymeru obecného vzorce I, který je pak reakcí s příslušným aminoalkoholem vzorce R'-NH₂ přeměněn na kopolymer obecného vzorce II.

Monomery na bázi α,ω-diaminokyselin obecného vzorce A, které jsou schopné kopolymerizace s N^α-karboxyanhydridy ω-alkylesterů dikarboxylových aminokyselin, lze podle vynálezu připravit ftaloylací ω-aminoskupiny známých α,ω-diaminokyselin a přeměnou získané N^α-ftaloyl-aminokyseliny na příslušný N^α-ftaloyl-N^α-karboxyanhydrid. Příkladem vhodných α,ω-diaminokyselin jsou zejména L-lysin a L-ornithin, resp. jejich D enantiomery. Postupem podle vynálezu lze N^α-ftaloyl-lysin výhodně připravit reakcí N-ethoxykarbonylftalimidu s roztokem měďnatého komplexu lysinu, rozložením měďnatého komplexu N^α-ftaloyl-lysinu působením kyseliny chlorovodíkové a krystalizací ve formě vnitřní soli z roztoku kyselého uhličitanu sodného a vodného ethanolu. N^α-karboxyanhydrid, tj. látka obecného vzorce A, se z N^α-ftaloyl-lysinu připraví některou ze známých metod přípravy N^α-karboxyanhydridů, například reakcí s fosgenem v prostředí dioxanu.

Podstata způsobu přípravy polymerů obecného vzorce I podle vynálezu spočívá v tom, že se sloučenina obecného vzorce A kopolymeruje s látkou B, vybranou ze skupiny látek, zahrnující N^α-karboxyanhydridy ω-alkylesterů dikarboxylových aminokyselin. S výhodou lze použít N^α-karboxyanhydrid, odvozený od β-alkylesteru kyseliny asparagové nebo γ-alkylesteru kyseliny glutamové, přičemž řečený alkyl je vybrán ze skupiny, zahrnující lineární, větvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atomy uhlíku, 2,2,2-trichloroethyl, 2,2,2-trifluoroethyl a benzyl.

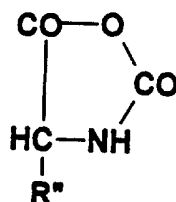
Látka B pro přípravu polymeru obecného vzorce I je vybrána ze skupiny, zahrnující zejména ω-alkylestery dikarboxylových aminokyselin. Vhodnými aminokyselinami ve smyslu vynálezu jsou zejména kyseliny L-glutamová a L-asparagová. Vhodnými ω-alkylestery těchto aminokyselin jsou takové, kde alkyl R je zvolen ze skupiny, zahrnující lineární, větvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atomy uhlíku, 2,2,2-trichloroethyl, 2,2,2-trifluoroethyl a benzyl, přičemž zvláště výhodný je benzyl.



(B)

Příprava těchto esterů je všeobecně známa. Rovněž pro přípravu příslušných N^α-karboxyanhydridů z těchto esterů lze použít postupy známé z literatury. Příkladem typického postupu je reakce s fosgenem obdobně, jak je uvedeno pro přípravu látky vzorce A.

Látkou C při přípravě polymeru obecného vzorce I je N-karboxyanhydrid α-aminokyseliny, zvolené ze skupiny, zahrnující α,L-aminokyseliny, běžně se vyskytující v bílkovinách, zejména zahrnující L-alanin, L-fenylalanin, L-tyrosin, L-leucin a L-valin. Látka C je popsána obecným vzorcem C:



(C)

kde R'' je ze skupiny, zahrnující zejména methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl nebo 2-methylpropyl.

Kopolymerace látek A, B a C může být provedena v libovolném aprotickém rozpouštědle, ve kterém A, B i C jsou rozpustné. Příklady vhodných rozpouštědel zahrnují methylenchlorid, dichlorethan, dioxan, benzen, N,N-dimethylformamid, N,N-dimethylacetamid, dimethylsulfoxid a jiné. K iniciaci polymerace lze použít látky, běžně používané k těmto účelům. Příkladem vhodných látek jsou primární, sekundární a terciární alkylaminy, např. hexylamin, diaminohexan, triethylamin, nebo báze, například methanolát sodný, organokovové sloučeniny, například triethylaluminium a pod. Tyto postupy polymerace N-karboxyanhydridů jsou všeobecně známy a není nutné je podrobně popisovat.

Výhodnou vlastností polymerů obecného vzorce I, zejména když R je benzyl, je jejich dobrá rozpustnost v řadě rozpouštědel, vhodných pro následné modifikační reakce, například aminolýzu aminoalkoholem. Vhodnými rozpouštědly jsou N,N-dimethylformamid, N,N-dimethylacetamid, dimethylsulfoxid, benzen, dioxan, chloroform, dichlorethan a jejich směsi.

Další výhodnou vlastností polymeru obecného vzorce I je skutečnost, že postupem podle vynálezu lze v jednom reakčním kroku aminolyzovat alkylestery jednotek B' i ftalimidové skupiny jednotek A' a získat tak kopolymer, obsahující volné aminoskupiny, jak je znázorněno ve vzorci jednotek A'' kopolymeru obecného vzorce II.

Podstata způsobu přípravy kopolymeru obecného vzorce II podle vynálezu spočívá v tom, že se kopolymer obecného vzorce I podrobí reakci s vhodným aminoalkoholem typu R'-NH₂, kde R' je

vybraný ze skupiny, zahrnující hydroxyalkyl s jednou či více hydroxylovými skupinami, 2-hydroxyethyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, a takto získaný produkt se izoluje běžnými metodami. Volbou alkylaminu $R'-NH_2$ při aminolytické reakci lze připravit kopolymery různých vlastností.

Aminolýzu kopolymeru obecného vzorce I lze postupem podle vynálezu provést tak, že k roztoku polymeru obecného vzorce I ve vhodném rozpouštědle, vybraném ze skupiny, zahrnující methylenchlorid, dichlorethan, dioxan, benzen, N,N-dimethylformamid, N,N-dimethylacetamid, dimethylsulfoxid a jiné, se přidá nadbytek příslušného alkylaminu a reaguje se po dobu nezbytně nutnou k úplné aminolýze všech alkylesterových a ftalimidových skupin. Vhodný poměr alkylaminu k polymeru je v rozmezí 1 až 200 mol (přednostně v rozmezí 10 až 100 mol) alkylaminu na mol monomerních jednotek polymeru. Vhodná doba reakce s alkylaminem závisí na teplotě, při které se reakce provádí, a poměru reaktantů. Tak například při teplotě 25 °C a poměru alkylaminu k monomerním jednotkám polymeru 50 : 1 je vhodná doba 16 dnů, při teplotě 37 °C 10 dnů a při teplotě 60 °C je vhodná reakční doba 3 dny. Reakční směs se potom zneutralizuje a polymer obecného vzorce II se oddělí od reakčních složek obvyklými způsoby, například precipitací, dialýzou, ultrafiltrací, chromatograficky a pod., a izoluje se z roztoku například srážením, sušením ve vakuu, lyofilizací a pod. Složení kopolymeru se ověří obvyklými metodami. Vhodnými metodami jsou analýza aminokyselin, stanovení aminoskupin reakcí s trinitrobenzensulfonovou kyselinou, titrace, elementární analýza a pod.

Výhodou postupu podle vynálezu je možnost volit množství jednotek, obsahujících aminoskupiny ve výsledném polymeru obecného vzorce II pomocí vhodného poměru látek A a B plus C v kopolymerizační směsi.

Postup podle vynálezu rovněž zachovává původní konfiguraci na asymetrickém uhlíku výchozích aminokyselin a proto, vyjde-li se při přípravě z L-aminokyselin, získá se polymer, obsahující v hlavním řetězci α ,L-peptidické vazby, které jsou principiálně štěpitelné enzymy, přítomnými v organismu. Je-li například polymerem obecného vzorce II kopolymer hydroxyalkyl-L-glutaminu s L-lysinem, pak tento polymer je degradovatelný proteinázami savčích organismů, zejména enzymy cathepsinem, trypsinem, kallikreinem, plasminem a dalšími. Štěpení polymeru endopeptidázovým mechanismem, tj. proteinázami, vede k rychlému poklesu molekulové hmotnosti polymeru. Štěpení exopeptidázami, například leucinaminopetidázou, či jinými aminopeptidázami, vede k produkci nízkomolekulárních fragmentů o velikosti jedné monomerní jednotky. Konečnými produkty degradace polymerů obecného vzorce II jsou proto monomerní deriváty použitých aminokyselin, které jsou netoxické a snadno se z organismu vyloučí.

V souladu s principem předmětného vynálezu mohou být k ovlivnění vlastností polymeru obecného vzorce II, zejména jeho biodegradovatelnosti, do polymerního řetězce zavedeny i další aminokyseliny, kromě těch, popsanych strukturními jednotkami A" a B". Tyto aminokyseliny jsou vyznačeny jako strukturní jednotka C' ve vzorcích I a II. S výhodou budou tyto aminokyseliny zvoleny ze skupiny, zahrnující L-alanin, L-valin, L-leucin, L-tyrosin a L-phenylalanin. Jejich vliv na rychlost degradace různými enzymy je dále doložen. Je výhodné, aby i při použití složky C' byla převládající součástí polymeru obecného vzorce I složka B', tvořená alkylestery dikarboxylových aminokyselin, umožňující převedení na hydroxyalkyl-deriváty aminolýzou.

Primární alifatické aminoskupiny kopolymeru obecného vzorce I jsou příhodnými nukleofily pro chemické modifikace, například pro vazbu fyziologicky aktivních látek. Příkladem takových reakcí mohou být reakce s elektrofilními skupinami, jakými jsou aktivované estery a chloridy karboxylových kyselin, isokyanáty, isothiokyanáty, azidy, aldehydy, epoxidy a pod. Reakce primárních aminoskupin na hydrofilních polymerech jsou široce prostudovány a mohou být aplikovány na polymery podle vynálezu přiměřeně jejich vlastnostem a požadavkům na výsledný

produkt. Lze proto odvodit, že bude-li elektrofilní skupina přítomna na fyziologicky aktivní látce či na vhodné spojce, pak reakce s aminoskupinou polymeru podle tohoto vynálezu povede ke vzniku polymerního produktu s navázanou předmětnou fyziologicky aktivní látkou. Je cílem tohoto vynálezu poskytnout vhodný polymer k tomuto účelu.

5

Vynález je dále doložen příklady, které mají sloužit k jeho lepší srozumitelnosti a nejsou míněny tak, aby vynález, nebo některý jeho znak, byl jimi limitován, pokud tak není přímo specifikováno.

10

Příklady provedení

Příklad 1

15

Roztok 7,30 g L-lysinu monohydrochloridu a 3,20 g hydroxidu sodného v 70 ml vody se smíchá s roztokem 5 g síranu měďnatého v 70 ml vody. K výslednému tmavomodrému roztoku se přidá 4 g kyselého uhličitanu sodného a 10 g N-ethoxykarbonylftalimidu a reakční směs se míchá 1 hodinu při laboratorní teplotě. Modrý komplex se odsaje, promyje vodou, ethanolem, chloroformem a etherem a vysuší se. Takto se získá 9,21 g měďnatého komplexu N^ε-ftaloyl-L-lysinu, který se dále míchá se 45 ml 6N kyseliny chlorovodíkové 1 hodinu při teplotě laboratoře. Produkt se odfiltruje a promývá 6N HCl. Vysuší se a krystalizuje z vodného ethanolu. Získaný hydrochlorid N^ε-ftaloyl-L-lysinu (6,79 g) ve 130 ml vody se přelije za míchání 58,4 ml 0,5 N roztoku kyselého uhličitanu sodného. Směs se míchá 30 minut a pH se upraví na 7,00 kyselinou octovou. Produkt se odfiltruje, promyje vodou a vysuší ve vakuu nad P₂O₅. Po krystalizaci z vodného ethanolu se získá 3,10 g N^ε-ftaloyl-L-lysinu. Teplota tání: 223-224 °C. Pro C₁₄H₁₆N₂O₄ vypočteno: 60,86 % C, 5,84 % H, 10,14 % N; nalezeno: 60,09 % C, 5,52 % H, 10,16 % N.

30

Příklad 2

20,0 g N^ε-ftaloyl-L-lysinu, připraveného podle příkladu 1, se suspenduje ve 300 ml dioxanu a za míchání se při teplotě 55 °C zavádí plynný fosgen po dobu 2 hodin. Přebytek fosgenu se odstraní plynným dusíkem, roztok se zfiltruje a filtrát se odpaří dosucha. Odparek se krystalizuje ze směsi chloroform-hexan a octan ethylnatý - hexan. Získá se 13,8 g N^α-karboxyanhydridu N^ε-ftaloyl-L-lysinu (látka A). Teplota tání: 175 - 179 °C. Pro C₁₅H₁₄N₂O₅ vypočteno: 59,60 % C, 4,67 % H a 9,27 % N; nalezeno: 59,44 % C, 4,80 % H a 9,09 % N.

40

Příklad 3

0,97 g N^α-karboxyanhydridu N^ε-ftaloyl-lysinu, připraveného podle příkladu 2 (látka A), a 7,55 g N^α-karboxyanhydridu N^β-benzylglutamátu (B) bylo rozpuštěno v 300 ml bezvodého dioxanu a k roztoku bylo přidáno 0,075 g (0,104 ml) triethylaminu. Reakční nádoba byla uzavřena chlorkalciovým uzávěrem a polymerizace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 6 dnů. Polymer byl vysrážen do ethanolu, promyt ethanolem a vysušen. Získáno bylo 5,34 g kopolymeru I. Analýzou aminokyselin ve vzorku polymeru, hydrolyzovaném 6N HCl, byl zjištěn molární zlomek strukturní jednotky A': a = 0,10, a molární zlomek strukturní jednotky B': b = 0,90.

50

Příklad 4

2,76 g (0,01 mol) N^α -karboxyanhydridu N^ϵ -ftaloyl-lysinu, připraveného podle příkladu 2 (látka A), a 22,41 g (0,09 mol) N^α -karboxyanhydridu N^β -benzylaspartátu (B) bylo rozpuštěno v 500 ml bezvodého dioxanu a k roztoku bylo přidáno 0,255 g (2,5 mmol) triethylaminu. Další postup byl shodný s postupem v příkladu 3. Bylo získáno 18,5 g polymerního produktu, odpovídajícího obecnému vzorci kopolymeru I, kde $a = 0,09$, $b = 0,91$, $n = 4$ a $m = 1$.

Příklad 5

N^α -karboxyanhydrid N^ϵ -ftaloyl-lysinu, připravený postupem podle příkladu 2 (látka A), a N^α -karboxyanhydrid N^γ -benzylglutamátu (B) byly rozpuštěny v bezvodém dioxanu na koncentraci 0,1 mol/l a jejich roztoky smíšený v poměrech obou složek tak, jak je uvedeno v tabulce 1. Polymerizace byla iniciována methanolátem sodným. Reakce probíhala při teplotě 25 °C po dobu 30 až 60 minut do dosažení konverze monomerů v rozmezí 6 - 9 %. Výsledné kopolymery obecné struktury, dané vzorcem I, byly vysráženy do ethanolu, vysušeny a jejich složení stanoveno pomocí aminokyselinové analýzy. Hodnoty molárního zlomku a strukturní jednotky A' v kopolymerech jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Obsah látky A v polymerizační násadě v % a molární zlomek a strukturní jednotky A' ve výsledných kopolymerech.

Polymerizační ná sada	Složení kopolymeru
% A	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

Příklad 6

2,23 g kopolymeru I, připraveného postupem podle příkladu 3, se rozpustí v 22 ml N,N-dimethylacetamidu, k roztoku se přidá 30 ml 2-aminoethanolu a reakční směs se míchá při teplotě 60 °C po dobu 72 hodin. Reakční směs se naředí 30 ml 2N HCl a neutralizuje koncentrovanou HCl. Po dialýze proti vodě se polymer izoluje lyofilizací z vodného roztoku. Výsledný produkt je kopolymerem L-lysinu a N^5 -(2-hydroxyethyl)-L-glutaminu, odpovídající obecné struktuře polymeru II, kde $n = 4$, $m = 2$, $a = 0,10$ a $b = 0,9$ (podle analýzy aminokyselin). Stanovení molárního zlomku volných aminoskupin pomocí reakce s 2,4,6-trinitrobenzen-sulfonovou kyselinou odpovídá molárnímu zlomku lysinových zbytků v kopolymeru.

Příklad 7

1,55 g polymeru II, připraveného postupem podle příkladu 6, se rozpustí v 60 ml bezvodého N,N-dimethylacetamidu a přidá se 0,12 ml triethylaminu. Roztok se vychladí v ledové lázni a přidá se 0,314 g (1,0 mmol) 3-maleinimidobenzoyl-N-oxy-succinimidu. Reakční směs se míchá při teplotě 0 - 4 °C po dobu 4 hod., N,N-dimethylacetamid se oddialyzuje a polymer se dále zbaví nízkomolekulárních reakčních složek ultrafiltrací. Lyofilizací z vodného roztoku se získá 1,2 g modifikovaného polymeru II, ve kterém 88 % původně přítomných aminoskupin lysinových zbytků je modifikováno navázanými 3-maleinimido-benzoylovými skupinami.

Příklad 8

K roztoku 0,31 g polymeru II, připraveného postupem podle příkladu 6, v 6 ml 0,1 M uhličitánového pufru pH 8,8 se přidá 40 mg fluoresceinisothiokyanátu (FITC) a reakční směs se míchá při teplotě 4 °C po dobu 16 hod. Po dialýze a chromatografii na koloně, plněné Sephadexem G-25 (Sephadex-obchodní značka fy. Pharmacia, Uppsala), se polymer lyofilizuje. Získá se 0,25 g modifikovaného polymeru II, obsahujícího fluorescein, vázaný na 18 % původně přítomných lysinových zbytků.

Příklad 9

50,1 mg (0,13 mmol) sukcinyl-L-phenylalanyl-p-nitroanilidu (SPNA) se rozpustí v 0,6 ml N,N-dimethylformamidu a roztok se vychladí na 0 °C. K roztoku se přidá 30,2 mg (0,156 mmol) N-ethyl-N' (dimethylaminopropyl)karbodiimidu hydrochloridu (Fluka, AG). Reakční směs se míchá v ledové lázni po dobu 40 min a pak se přidá roztok, obsahující 400 mg polymeru II, připraveného postupem podle příkladu 6, a 20 µl triethylaminu ve 2 ml N,N-dimethylformamidu. Reakce pokračuje za míchání v chladu po dobu 4 hod. Polymer se izoluje analogicky jako v příkladě 8. Získá se 350 mg modifikovaného polymeru II, obsahujícího na 45 % původně přítomných lysinových zbytků vázaný sukcinyl-L-phenylalanyl-p-nitroanilid, (SPNA). Takto připravený polymer lze použít jako vodorozpustný, makromolekulární substrát pro serinové proteinázy, například chymotrypsin, jejichž působením se z bočních řetězců polymeru uvolňuje p-nitroanilin.

Příklad 10

Analogicky k postupu, uvedenému v příkladu 3, se připraví kopolymer I, jehož struktura se od struktury kopolymeru podle příkladu 3 liší tím, že vedle jednotek B' obsahuje ještě jiné aminokyseliny tak, že se v polymerizační násadě odpovídající část monomeru B, tj. N^α-karboxyanhydridu N^γ-benzylglutamátu podle příkladu 3 nahradí N^α-karboxyanhydridem příslušné α-aminokyseliny (C). Takto byl připraven kopolymer Ia, obsahující 5,2 % zbytků L-alaninu, kopolymer Ib, obsahující analogicky 8,4 mol zbytků L-fenylalaninu, kopolymer Ic obsahující analogicky 3,8 mol % zbytků O-acetyl-L-tyrosinu.

Příklad 11

Analogicky k postupu, uvedenému v příkladu 6, se připraví hydrofilní, vodorozpustné kopolymery IIa, IIb a IIc vždy reakcí odpovídajícího z kopolymerů Ia, Ib a Ic, připravených postupem podle příkladu 10, s 2- aminoethanolem v prostředí N,N-dimethylacetamidu. Získané kopolymery obsahují vedle strukturních jednotek 2-hydroxyethyl L-glutaminu a lysinu ještě

zbytky další aminokyseliny, tj. L-alaninu (IIa), L-fenylalaninu (IIb) nebo O-acetyl-L-tyrosinu (IIc) v množství, odpovídajícím obsahu těchto zbytků v kopolymerech Ia, Ib a Ic.

5 Příklad 12

Enzymatická degradace kopolymerů II, IIa a IIb byla testována za použití enzymů papainu, kathepsinu B, trypsinu, chymotrypsinu, elastázy, pepsinu a pronázy E. Z jednotlivých kopolymerů byly připraveny roztoky v 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,8 o koncentraci 2 mg/ml. K roztokům byly přidány případné další aktivátory, např. EDTA, dithiothreitol, chlorid vápenatý, podle požadavků na optimální podmínky pro aktivitu jednotlivých enzymů. Roztoky byly vytemperovány na teplotu 37 °C a jednotlivé enzymy byly do reakční směsi přidávány na výslednou koncentraci 0,02 mg/ml. Pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) byly změřeny číselné průměry molekulových hmotností jednotlivých polymerů před přidáním enzymu (M_0) a po 16 hodinách inkubace s enzymem při 37 °C, (M_n). Z poklesu hodnot číselných průměrů molekulové hmotnosti lze hodnotit účinnost jednotlivých enzymů při degradaci testovaných kopolymerů. Hodnoty průměrů molekulových hmotností před a po inkubaci s enzymem jsou uvedeny v tabulce 2.

20

Tabulka 2

Degradace kopolymerů II, IIa a IIb jednotlivými proteinázami. M_0 , výchozí průměr mol. hmotnosti před působením enzymu; M_n , číselný průměr mol. hmotnosti po 16 hodinách inkubace s enzymem.

25

Enzym	Střední molekulová hmotnost, M_n		
	II $M_0 = 72\ 000$	IIa $M_0 = 59\ 000$	IIb $M_0 = 64\ 500$
chymotrypsin	72 000	52 000	7 200
elastase	72 000	9 200	24 000
pepsin	48 000	32 000	43 500
trypsin	8 200	17 000	12 800
kathepsin B	16 200	12 000	18 600
papain	8 400	4 600	6 800
pronase E	3 200	4 800	4 800

PATENTOVÉ NÁROKY

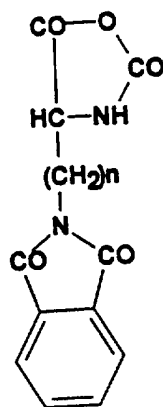
5

1. Monomery na bázi α,ω -diaminokyselin obecného vzorce A

10

15

20



(A)

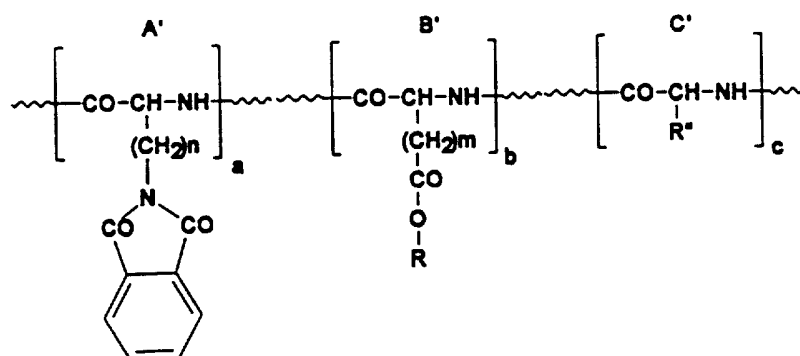
kde $n = 2 - 4$.

25

2. Polymery na bázi α,ω -diaminokyselin podle obecného vzorce I:

30

35



(I)

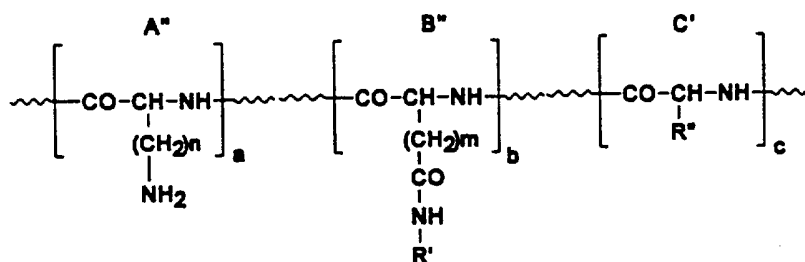
40

45

kde a , b a c jsou molární zlomky strukturních jednotek A' , B' a C' , přičemž a je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,8, b je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,9 a c je 0 nebo v rozmezí 0 až 0,45, přičemž $a + b + c = 1$, n je v rozmezí 2 až 4, m je 1 nebo 2 a R je alkyl ze skupiny, zahrnující lineární, větvené a cyklické alkyly s 1- 18 atomy uhlíku, benzyl a 2,2,2-trichloroethyl, s výhodou pak benzyl, R'' je methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl nebo 2-methylpropyl, přičemž střední polymerizační stupeň polymeru I je v rozmezí 5 až 2000 monomerních jednotek, s výhodou v rozmezí 30 až 1200 monomerních jednotek.

50

3. Lineární, hydrofilní polymery na bázi α,ω -diaminokyselin, obsahující dva typy bočních řetězců, přičemž jeden typ bočních řetězců nese primární alifatickou aminoskupinu a další typ je tvořen řetězcem hydroxyalkylovým, podle obecného vzorce II:

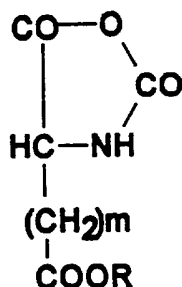


(II)

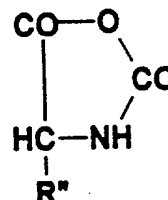
5
10 kde a, b a c jsou molární zlomky strukturních jednotek A'', B'' a C', přičemž a je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v intervalu 0,01 - 0,8, b je větší než 0 a menší než 1, s výhodou v rozmezí 0,01 - 0,9 a c je 0 nebo v rozmezí 0 až 0,45, přičemž a + b + c = 1, n je v rozmezí 2 až 4, m je 1 nebo 2 a R' je hydroxyalkyl s 2 až 5 atomy uhlíku, obsahující jednu nebo i více hydroxylových skupin, vybraný ze skupiny, zahrnující 2-hydroxyethyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, s výhodou hydroxyalkyly a dihydroxyalkyly s 2 až 3 atomy uhlíku, R'' je methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl nebo 2-methylpropyl, přičemž střední polymerizační stupeň polymeru je v rozmezí 5 až 2000 monomerních jednotek, s výhodou 10 až 1000 monomerních jednotek.

20 4. Způsob přípravy polymeru obecného vzorce I, **v y z n a ě n ý t í m**, že látka obecného vzorce A se polymeruje společně s látkou obecného vzorce B, kde m je 1 nebo 2 a R je alkyl ze skupiny, zahrnující lineární, větvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atomy uhlíku, benzyl a 2,2,2-trichloroethyl, s výhodou pak benzyl, a látkou obecného vzorce C, kde R'' je ze skupiny, zahrnující methyl, benzyl, 4-hydroxyfenylmethyl, isopropyl a 2-methylpropyl.

(B)



(C)



30 5. Způsob přípravy polymeru obecného vzorce I podle nároku 4, **v y z n a ě n ý t í m**, že látkou B je N^α-karboxyanhydrid, odvozený od β-alkylesteru kyseliny asparagové nebo γ-alkylesteru kyseliny glutamové, přičemž řečený alkyl je vybrán ze skupiny, zahrnující lineární, větvené a cyklické alkyly s 1 - 18 atomy uhlíku, 2,2,2-trichloroethyl, 2,2,2-trifluoroethyl a benzyl.

40 6. Způsob přípravy polymeru obecného vzorce II, **v y z n a ě n ý t í m**, že se polymer obecného vzorce I podrobí reakci s vhodným aminoalkoholem typu R'-NH₂, kde R' je hydroxyalkyl s 2 až 5 atomy uhlíku, obsahující jednu nebo i více hydroxylových skupin, vybraný ze skupiny, zahrnující 2-hydroxyethyl, 2-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 3-hydroxybutyl, 4-hydroxybutyl, hydroxypentyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2,4-dihydroxybutyl a dihydroxypentyl, a takto získaný produkt se izoluje běžnými metodami.

50 7. Způsob přípravy polymeru obecného vzorce I podle nároku 4, **v y z n a ě n ý t í m**, že látkou B je N^α-karboxyanhydrid γ-benzyl-L-glutamátu.

8. Způsob přípravy polymeru obecného vzorce I podle nároku 4, **v y z n a ě n ý t í m**, že látkou A je N^α-karboxyanhydrid N^ω-ftaloyl-lysinu.

5 9. Polymer obecného vzorce II podle nároku 3, v kterém strukturní jednotka A" je tvořena zbytkem L-lysinu a strukturní jednotka B" je tvořena zbytkem N⁵-(2-hydroxyethyl)-L-glutaminu.

10. Polymer obecného vzorce II podle nároku 3, v kterém strukturní jednotkou C' je zbytek aminokyseliny ze skupiny, zahrnující L-alanin, L-fenylalanin, L-tyrosin, L-valin a L-leucin.

10

Konec dokumentu

15