



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

223417
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 31/78

(22) Přihlášeno 13 07 81
(21) (PV 5354-81)

(40) Zveřejněno 31 12 82

(45) Vydáno 15 03 86

(75)

Autor vynálezu

EKATERINA ZACHARIEVA IVANOVA, MILKA GEORGIEVA PETROVA,
VLADIMÍR KABAIVANOV STEFANOV, SOFIE (BLR),
KOPEČEK JINDŘICH ing. CSc., ULBRICH KAREL ing. CSc., PRAHA
(ČSSR)

(54) Polymerní látky s protinádorovou aktivitou a způsob jejich přípravy

1

Vynález se týká polymerních látek s protinádorovou aktivitou a způsobu jejich výroby.

Je známé navázání biologicky aktivních látek na polymery pomocí tak zvaných distančních skupin (Ringsdorf n., J. Polym. Sci, Polym. Symp. 51, 135 — 153, 1957, Kopeček J., Polymers in Medicine 7, 191 — 220, 1977), které umožňují jejich výhodné pojení a uvolnění. K nim patří ve vodě rozpustné kopolymery, které obsahují oligopeptické řetězce (Ulbrich K., Zacharieva I. E., Obereigner B., Kopeček J., Biomaterials, 1, 199, 1980) enzymaticky degradovatelné in vitro papainem (Ulbrich K., Zacharieva I. E., Obereigner B., Kopeček J., Biomaterials, 1, 199, 1980), chemotrypsinem, trypsinem (Ulbrich K., Strohalm J., Kopeček J., Makromol. Chem., in press.), tritozomem (Duncan R., Lloyd Y., B., Kopeček J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 284 — 290, 94, 1, 1980). Struktura polymeru se musí zvolit tak, aby vazba účinné látky vycházela ze specifické aminokyseliny pro enzym vyvolávající štěpení.

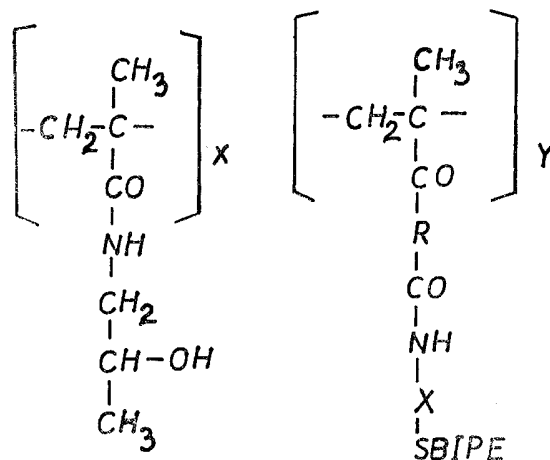
V literatuře nejsou údaje o využití polymerních nosičů cytostatik tohoto typu.

Nedostatkem uvedených cytostatik je jejich toxicita, tj. působí škodlivě na proliferující buňky, jako například kostní dřeň,

2

lymfatické tkáně, gastrointestinálního traktu, genitourinálního epitelu a nespecifita jejich účinku.

Předmětem vynálezu je polymerní látka s protinádorovou aktivitou na bázi kopolymerů N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidu a methakrylamidu obecného vzorce



kde $x = 85 - 97$ mol. %, $y = 3 - 15$ mol. proc. o mol. hmotnosti $M_w = 15 - 40\,000$, R je enzymaticky štěpitelná distanční jednotka a $-\text{X}-\text{SBIPE}$ je nízkomolekulární

látky s protinádorovým účinkem, vázána na nosič kovalentní vazbou.

Boční distanční jednotkou může být s výhodou glycin [Gly] nebo glycin-leucin-([Gly-Leu-]).

Podstata způsobu přípravy látky podle vynálezu spočívá v tom, že polymerní nosič se rozpustí v suchém dimethylsulfoxidu a za míchání v přítomnosti triethylaminu se přidá $\text{NH}_2\text{—X—SBIPE}$ a nechá se reagovat po dobu 20 hodin a získaný produkt se izoluje srážením do směsi aceton : diethyléter (3 : 1) s následným přečišťováním pomocí dvojnásobného rozpuštění v metanolu a srážení do směsi aceton : diethyl (3 : 1).

V případě, že se používá $\text{NH}_2\text{—Phe—SBIPE}$ postupuje se podle vynálezu tak, že se nejdříve připraví $\text{NH}_2\text{—Phe—SBIPE}$, a to tak, že se hydrochlorid isopropylesteru sarkolysinu nechá v přítomnosti triethylaminu reagovat s benzyloxykarbonyl-phenylalaninem (BOC—Phe—OH) při -10 až -5°C v tetrahydrofuranu metodou DCCI, poté se blokující benzyloxykarbonylová skupina (BOC) odstraní roztokem HCl v methanolu a fenylalanylsarkolysinhydrochlorid se izoluje filtrací a přidá se za míchání do roztoku polymeru v suchém dimethylsulfoxidu, případně dimethylformamidu v přítomnosti triethylaminu a nechá při pokojové teplotě reagovat po dobu asi 20 hodin a získaný produkt se izoluje srážením do směsi ace-

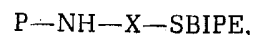
ton : diethyléter (3 : 1) s následným přečišťováním pomocí dvojnásobného rozpuštění v metanolu a srážení do směsi aceton : diethyléter (3 : 1).

Látky s protinádorovou aktivitou podle vynálezu mají sníženou toxicitu, zvýšenou specifitu a prolongovaný účinek působení.

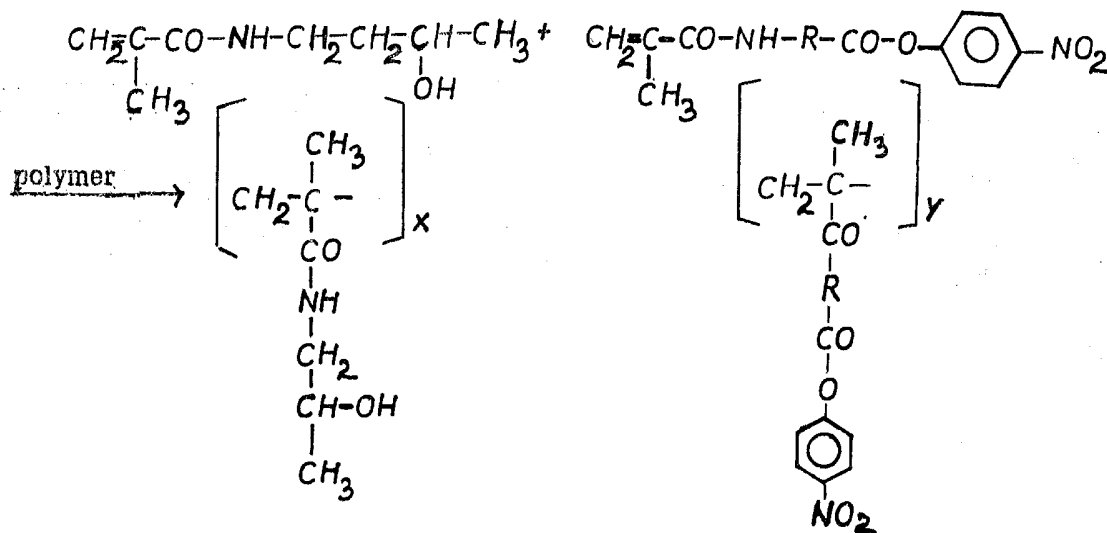
Problém je řešen pomocí kovalentně vázaného určitého aktivního cytostatika s ve vodě rozpustným kopolymerem na bázi N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidu (HPMA) a methakrylamidu s bočním řetězcem prodlouženým oligopeptidickými jednotkami, podléhajícími enzymatickému štěpení.

Jako aktivního cytostatika se použije isopropylester p-di-(2-chlorethyl)-aminofenylalaninu (sarkolysin — SBIPE) a jako polymerního nosiče kopolymer N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidu (HPMA) a methakrylamidem, u kterého jsou methakrylamidové skupiny prodlouženy o boční řetězce, obsahující jednotky schopné enzymatického štěpení.

Obecný vzorec syntetizovaných sloučenin s předpokládanou protinádorovou aktivitou je



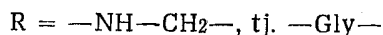
kde P je polymerní nosič připravený podle schématu 1,



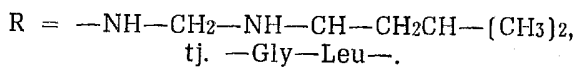
SCHEMA 1

$x = 85$ až 90 mol. %, $y = 5$ až 15 mol. %, $M_w = 15 - 40\,000$, a $X = \text{O}$ nebo —Phe— .

Pro sledování vlivu délky bočního řetězce na protinádorovou aktivitu byl v jedné skupině polymerních nosičů



a ve druhé



V případě, že $\text{R} = \text{—Gly—}$, $\text{X} = \text{O}$, používá se jako nízkomolekulárního cytostatika

SBIPE a při přípravě sloučeniny s protinádorovou aktivitou podle vynálezu obecného vzorce

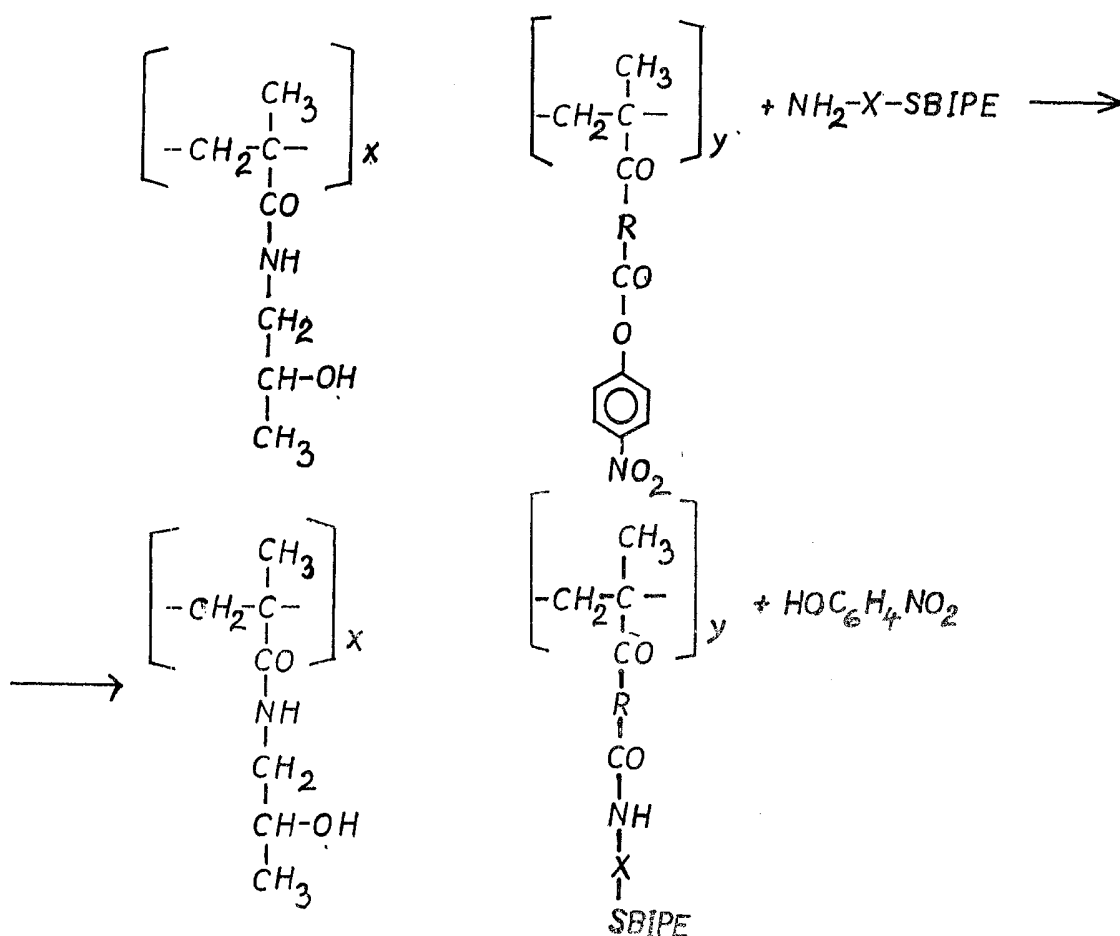
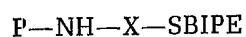


SCHÉMA 2

V případě, když $R = -\text{Gly}-\text{Leu}-$ a $X = -\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, tj. $-\text{Phe}-$ je pří-

prava protinádorové sloučeniny dvoustupňová. V prvním stupni se připraví $\text{HCl}-\text{Phe}-\text{SBIPE}$ (fenylalanylsarkosinhydrochlorid), který se v druhém stupni nechá reagovat s polymerním nosičem.

se postupuje jednostupňově podle schématu 2, tj. $P + NH_2-X-SBIPE$;

I. stupeň. — Tvorba produktu $NH_2-X-SBIPE$ ($NH_2-PHE-SBIPE$) vychází z reakce benzyloxykarbonyl-phenylalaninu ($\text{BOC}-PHE-OH$) s hydrochloridem isopropylesteru sarkolysinu v přítomnosti triethylaminu. Reakce probíhá v tetrahydrofuranu metodou DCCI (dicyklohexylkarbodiimidovou). Použité roztoky jsou přibližně 20% koncentrace. BOS — blokáda se odstraňuje 20% hmot. roztokem HCl v methanolu. Proces probíhá podle schématu 3.

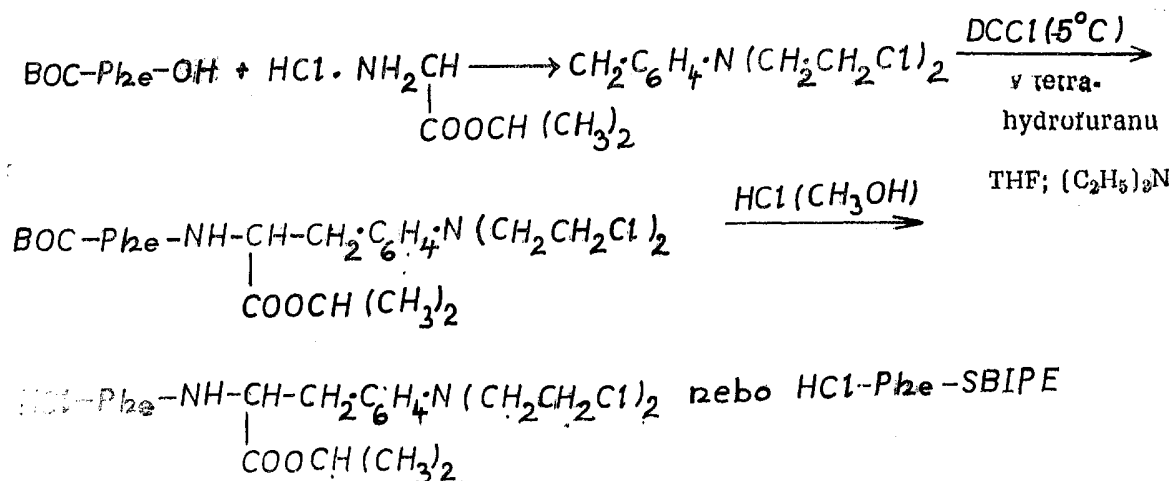


SCHÉMA 3

Reakční produkt HCl—Phe—SBIPE — fenylalanylsarkolysinhydrochlorid byl přečištěn rekrystalizací z éteru.

II. stupeň. — Polymerní nosič obsahující aktivní skupiny, se rozpouští v suchém dimethylsulfoxidu v poměru ONp : NH₂ = 1 : 2 v přítomnosti ekvivalentního množství triethylaminu. Reakce probíhá za míchání při laboratorní teplotě během 20 hodin. Reakční produkt se izoluje srážením do směsi aceton : diethyléter (3 : 1) a přesrážením z methanolu do aceton : diethyléter (3 : 1). Produkt se suší při laboratorní teplotě za vakua do konstantní hmotnosti. Obsah vázaného cytostatika se vypočte z obsahu Cl.

Následující příklady vynález osvětlují, aniž by ho omezovaly.

Příklad 1

Polymerní nosič se připravuje radikálovou srážecí polymerizací v prostředí acetonu při koncentraci monomerů 12,5 % hmot. (90, 93, 95 % hmot. HPMA a 10, 7, 5 % hmot. komonomeru), 0,6 % hmot. azobisisobutyronitrilu jako iniciátoru v ampulích při 50 °C, reakční doba 48 hodin. Polymer se odfiltruje a promyje dvakrát acetonem a éterem. Suší se do konstantní váhy ve vakuu při laboratorní teplotě.

P ř í k l a d 2

Meziprodukt $\text{NH}_2\text{—Phe—SBIPE}$ byl připraven podle schématu 3.

Byl připraven asi 20% roztok BOC—Phe—OH v suchém tetrahydrofuranu. V přítomnosti ekvimolárního množství dicyklohexylkarbodiimidu (DCCI) a hydrochloridu isopropylesteru sarkosylinu při -5°C v přítomnosti triethylaminu a za energického míchání byl připraven BOC—Phe—SBIPE. Blokáda byla odstraněna rozpouštěním připraveného produktu (20% hmot. roztok) v methanolu nasyceném HCl za míchání při laboratorní teplotě. Hydrochlorid připraveného produktu byl izolován filtrací.

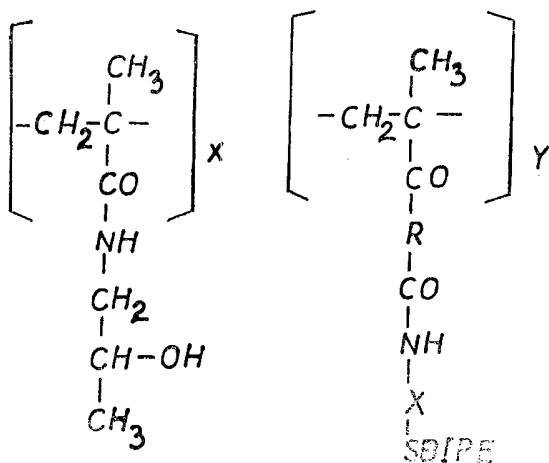
Příklad 3

P—NH—X—SBIPE byl připraven rozpuštěním P v dimetylsulfoxidu (20% hmot. roztok). Za míchání se přidá HCl. $\text{NH}_2\text{—X—SBIPE}$, poměr $\text{ONp}:\text{NH}_2 = 1:2$ a ekvimolární množství triethylaminu, počítáno na HCl. Po 20 hodinách míchání při pokojové teplotě se polymerní sloučenina izoluje vysrážením do směsi éter : aceton (1 : 3). Následuje dvakrát srážení z methanolu do směsi éter : aceton (1 : 3). Připravený produkt byl sušen při laboratorní teplotě do konstantní hmotnosti.

Osah cytotatika se určí z obsahu chloru. Pomocí GPC chromatografie byla pro zkoušení in vivo izolována frakce s $\overline{M}_w \sim 24\,000$. UV spektroskopie prokázala, že polymerní frakce neobsahuje volný sarko-
lysin.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

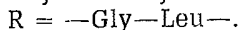
1. Polymerní látka s protinádorovou aktivitou na bázi kopolymerů N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidu a methakrylamidu obecného vzorce



kde $x = 85$ až 97 mol. %, $y = 3$ až 15 mol. procent o mol. hmotnosti $M_w = 15$ až $40\,000$, R je enzymaticky štěpitelná distanční jednotka a $-\text{X}-\text{SBIPE}$ je nízkomolekulární látka s protinádorovým účinkem, vázána na nosič kovalentní vazbou.

2. Polymerní látka s protinádorovou aktivitou podle bodu 1, vyznačená tím, že jako boční distanční jednotka je $R = -\text{Gly}-$.

3. Polymerní látka s protinádorovou aktivitou podle bodu 1, vyznačená tím, že jako boční distanční jednotka je



4. Polymerní látka s protinádorovou aktivitou podle bodů 1 a 2, vyznačená tím, že

$X = 0$, a jako nízkomolekulární cytostatikum je použit isopropylester sarkolysinu.

5. Polymerní látka s protinádorovou aktivitou podle bodů 1, 3 a 4, vyznačená tím, že $X = -\text{Phe}-$.

6. Způsob přípravy polymerní látky s protinádorovou aktivitou podle bodů 1 až 5, vyznačený tím, že polymerní nosič se rozpustí v suchém dimethylsulfoxidu a za míchání v přítomnosti triethylaminu se přidá $\text{NH}_2-\text{X}-\text{SBIPE}$ a nechá se reagovat po dobu 20 hodin a získaný produkt se izoluje srážením do směsi aceton : diethyléter (3 : 1) s následným přečišťováním pomocí dvojnásobného rozpuštění v metanolu a srážení do směsi aceton : diethyléter (3 : 1).

7. Způsob přípravy polymerní látky s protinádorovou aktivitou podle bodů 1 až 6, vyznačený tím, že se nejdříve připraví $\text{NH}_2-\text{Phe}-\text{SBIPE}$, a to tak, že se hydrochlorid isopropylesteru sarkolysinu nechá v přítomnosti triethylaminu reagovat s benzyloxykarbonyl-phenylalaninem ($\text{BOC}-\text{Phe}-\text{OA}$) při -10 až -5°C v tetrahydrofuranu metodou DCCl, poté se blokující benzyloxykarbonylová skupina (BOC) odstraní roztokem HCl v methanolu a fenylalanylsarkolysinhydrochlorid se izoluje filtrací a přidá se za míchání do roztoku polymeru v suchém dimethylsulfoxidu, případně dimethylformamidu v přítomnosti triethylaminu a nechá při pokojové teplotě reagovat podobu asi 20 hodin a získaný produkt se izoluje srážením do směsi aceton—diethyléter (3 : 1) s následným přečišťováním pomocí dvojnásobného rozpuštění v methanolu a srážení do směsi aceton : diethyléter (3 : 1).