

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-527586

(P2004-527586A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/42

4 C O 7 6

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/127

4 J O O 1

A 6 1 K 47/08

A 6 1 K 47/08

4 J 2 O O

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/12

A 6 1 K 47/12

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-502070 (P2003-502070)

(86) (22) 出願日 平成14年6月3日 (2002.6.3)

(85) 翻訳文提出日 平成15年12月1日 (2003.12.1)

(86) 国際出願番号 PCT/EP2002/006783

(87) 国際公開番号 W02002/098952

(87) 国際公開日 平成14年12月12日 (2002.12.12)

(31) 優先権主張番号 01202107.7

(32) 優先日 平成13年6月1日 (2001.6.1)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 592099787

ヤマノウチ ユーロープ ベスローテン

フェンノートシャップ

オランダ エヌエル2353 エーヴェー

レイデルドルプ エリザベスホフ 19

(74) 代理人 100082005

弁理士 熊倉 禎男

(74) 代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74) 代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74) 代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74) 代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質-ポリマー結合体組成物

(57) 【要約】

ポリ〔(N-(2-ヒドロキシエチル)-グルタミン)(PHEG)のようなポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸誘導体)又はポリ(アミノ酸類似化合物)の脂質結合体と、活性剤とを含むコロイド状担体組成物を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 つの疎水性無極部位と親水性極性ヘッド基からなる両親媒性脂質とポリマー又はそのモノマー前駆体とから得ることができる脂質 - ポリマー - 結合体と、活性剤とを含むコロイド状担体組成物であって、該ポリマーがポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸誘導体)又はポリ(アミノ酸類似化合物)であり、該脂質 - ポリマー - 結合体によって該コロイド状担体組成物が長期循環性を付与されるコロイド状担体組成物。

## 【請求項 2】

該コロイド状担体が小胞系である請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 3】

該両親媒性脂質が、リン脂質、糖脂質、セラミド、コレステロール及びその誘導体、飽和又は不飽和の分岐又は直鎖の炭素数 8 ~ 50 のモノ又はジアルキルアミン、アリールアルキルアミン、シクロアルキルアミン、アルカノール、アルデヒド、カルボハライド又はアルカノイック酸、及びこれらの無水物からなる群から選択される請求項 1 又は 2 記載の組成物。

## 【請求項 4】

該両親媒性脂質が少なくとも 2 つの疎水性無極部位を有する請求項 3 記載の組成物。

## 【請求項 5】

該両親媒性脂質が、1 - ヘプタデシルオクタデシルアミン、N - スクシニルジオクタデシルアミン及びジステアリルホスファチジルエタノールアミンからなる群から選択される請求項 4 記載の組成物。

## 【請求項 6】

該ポリマーの水における - パラメーターが、0.65 以下、好ましくは 0.5 以下である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の組成物。

## 【請求項 7】

該ポリマーが、生理的 pH 範囲 4 ~ 8 において実質的な量の荷電基を含まない請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の組成物。

## 【請求項 8】

該ポリマーが、生理的 pH 値 4 ~ 8 において中性であるか又は中和されているアミノ酸モノマー、アミノ酸類似化合物モノマー又はアミノ酸誘導体モノマーからなる請求項 7 記載の組成物。

## 【請求項 9】

該ポリマーが、- アミノ酸及びその誘導体又は類似化合物からなる請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の組成物。

## 【請求項 10】

該ポリマーの分子量が 500 ~ 75,000、好ましくは 2,000 ~ 15,000 である請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の組成物。

## 【請求項 11】

該ポリマーが生分解性である請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の組成物。

## 【請求項 12】

該ポリマーが、ポリ[(N - (2 - ヒドロキシエチル)) - L - グルタミン]である請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 13】

該ポリマーが、ポリ(2 - ヒドロキシエチル) - L - アスパラギンである請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 14】

該ポリマーがポリ(D, L - メチオニンスルホキシド)である請求項 1 記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

10

20

30

40

50

本発明は活性剤(active agent)及び脂質 - ポリマー結合体を含むコロイド状担体組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

コロイド状担体組成物には、リポソーム、ニオソームやリバース小胞(reversed vesicles)のような二分子膜小胞系、ミセル系、ナノカプセル、ナノスフェア等が含まれる。このようなコロイド状担体組成物のなかでよく知られている代表的なものはリポソームで形成されている。以後、特にリポソームについて言及するが、本明細書における説明、開示及び教示は、他のコロイド状担体組成物にも同様に関わるということを念頭においておかなければならない。

リポソームはコロイド状担体粒子のグループに属し、水性相を封入した一つ以上の同心円状の脂質二分子膜からなる微細な小胞である。その大きさ、表面電荷、脂質組成物、二分子膜流動性という点における構造上の汎用性、また、ほとんどすべての薬物を封入することができるという点から、薬物送達系としてのリポソームの重要性は容易に理解されていた。しかしながら、リポソームが静脈内に注入されると、リポソームは単核食細胞系(MPS)によって異物粒子として認識され、肝臓、脾臓及び骨髄のような食細胞の多い器官へと循環系から容易に消失する。この作用を抑制するいくつかの可能性が明確にされてきた。例えばリポソームの粒子径を小さくしたり、リポソームの表面電荷を変更することである。また、もう一つは、リポソームの表面に特定の親水性ポリマー成分を導入してリポソームを表面修飾することに関する開発で、この親水性の基が粒子表面でのタンパク質の吸着をおさえるのである。その結果、こうしてできたリポソームはMPSの細胞による認識を免れ、総循環における滞留時間が長くなる。リポソームの表面修飾のよく知られた例として、脂質誘導体のリポソーム組成物を調製する際に親水性ポリマーのポリエチレングリコール(PEG)を結合させる例が挙げられる。通常、このポリマーは、疎水性部位で末端が改質されており、この疎水性部位はホスファチジルエタノールアミン誘導体又は長鎖脂肪酸の残基である。ポリエチレングリコール自体がかなり安定したポリマーであり、タンパク質粘着を阻止し、生理学的条件下では酵素による劣化又は加水分解による劣化を受けないポリマーである。血漿半減期を伸ばし食細胞が多い器官への集積を減らすという点に関して良好な結果が得られ、PEGで表面修飾されたリポソームの静脈内投与は様々な種類の動物、そして人間にも行われた(非特許文献1)(非特許文献2)(非特許文献3)。ドキシソルピシンを含有した上記のようなリポソーム製剤に対して市場の認可もでている。

【0003】

一方で、長期循環性リポソームにポリエチレングリコールポリマーを使用することによる短所にもいくつか直面することになった。PEGをグラフトしたリポソームは非生分解性であるため、大食細胞や皮膚に集積することが懸念される。PEGリポソームを二度目に注入すると、長期循環性が失われていること(迅速なクリアランス)がわかった(非特許文献4)。PEG-リポソームを患者に使用した最近の研究によると、PEG-リポソームが急性の副作用(顔面紅潮、胸部圧迫、息切れ、血圧の変化)を誘発する可能性があり、PEG-リポソーム処方の投与(注入)が終了するとすぐにそれらの副作用は消えることがわかった。最近のデータでは、副作用の誘発は補体活性のしわざであると指摘されている(非特許文献5)。今のところ、PEG-リポソームを基本とした市販の製剤は水性懸濁液製剤である。一般的なリポソーム水性懸濁液製剤やPEG-リポソームの貯蔵寿命はかなり限界があることはよく知られている。こうした製剤のビヒクル又は分散媒の取り除き方についての技術もいくつか知られており、例えば、噴霧乾燥、ダイアフィルトレーション、回転蒸発等、さらに好ましくは凍結乾燥が挙げられる。近年、テクネチウムキレート化剤ヒドラジノニコチンアミドを含ませPEG-リポソームの貯蔵寿命を改善して長くする凍結乾燥法が提案された(非特許文献6)。しかし、結果とこの技術のリポソーム製剤への適用性についてはさらに調査研究する必要がある。

【0004】

ポリエチレングリコールの使用には欠点があることから、それに代わるポリマーを探すことに研究者たちは駆りたてられた。リポソームに結合するために小胞形成脂質で誘導体化するのに適した候補として多くのポリマーが提案された（特許文献1参照）。親水性を有する水溶性ポリマーのポリビニルピロリドン、ポリアクリロイルモルフォリン、ポリ2-メチル-2-オキサゾリン、ポリ2-エチル-2-オキサゾリン、ポリアクリルアミド及びポリグリセロールは、静脈内投与後のリポソームの循環時間がある程度長くすることがわかった。しかしながら、そのような脂質ポリマー結合体は、既知の脂質-PEG-結合体にまさる利点がなかったということが主な理由で、今に至るまで市販の薬物製剤の分野に適用されなかった。そのため、脂質で誘導体化してリポソームのようなコロイド状担体組成物中に結合できるポリマーであって、長期循環性を有しさらにPEGよりも優位な点、たとえば生分解性を有するポリマーを見つける必要が依然としてある。 10

【0005】

【特許文献1】

EP-0688207

【非特許文献1】

Storm G., Belliot S.O., Daernen T., Lasic D.D.: Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system in Adv. Drug delivery Rev. 17, 31-48, (1995)

【非特許文献2】

Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C.: Long-circulating and target-specific nanoparticles; theory to practice in Pharmacol. Rev. 53, 283-318, (2001) 20

【非特許文献3】

Boerman O.C., Dams E.T., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M., Storm G.: Radiopharmaceuticals for scintigraphic imaging of infection and inflammation in Inflamm. Res. 50, 55-64, (2001)

【非特許文献4】

Dams E.T., Laverman P., Oijen W.J., Storm G., Scherphof G.L., Van der Meer J.W., Corstens F.H., Boerman O.C.: Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes in J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, 1071-1079, (2000) 30

【非特許文献5】

Szebeni J., Baranyi L., Savay S., Lutz H., Jelezarova E., Bunger R., Alving C.R.: The role of complement activation in hypersensitivity to Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in J. Liposome Res. 10, 467-481, (2000)

【非特許文献6】

Laverman P., van Bloois L., Boerman O.C., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M., Storm G.: Lyophilisation of Tc-99m-HYNIC labelled PEG-liposomes in J. Liposome Res. 10(2&3), page 117-129 (2000)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】 40

【0006】

コロイド状担体組成物であって、少なくとも1つの疎水性無極部位と親水性を有する極性ヘッド基からなる両親媒性脂質と、ポリマー又はそのモノマー前駆体とから得られる脂質-ポリマー結合体と、活性剤とを含むコロイド状担体組成物を提供するもので、ポリマーはポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸誘導体)又はポリ(アミノ酸類似化合物)である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本願明細書で使用する活性剤という用語は、治療上、生物学上、生理学上、予防上及び診断上活性な剤（有効な剤）であり、造影剤や放射活性標識化合物を含み、これらの活性剤は、所望の効果を有するに十分な量をコロイド状担体組成物中に含有させることができる 50

。これらの活性剤は人間と他の動物両方に有用なものである。治療上活性剤の例として、コルチコステロイド、抗腫瘍剤等が挙げられる。造影剤には酸素のような気体状態の化合物や<sup>3</sup>H - コレステルイルオレイルエーテルのような放射性標識賦形剤を含む。本発明によると、この活性剤は両親媒性脂質 - ポリマー - 結合体と化学的に結合していない。

本発明の組成物中の両親媒性脂質 - ポリマー - 結合体は、両親媒性脂質とポリマー又はそのモノマー前駆体から得られる。

本発明の脂質 - ポリマー結合体に使用される両親媒性脂質は、少なくとも1つの疎水性を有する無極のテールと親水性を有する極性ヘッド基からなる様々な合成又は天然の脂質から選択すればよく、小胞形成脂質や膜脂質がある。

脂質 - ポリマー結合体に使用される両親媒性脂質の重要な特色の一つは、脂質中、ポリマー鎖との共有結合に適した極性ヘッド基に官能基を含むということである。極性ヘッド基としては、例えば、第一又は第二アミン基、水酸基、アルデヒド基、ハロゲン化物又はカルボン酸基が挙げられる。脂質の疎水性部位によって、リポソームのような二分子膜構造中に脂質 - ポリマー結合体が包含されることが可能となり、疎水性部位はアンカーとして作用する。

両親媒性脂質の例として、リン脂質、糖脂質、セラミド、コレステロール及びその誘導体、飽和又は部分不飽和の分岐又は直鎖の炭素数8 ~ 50のモノ又はジアルキルアミン、アリールアルキルアミン、シクロアルキルアミン、アルカノール、アルデヒド、カルボハライド(carbohalide)又はアルカノイック酸(alkanocic acid)、及びこれらの無水物が挙げられる。

より具体的には、適切な両親媒性脂質の例として、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジイルノシトール、スフィンゴミエリン、ステアリルアミン、ミリスチルアルコール、コレステロール及びパルミチン酸が挙げられる。

脂質 - ポリマー - 結合体において推奨される両親媒性脂質とは、多くの場合はアルカリ鎖である2つの疎水性鎖と、前記に記載のとおり官能基を含む極性ヘッド基とを有する脂質である。ホスファチジルエタノールアミン誘導体、なかでもジステアリルホスファチジルエタノールアミンは、反応性アミノ基を有することから上記記載の推奨されるリン脂質である。

さらに推奨される両親媒性脂質としては、第一又は第二アミンを親水性極性ヘッド基として有し、さらに飽和又は不飽和の炭素数8 ~ 50の分岐又は直鎖の疎水性を有する2つの無極部位を有する。この例としては、1 - ヘプタデシルオクタデシルアミン並びにジステアリルアミンやN - スクシニルジオクタデシルアミン(DODASuc)のようなジステアリルアミン含有化合物が挙げられる。

#### 【0008】

本発明の脂質 - ポリマー - 結合体のポリマー部分は、ポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸誘導体)又はポリ(アミノ酸類似化合物)で形成されている。ポリ(アミノ酸誘導体)は、アミノ酸モノマーからなるポリマーで、1個以上の置換基が結合している。この例としては、ポリ(2 - ヒドロキシエチル) - L - グルタミンが挙げられる。本願明細書に開示されているポリ(アミノ酸類似化合物)とは、アミノ酸モノマーの炭素原子鎖長が短くなっているか、又は長くなっているポリマーを指す。その例として、ポリ(ホモセリン)やポリ(ペンタホモセリン)が挙げられる。

ポリマーは、ポリマー鎖全体を通して同じモノマーからなるホモポリマーである。また、ポリマー部分はポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸誘導体)及びポリ(アミノ酸類似化合物)からなる群から選択されるブロック共重合体で構成することも可能であるし、或いは1種以上のアミノ酸、アミノ酸誘導体及びアミノ酸類似化合物からなる群から選択される適切なモノマーを交互に並べたもの又は順番を制御して並べたもの、又はランダム重合したものでポリマー部分を形成することも可能である。ポリマーは直鎖でも分岐していてもよく、グラフトポリマーも含まれるが、直鎖が好ましい。

有用なアミノ酸としては、天然の - アミノ酸が挙げられる。しかし、非タンパク性又は天然でないアミノ酸と同様に - アミノ酸にも関心がもたれてきたようである。L体とD

10

20

30

40

50

体両方のアミノ酸及びその誘導体を使用することができる。脂質 - ポリマー - 結合体におけるポリマーのアミノ酸配列がL体アミノ酸の残基によって形成されると、できたポリマーは酵素劣化を受けやすい。一方、本発明の脂質 - ポリマー - 結合体におけるポリマーのアミノ酸配列がD体アミノ酸によって形成される場合は、できたポリマーはペプチド劣化酵素に対して安定した傾向がある。また、L体アミノ酸とD体アミノ酸の混合物も使用できる。コロイド状担体粒子の表面修飾に本発明の脂質 - ポリマー - 結合体を取り込まれるので、ポリマーの異なる特性を考慮すると、結合体調製用の出発物質にL体及び/又はD体を選択的に使用して表面修飾を調整することができる。

#### 【0009】

ポリ(アミノ酸)、ポリ(アミノ酸誘導体)及びポリ(アミノ酸類似化合物)は、本発明の脂質 - ポリマー - 結合体にとりこむのに適しているが、これらの重要な特性の一つは水に溶ける(100部の水に対して少なくとも1部、好ましくは30部の水に対して1部、最も好ましくは10部以下の水に対して1部)ということである。また、このポリマーは、水中におけるポリマーの - パラメーターによっても特徴づけることができる。このポリマーと溶媒の相互作用パラメーターは、例えば膜浸透圧法で求めることができる。本発明の脂質 - ポリマー - 結合体中において優位に使用することができるポリマーは、 - パラメーターが水中で0.65以下、好ましくは0.5以下である。

ポリマーのもう一つの重要な特徴は、pH値4~8の範囲(生理的範囲)内では荷電した基が実質的な量含まれないということである。中性アミノ酸モノマー又はアミノ酸類似モノマーをポリマー又はアミノ酸誘導体モノマーの調製に使用することが好ましく、これらは中性であるか中和しておいたものである。本発明のコロイド状担体組成物の長期循環性を阻害しないような低い割合であれば荷電した基を含ませることはできるようである。2 - ヒドロキシエチル - L - グルタミンと荷電したモノマーの共重合体について実証されているように、正帯電している基は負帯電している基よりもより高い割合で含有させることができる。

ポリマー作成に適したモノマーとしては、他にはアラニン、トレオニン、バリン、 - アミノアジピン酸、 - ジアミノ酪酸誘導体、オルニチン、グルタミンとグルタミン酸を含むグルタミン誘導体、アスパラギンとアスパラギン酸を含むアスパラギン誘導体、リジン誘導体、メチオニンとメチオニン誘導体、セリン及びその誘導体、さらにホモセリンやペンタホモセリンのようなCH<sub>2</sub>基を付加した類似化合物がある。側基として適しているのは、炭素数1~4のアルキル、ヒドロキシアルキル、ジヒドロキシアルキル、酸アミド、アリール基、又はこれらを組み合わせたものであるが、ポリマーの水溶性を保つことが前提である。これらの基の例としては、2 - ヒドロキシエチル、3 - ヒドロキシプロピル、4 - ヒドロキシブチル及び2, 3 - ジヒドロキシプロピルが挙げられる。使用できるポリマーには、例えば、ポリ(D, L - セリン)(PDLS)、ポリ(2 - ヒドロキシエチル) - D, L - グルタミン(PDLHEG)、ポリ(2 - ヒドロキシブチル) - L - グルタミン(PHBG)、及び1%のグルタミン酸を含むポリ(HEG - co - グルタミン酸)共重合体(PHEG1%GA)が挙げられる。好ましいポリマーとしては、ポリ(D, L - グルタミン)(PDLG)、ポリ(D, L - アスパラギン)(PDLA)、ポリ(ヒドロキシプロピル) - L - グルタミン(PHPG)、ポリ(2 - ヒドロキシプロピル) - L - グルタミン(P2HPG)、並びにベータアラニンと2 - ヒドロキシエチル - L - グルタミンの共重合体(PbAHEG)及び5%と1%のジメチルアミノエチル側基を含むポリ(HEG - co - ジメチルアミノエチル - グルタミン)共重合体(PHEG5%DG及びPHEG1%DG)が挙げられる。より好ましいポリマーは、ポリ - [N - (2 - ヒドロキシエチル) - L - グルタミン](PHEG)、ポリ(2 - ヒドロキシエチル) - L - アスパラギン(PHEA)、及びポリ(D, L - メチオニンスルホキシド)(PDLMS)といったホモポリマーである。

ポリマー鎖には、モノマーサブユニットが5~500、好ましくは20~100個含まれている。ポリマーの平均分子量は500~75000、好ましくは2000~15000である。平均分子量はこの分野で既知の様々な方法で評価することができる。本出願にお

10

20

30

40

50

ける実施例では、分子量の評価はNMRデータをもとに行った。

#### 【0010】

本発明の組成物に取り込まれる脂質 - ポリマー - 結合体を作成するには、重合や脂質との結合に先立って、アミノ酸モノマーの側鎖に含まれる反応性基を保護する製造方法が好ましくは採用されてきた。

脂質 - ポリマー - 結合体はこの分野で既知の方法に従って調製することができる。アミノ酸のポリマーを調製する方法として、任意に1種以上の保護基を有していてもよい対応のアミノ酸N - カルボキシ - 無水物 (NCA) を、炭素数1 ~ 4のアルキル第一アミンのような求核剤で開環重合を開始させる方法がよく知られている。脂質 - ポリマー - 結合体を得るためのもう一つの方法としては、開環NCA重合における開始剤として、例えばN - Boc - 1, 4 - ジアミノブタンのような保護官能基を有するアミンを使用する方法がある。このプロセスでは二つのステップ、即ち、官能基の脱保護のステップとその後の反応性基で脂質に結合させるステップが余計に必要ではあるが、この方法で調製した脂質 - ポリマー - 結合体も本発明のコロイド状担体組成物に組み込むのに適している。

両親媒性脂質が、炭素数8 ~ 50の分岐又は直鎖のモノ又はジアルキル、ジヒドロキシアルキル若しくはジアルキレンアミン、アルコール又はセラミドであるならば、それを開環重合のプロセスで開始剤として有利に使用することができる。これは、一つのステップで重合の最中に両親媒性脂質がポリマーに結合することを意味している。ポリアミノ酸の分子量は、溶媒又は溶媒の組み合わせ、使用する化学物質の純度、及び重合開始剤に対するモノマーの割合に著しく左右される。一般に、重合開始剤に対するモノマーの割合が高ければ高いほど、ポリマーの分子量は大きくなる。

所定の組成のポリマーを調製すべき時は、固相法によるペプチドの合成方法を用いることが好ましい。

#### 【0011】

ポリマーの繰り返し単位に存在する保護基は、2 - アミノエタノール、3 - アミノプロパノール又は2, 3 - ジヒドロキシプロピルアミンのようなアミノアルコールを使ってアミノ分解して取り除くことができる。

例えば、ステアリルアミン末端基が結合したPHEG (以後、PHEG - ステアリルアミンと呼ぶ) の調製は、以下のステップのみからなる。適当な溶媒中にステアリルアミンを添加して - ベンジル - L - グルタメート (BLG) のN - カルボキシ無水物を重合した後、得られたポリBLG - ステアリルアミンを2 - アミノエタノールで引き続きアミノ分解してPHEG - ステアリルアミンに変換した。2種類の異なる溶媒中でステアリルアミンを開始剤として使用することによって、異なる分子量を有する2種類のバッチのPBLG - ステアリルアミンが得られた。アミノ分解後、異なる2つの分子量を有する2種のPHEG - ステアリルアミンのバッチとして得られた。エチルアセテートとジクロロメタンで行った第1の重合では、分子量6000から9000のPHEG - ステアリルアミンが得られた。ジメチルホルムアミドでの第2の重合では分子量2000から3500のPHEG - ステアリルアミンが得られた。

本発明のコロイド状担体組成物には、リポソーム、ニオソームやリバース小胞のような二分子膜の小胞系、ミセル系、ナノカプセル、ナノスフェア等が含まれる。推奨されるコロイド状担体組成物は、二分子膜からなる小胞系である。

リポソームの調製にあたっては、リポソーム調製に通常使用される成分、例えば、小胞形成脂質、安定剤等と本発明の脂質 - ポリマー - 結合体を混合する。ポリマー - 脂質結合体を含有しない対応のリポソームに比べて、リポソームの血中循環時間を数倍延長するのに十分なモル濃度で結合体を含有させる。ポリマー結合体は、通常1 ~ 15モルパーセント、好ましくは3 ~ 10モルパーセント、最も好ましくは5 ~ 7.5モルパーセントの割合で含有する。

#### 【0012】

リポソームの平均粒径は、動的光散乱 (DLS) 法で求める場合、200nmより小さく、好ましくは150nmより小さく、100nm未満が最も好ましい。

10

20

30

40

50

このタイプのコロイド状担体粒子の平均粒径の下限は20nmである。

ポリマー-脂質-結合体は、帯電したリポソームに取り込まれるとゼータ電位を下げる性質を示したが、このようにしてポリマーのグラフト化によって表面電荷が遮蔽された。

本組成物にはいくつかの投与方法があるが、非経口的投与が好ましい。有効成分に応じて、また医学的適応又は治療すべき疾患に応じて、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔内注入、関節内注入等で投与することができる。

本発明のリポソーム製剤をラットに静脈内投与した結果、リポソームの血中循環時間を所望の目的に応じて変えることができることがわかってきた。血中循環時間は使用した脂質-ポリマー-結合体に左右されるが、特に脂質とポリマーの組み合わせの選択、ポリマーの分子量及びグラフト密度に左右される。例えば、脂質-PHEG-結合体、脂質-PHEA-結合体及び脂質-PDLMs-結合体は、両親媒性脂質が2つの疎水性テールを有する(PHEG-ジアミノブタンDODASuc、PHEA-DODASuc及びPDLMs-DODASuc)が、これらについては、対応のPEG-グラフトリポソームで得た結果と同様の結果が見られた。

10

本発明による脂質-ポリマー-結合体で調製したリポソーム製剤の安定性は、従来のリポソーム製剤の安定性に比べておおむね向上する。それにくわえて、脂質-ポリマー-結合体を適切に選ぶことによってリポソーム製剤の安定性はさらに向上する。この選択は活性剤の選択にも依存することがわかるであろう。例えば、コルチコステロイド自体ではなくコルチコステロイドの水溶性誘導体をリポソーム製剤に封入すれば、リポソーム製剤の安定性が向上するという結果となる。リン酸ブレドニゾロンをポリヒドロキシエチルアスパラギン-DODASuc-結合体含有リポソームに封入した場合、ポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミン-ジアミノブタンDODASuc-結合体含有リポソームに封入した場合に比べてわずかながら良い結果が得た。噴霧乾燥、凍結乾燥、回転蒸発等のこの分野で既知の方法によって、リポソーム組成物から水性ビヒクルを取り除き、安定性をさらに向上させることができる。

20

#### 【0013】

脂質-ポリマー-結合体が本発明のコロイド状担体組成物に組み込まれると、この組成物に長期循環性(long-circulating properties)が付与される。このコロイド状担体組成物が、脂質-ポリマー-結合体を含むような組成物に比べて血中循環時間が増加しているのは、長期循環性によると理解すべきである。長期循環性については、この分野で既知の方法によって求めることができる(Torchilin VP, Shtilman MI, Trubetskoy VS, Whiteman K, Milstein AM.: Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. Biochimica et Biophysica Acta (1994) 1195: 181-184; Torchilin VP, Trubetskoy VS, Whiteman KR, Caliceti P, Ferruti P, Veronesi FM.: New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo. Journal of pharmaceutical sciences (1995) 84 (9): 1049-1053)。リポソームに関しては、ある方法を実施例に記載した。このように、上記の組成物、とりわけ小胞系組成物は様々な用途に利用することができる。循環薬物レザバー(reservoir)として以外に、上記の組成物は受動的に標的疾患部位(腫瘍、感染、炎症)に送達するためにも、また、例えばモノクローン抗体のようなホーミングデバイス(homing devices)に結合させて能動的に血流中の細胞や内皮(例えば脈管形成にかかわるレセプター)という標的に送達するためにも使うことができる。人工的酸素供給システム、血液プール像、カテーテルや血管系プロテーシスのような生体材料用の防汚塗料も、さらなる用途となろう。

30

40

さらに、脂質-ポリマー-結合体は生分解性を有し、とりわけ人間の細胞にも動物体内の細胞にも集積する危険がないという事実があることから多くの利点がある。

また、脂質-ポリマー-結合体は、PEG-リポソームと比べて脂質の分量への依存性が低くなっていることがわかった。

さらに付け加えると、これが非常に重要な利点なのであるが、本発明の組成物を二度目に注入した後のクリアランスの増大は必ずしも見られるわけではなく、血中循環時間の短縮はほどほどである。これは、PEGで被覆したコロイド状担体組成物に比べると重大な利

50

点を意味するといえよう。

【0014】

本発明のコロイド状担体組成物は、治療、診断、予防等において様々な可能性を提供するものである。脂質 - ポリマー - 結合体には多様性があるので、その成分は目的に応じて選択することができ、また、選択範囲となる種々のコロイド状担体システムには多様性があるので、一般に、すべての活性剤は適切なコロイド状担体組成物を構成することが可能となろうことは容易に明らかであろう。本発明の組成物を静脈内投与した後の最初の事例において、血中循環時間には何ら影響がないか若しくはほんのわずかな影響しか見られないのであれば、基準となるセットに応じて循環時間を延ばすために、脂質 - ポリマー - 結合体の多数の様々なパラメーター（例えば、分子量、ドラフト密度、ポリマー、脂質等）やコロイド状担体組成物の多数の様々なパラメーターを変えることは、この分野の当業者であれば可能である。本発明の組成物が、水溶性コルチコステロイドを活性剤として含む際に、非常に興味深い結果が見られる。この組成物を一回のみ生体内実験の関節炎モデルにおいて静脈内注入したところ、封入していないコルチコステロイド化合物を繰り返し注入した場合、又は従来のリポソームに封入したときと同じくらい効果があることがわかった。興味深い水溶性コルチコステロイドとは、リン酸ブデゾニド並びにフルニソリド及びプロピオン酸フルチカゾンの水溶性誘導体である。関節炎による症状の全面的な小康状態が長く続くという好ましい効果があり、一方、コルチコステロイドを主とした治療による副作用は抑えられる。これは、投与すべきコルチコステロイドの量を抑えられることと、またコルチコステロイドは通常血液からの迅速なクリアランスを示すものであるが、今回はそれを使用することができたという理由からである。また、他の疾病においてコルチコステロイドが薬剤として選択される場合又は共同の治療薬として使用される場合、本発明の組成物の有益な効果が容易に認識できるであろう。他の活性剤も、本発明の組成物において興味深い効果を示している。

10

20

【0015】

前述の発明を明確化し理解できるようにするために図示と実施例によって詳細に記載したが、この分野の当業者であれば本発明の教示することを鑑み、添付のクレームから逸脱することなく変更したり修正することができるであろうことは容易に明らかとなろう。

以下の実施例によって、本発明をさらに説明する。

（実施例1）

30

ステアリルアミン末端基を有するポリ - ( - ベンジル - L - グルタメート ) ( P B L G - ステアリルアミン )

1.1 - ベンジル - L - グルタミン酸 N - カルボキシ無水物

以下に示すように、市販の - ベンジル - L - グルタミン酸を、William D. Fuller et al, (Biopolymers 1976, 15(9), 1869-71)に記載されている方法でN - カルボキシ無水物に変換した。

7.0 g (29.5 mmol) の - ベンジルグルタミン酸を70 mlの乾燥テトラヒドロフランに懸濁させ、ホスゲンの20%トルエン溶液22.4 mlを直ちに加えた。窒素雰囲気下65 で90分間攪拌した後、溶液を室温まで冷却し、引き続き150 mlの石油エーテル(40/60)に添加した。その後、混合物を一晩フリーザーに入れた。白色の結晶性生成物を濾取し石油エーテル(40/60)で洗浄した。乾燥後、生成物をテトラヒドロフランと石油エーテル(40/60)で二回再結晶させた。

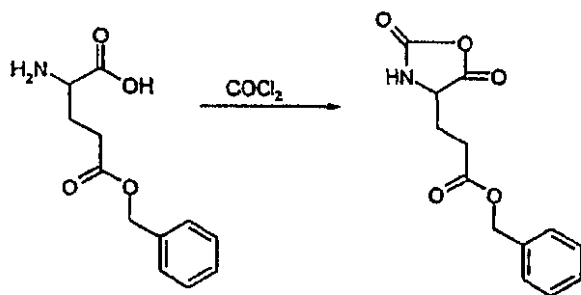
40

収量：6.0 g (77%)、融点：95 - 97

反応：

【0016】

【化1】



【 0 0 1 7 】

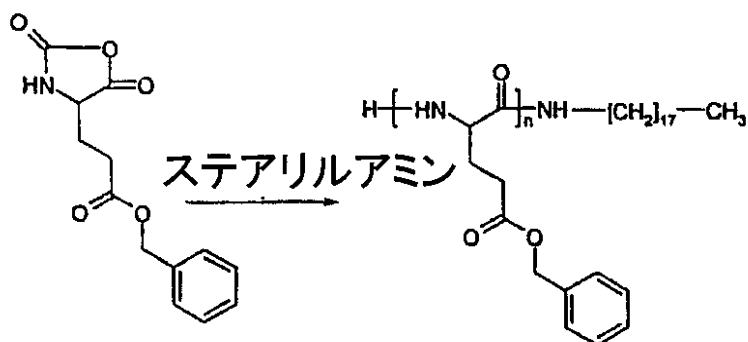
10

## 1.2 ( P B L G - ステアリルアミン )

2 種類の異なる溶媒中で開始剤として第一アミンであるステアリルアミンを使うことによって、異なる分子量を有する P B L G - ステアリルアミンの 2 つのバッチを合成した。

【 0 0 1 8 】

【 化 2 】



20

【 0 0 1 9 】

溶媒エチルアセテート / ジクロロメタンの例

500 mg ( 1.9 mmol ) の  $\alpha$ -ベンジル-L-グルタメート N-カルボキシ無水物を、0.5 ml の乾燥エチルアセテートと 3 ml の乾燥ジクロロメタンの混合物に溶解させた。その後、ステアリルアミン 0.37 モル濃度 ( 0.095 mmol ) のジクロロメタン溶液 0.255 ml を添加した。フラスコに塩化カルシウム管を取り付け、混合物を窒素雰囲気下室温で 24 時間攪拌した。その後、混合物をメタノールに滴下し、析出したポリマーを濾取し真空中で乾燥させた。

30

【 0 0 2 0 】

収量：376 mg、P B L G - ステアリルアミン

$^1\text{H-NMR}$  (  $\text{CDCl}_3$  ) 分析によりステアリルが生成物中に存在することがわかった。 $\text{CH}_3$ シグナル：0.9(t)、 $\text{CH}_2$ シグナル：1.3-1.2、その他の NMR の結果：7.4-7.2 (  $\text{C}_6\text{H}_5$  ), 5.0 (  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  ), 4.1-3.8 (  $\text{-CH-}$  ), 2.7-1.8 (  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  )

Maldi TOF ms :

$m/z$  2045 (  $n=8$  ), 2263 (  $n=9$  ), 2482 (  $n=10$  )、ステアリルアミン ( 269 Da ) 基が結合したナトリウム付加物 ( 23 Da ) の質量に相当。(ベンジルグルタミン酸繰り返し単位の質量：  $n \times 219 \text{ Da}$  )

40

$m/z$  1499 (  $n=5$  ), 1719 (  $n=6$  ), 1938 (  $n=7$  ), 2156 (  $n=8$  ), 2375 (  $n=9$  ), 2594 (  $n=10$  )

結合したステアリルアミン基と環状ペプチド末端基 ( 112 Da ) のナトリウム付加物の質量に相当。

【 0 0 2 1 】

溶媒ジメチルホルムアミドの例

4 ml の乾燥ジメチルホルムアミド中の 500 mg ( 1.9 mmol ) の  $\alpha$ -ベンジル-L-グルタメート N-カルボキシ無水物に、ステアリルアミン 0.37 モル濃度 ( 0.095 mmol ) のジクロロメタン溶液 0.255 ml を添加した。フラスコに塩化カルシウム管

50

を取り付け、混合物を窒素雰囲気下室温で24時間攪拌した。その後、混合物をメタノールに滴下し、析出したポリマーを濾取し真空中で乾燥させた。

収量：272 mg、PBLG-ステアリルアミン

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) のスペクトルは前述のものとはほぼ同じであった。ステアリルのシグナルも生成物中に存在した。 $\text{CH}_3$ シグナル：0.9 (t)、 $\text{CH}_2$ シグナル：1.3-1.2  
Maldi TOF ms:

$m/z$  1826 ( $n=7$ ), 2045 ( $n=8$ ), 2263 ( $n=9$ )、ステアリルアミン基を有するナトリウム付加物の質量に相当。

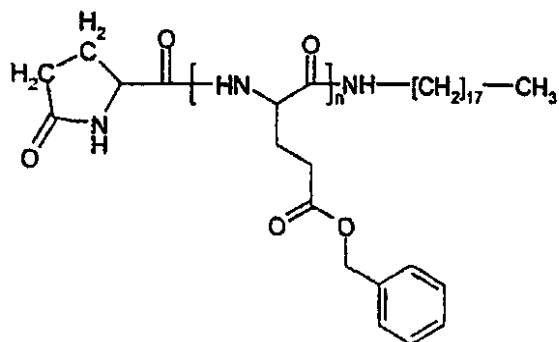
$m/z$  1719 ( $n=6$ ), 1938 ( $n=7$ ), 2156 ( $n=8$ ), 2375 ( $n=9$ ), 2594 ( $n=10$ )、ステアリルアミン基と環状ペプチド末端基を有するナトリウム付加物の質量に相当。

10

環状ペプチド末端基を有するPBLG-ステアリルアミンの構造:

【0022】

【化3】



20

【0023】

(実施例2)

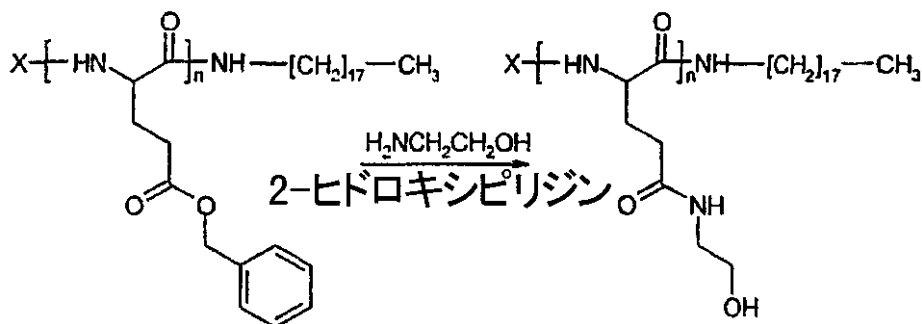
ステアリルアミン末端基を有する分子量が6000~9000のポリ-[N-(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミン](PEG-ステアリルアミン)

以下の反応に従って、2-アミノエタノールと2-ヒドロキシピリジン(2-HP)を使ってPBLG-ステアリルアミンをアミノ分解してPEG-ステアリルアミンを合成した(文献:A. de Marre et al, Polymer 1994, 35(11), 2443-2446)。(X = 水素又は環状ペプチド)

30

【0024】

【化4】



40

【0025】

実施例1の(溶媒エチルアセート/ジクロロメタン)に記載した方法で調製した287 mg (1.3 mmol)のPBLG-ステアリルアミンと25 mgの2-HPとを3.8 mlのジメチルホルムアミドに溶解させ、1.63 mlの2-アミノエタノールを加えた。窒素雰囲気下40℃で24時間攪拌した後、溶液をエーテルとエタノールとの混合物(4:1)に加えた。生成物を濾取し、真空中で乾燥させた。収量: 152 mg

最後に、ポリペプチドを水に溶解し、透析チューブMWCO2000で4日間透析により

50

精製した。

【0026】

収量：80mg

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) : 4.2-4.1 ( -CH ), 3.6-3.4 (  $\text{CH}_2\text{OH}$  ), 3.2-3.1 (  $\text{CH}_2\text{NH}$  ), 2.3-2.1 (  $\text{CH}_2$  ), 2.0-1.8 (  $\text{CH}_2$  ), 1.2-1.0 ( 16  $\text{CH}_2$  ステアリルアミン ), 0.8-0.6 (  $\text{CH}_3$  ステアリルアミン )

NMRスペクトルにおけるステアリルのシグナルの強度から分子量6000~9000と算出された。

Mal di TOF ms :

ヒドロキシエチルグルタミン酸繰り返し単位の質量 :  $n \times 172$

$m/z$  920 ( $n=3$ ), 1092 ( $n=4$ ), 1436 ( $n=6$ ), 1608 ( $n=7$ ), 1780 ( $n=8$ ), 1953 ( $n=9$ ), 2124 ( $n=10$ )、ステアリルアミン ( 269 Da ) 基と環状ペプチド ( 112 Da ) 末端基を有するナトリウム付加物の質量に相当。

$m/z$  1108 ( $n=4$ ), 1452 ( $n=6$ )、ステアリルアミン ( 269 Da ) 基と環状ペプチド ( 112 Da ) 末端基のカリウム付加物 ( 39 Da ) の質量に相当。

【0027】

(実施例3)

ステアリルアミン末端基を有し分子量が2000~3500のポリ - [ N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - L - グルタミン ] ( PHEG - ステアリルアミン )

実施例2に記載したのと同様なアミノ分解を施すことによって、実施例1に記載した方法 ( 溶媒はジメチルホルムアミド ) で調製された209mgのPBLG - ステアリルアミンから49mgのPHEG - ステアリルアミンが得られた。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) : 実施例2で調製したPHEG - ステアリルアミンと同様であったが、ステアリルのシグナルの強度が実施例3の方が幾分高かった。

NMRスペクトルにおけるステアリルのシグナルの強度から、分子量2000~3500と算出された。

Mal di TOF ms :

$m/z$  1092 ( $n=4$ ), 1264 ( $n=5$ ), 1436 ( $n=6$ ), 1608 ( $n=7$ ), 1780 ( $n=8$ ), 1953 ( $n=9$ ), 2125 ( $n=10$ )、ステアリルアミン ( 269 Da ) 基と環状ペプチド ( 112 Da ) 末端基を有するナトリウム付加物の質量に相当。

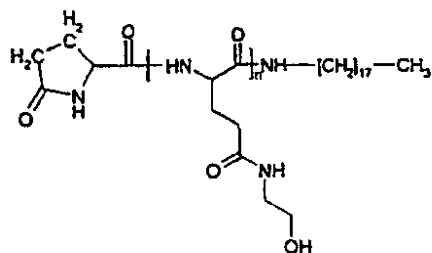
$m/z$  1108 ( $n=4$ ), 1280 ( $n=5$ ), 1452 ( $n=6$ ), 1624 ( $n=7$ ), 1796 ( $n=8$ ), 1969 ( $n=9$ ), 2141 ( $n=10$ )、ステアリルアミン ( 269 Da ) 基と環状ペプチド ( 112 Da ) 末端基を有するカリウム付加物の質量に相当。

Mal di TOF - ms と NMR の結果から、以下の構造が示唆された。

PHEG - ステアリルアミンの構造 :

【0028】

【化5】



【0029】

(実施例4)

ヘプタデシルオクタデシルアミン末端基を有するポリ ( - ベンジル - L - グルタメート ) ( PBLG - ヘプタデシルオクタデシルアミン )

0.94g ( 3.6 mmol ) の - ベンジル - L - グルタメート N - カルボキシ無水物 ( 50

NCA)を、窒素雰囲気下5mlの乾燥DMFに溶解させた。25mg(0.05mmol)の1-ヘプタデシルオクタデシルアミン(Sigma Aldrich社)を1mlの乾燥クロロホルムに溶解させた溶液を直ちに添加した。ほぼ即座に、気泡(二酸化炭素)が形成された。溶液を室温で1日攪拌し、10~20倍の過剰の水に析出させた。白色の析出物を回収し真空内で乾燥させた。収量:0.75g

特性:

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (溶媒のピークを基準としたppmの):

グルタミン酸ベンジル: 7.2 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.0 (ベンジル $\text{CH}_2$ ), 3.9 ( $-\text{CH}$ ), 2.8及び2.2 (及び $\text{CH}_2$ )

アルキル鎖: 1.2 ( $\text{CH}_2$ アルキル鎖), 0.85 ( $\text{CH}_3$ )

10

【0030】

(実施例5)

ヘプタデシルオクタデシルアミン末端基を有するポリ[N-(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミン](PHEG-ヘプタデシルオクタデシルアミン)

5mlの乾燥DMFに0.60gのPBLG-ヘプタデシルオクタデシルアミン(上記参照)を溶解した溶液に、0.15gの2-ヒドロキシピリジンと0.8mlのエタノールアミンを加えた。この溶液を窒素雰囲気下室温で3日間攪拌し、10~20倍の過剰のジエチルエーテルに析出させた。生成物を回収し真空内で乾燥させた。水溶性のポリマー生成物をセルロースエステル透析チューブ(MWCO500)の中で水に対して透析を2日間行った。凍結乾燥後、ヘプタデシルオクタデシル末端基を有する精製PHEGを得た。

20

収量:0.30g

特性:

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ) (溶媒のピークを基準としたppmの):

ヒドロキシエチルグルタミン: 4.1 ( $-\text{CH}$ ), 2.2及び1.8-1.9 (及び $\text{CH}_2$ ), 3.4 ( $\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 3.1 ( $\text{CH}_2-\text{NH}_2$ )

アルキル鎖: 1.2 ( $\text{CH}_2$ アルキル鎖), 0.8 ( $\text{CH}_3$ )

ステアリルのシグナルと $-\text{CH}$ シグナルの積分値の比からPHEGの分子量は12,000と算定された。

【0031】

(実施例6)

開始剤としてのN-Boc-1,4-ジアミノブタンを介して導入されたジステアリルアミン末端基を有するポリ-[N-(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミン](PHEG-ジアミノブタン-DODASuc)

2.5g(9.5mmol)の $-\text{ベンジル-L-グルタメート}$  N-カルボキシ無水物を2.5mlの乾燥エチルアセテートと12.5mlの乾燥ジクロロメタンの混合物に溶解させた。N-Boc-1,4-ジアミノブタン1モル濃度のジクロロメタン溶液0.95ml(0.95mmol)を開始剤として添加した。混合物を窒素雰囲気下室温で3日間攪拌し、その後メタノールに析出させた。収量:1.48g、PBLG-N-Boc-ジアミノブタン

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) スペクトルによると、N-Boc-1,4-ジアミノブタンシグナルが1.4-1.3にあることがわかった。

40

Malldi TOF ms:

ベンジルグルタミン酸繰り返し単位の質量:  $n \times 219$

$m/z$  1471 ( $n=5$ ), 1636 ( $n=6$ ), 1855 ( $n=7$ ), 2074 ( $n=8$ )、N-Boc-1,4-ジアミノブタン(187Da)基と環状ペプチド末端基(112Da)を有するナトリウム付加物の質量に相当。

$m/z$  1433( $n=5$ ), 1652 ( $n=6$ ), 1872 ( $n=7$ )、N-Boc-1,4-ジアミノブタン(187Da)基と環状ペプチド末端基(112Da)を有するカリウム付加物の質量に相当。

【0032】

50

P B L G - N - B o c - ジアミノブタンの脱保護 :

738 mg の P B L G - N - B o c - ジアミノブタンを 5 ml の 4 N 塩酸のジオキサン溶液中で 3.5 時間攪拌した。その後、反応混合物をロータリーエバポレーター (Rotavap) で溶媒を蒸発させた。残渣を 5 ml のテトラヒドロフランに溶解し、80 ml の NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (6.5 g を水に溶かす) に滴下した。生成物を濾取して水で洗浄した後、真空中で乾燥させた。収量 : 677 mg、P B L G - ジアミノブタン

<sup>1</sup>H - NMR (CDCl<sub>3</sub>) により、保護基が首尾よく除去されたことがわかった。

Maldi TOF の質量分析により、所望のモル質量 (molmasses) であることがわかった。

ベンジルグルタミン酸繰り返し単位の質量 :  $n \times 219$

$m/z$  1318 ( $n=5$ ), 1537 ( $n=6$ ), 1756 ( $n=7$ ), 1976 ( $n=8$ )、1, 4 - ジアミノブタン (87 Da) 基と環状ペプチド末端基 (112 Da) を有するナトリウム付加物の質量に相当。

【0033】

D O D A S u c との結合 :

62 mg (0.1 mmol) の N - スクシニル - ジオクタデシルアミン (D O D A S u c、Schmitt et al, J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 19, 8485-8491) と、13.7 mg (0.12 mmol) の N - ヒドロキシスクシンイミドと、0.66 mg のジメチルアミノピリジン (DMAPI) とを 2 ml のジクロロメタンに溶解させた。0℃まで冷却した後、24.6 mg (0.12 mmol) の N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を加えた。溶液を 0℃で 1 時間、さらに室温で一晩攪拌した。その後、不溶分のジシクロヘキシル尿素を濾過により除去し、200 mg の P B L G - ジアミノブタンを含む 3 ml のジクロロメタン溶液と 14  $\mu$ l のトリエチルアミンに、濾液を添加した。室温で一晩攪拌した後、溶液をメタノールに滴下し、濾別して乾燥させた。収量 : 135 mg。<sup>1</sup>H - NMR (CDCl<sub>3</sub>) のスペクトルによると、ジステアリルが存在した。CH<sub>2</sub>シグナル : 1.4-1.2、CH<sub>3</sub>シグナル : 0.9-0.8

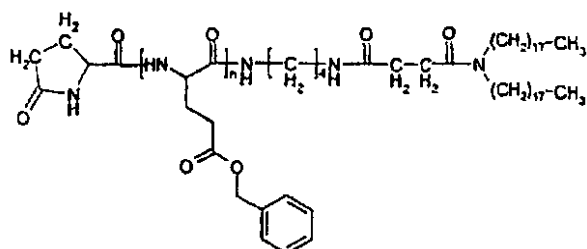
Maldi TOF 質量分析で、D O D A S u c が P B L G - ジアミノブタンに結合していることを示す所望のモル質量が明らかになった。

$m/z$  1922 ( $n=5$ ), 2141 ( $n=6$ ), 2360 ( $n=7$ ), 2580 ( $n=8$ ), 2799 ( $n=9$ ), 3018 ( $n=10$ )、環状ペプチド末端基 (112 Da) を有する P B L G - ジアミノブタン - D O D A S u c のナトリウム付加物の質量に相当。

構造 :

【0034】

【化6】



【0035】

アミノ分解 :

120 mg の P B L G - ジアミノブタン D O D A S u c と 10.8 mg の 2 - H P を 1.3 ml のジメチルホルムアミドに溶解して、0.68 ml の 2 - アミノエタノールを添加した。窒素雰囲気下 40℃で 24 時間攪拌した後、溶液をクロロホルムに滴下した。生成物を濾取し真空中で乾燥させた。収量 : 83 mg、P H E G - ジアミノブタン - D O D A S u c

<sup>1</sup>H - NMR (DMSO) によると、ジステアリルのシグナルが 1.2-1.4 (CH<sub>2</sub>) と 0.9-0.8 (CH<sub>3</sub>) であることがわかった。

10

20

30

40

50

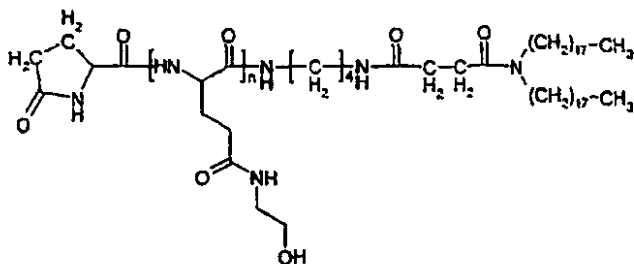
.8-0.9 (C H<sub>3</sub>) に見られた。

ステアリルのシグナルと - C Hシグナルの積分値の比から P H E G の分子量は 4 0 0 0 と算定された。

構造：

【 0 0 3 6 】

【 化 7 】



10

【 0 0 3 7 】

( 実施例 7 )

開始剤としてのジステアリルアミンを介して導入されたアミン末端基を有するポリ - [ N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - L - グルタミン ] ( P H E G - ジステアリルアミン )

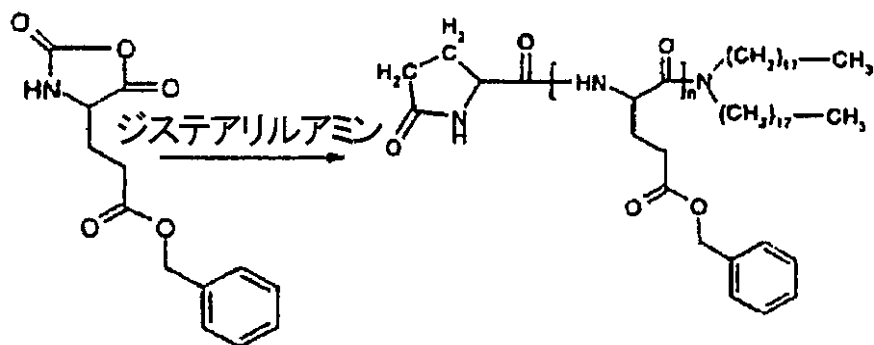
1 . 0 g ( 3 . 8 mmol ) の - ベンジル - L - グルタメート N - カルボキシ無水物を 1 m l の乾燥エチルアセテートと 5 m l の乾燥クロロホルムの混合物に溶解させた。その後、1 6 3 m g のジステアリルアミンを 3 . 2 6 m l のクロロホルムに溶解した溶液 2 m l ( 0 . 1 9 mmol ) を添加した。フラスコに塩化カルシウム管を取り付け、混合物を窒素雰囲気下室温で 4 日間攪拌した。混合物をメタノールに滴下し、ポリマーを濾過して単離し、真空中で乾燥させた。収量：7 5 7 m g、P B L G - ジステアリルアミン

20

反応：

【 0 0 3 8 】

【 化 8 】



30

【 0 0 3 9 】

<sup>1</sup> H - N M R ( C D C l<sub>3</sub> ) の分析によると、生成物中にジステアリルのシグナルが示された。C H<sub>3</sub>シグナル： 0.9(t), C H<sub>2</sub>シグナル： 1.3-1.2

40

M a l d i T O F m s :

ベンジルグルタミン酸繰り返し単位の質量：n x 2 1 9

m / z 1971 (n=6), 2190 (n=7), 2410 (n=8), 2629 (n=9), 2848 (n=10)、ジステアリルアミン ( 5 2 1 D a ) 基と環状ペプチド末端基 ( 1 1 2 D a ) を有するナトリウム付加物の質量に相当。

m / z 2206 (n=7), 2427 (n=8)、ジステアリルアミン ( 5 2 1 D a ) 基と環状ペプチド末端基 ( 1 1 2 D a ) を有するカリウム付加物の質量に相当。

【 0 0 4 0 】

アミノ分解：

50

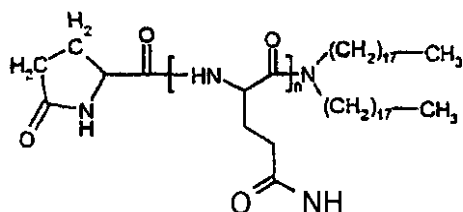
アミノエーテルと2-ヒドロキシピリジンを触媒として用いて、上記で調製したPBLG-ジステアリルアミン(600mg)のアミノ分解をジメチルホルムアミド中で行ったところ、430mgのPHEG-ジステアリルアミンを得た。

$^1\text{H}$ -NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)でジステアリルアミンのシグナルが検出された。

構造：

【0041】

【化9】



10

【0042】

(実施例8)

ジアミノブタンDODASuc末端基を有するポリ-[N-(ヒドロキシアルキル)-L-グルタミン]

PBLG-ジアミノブタンBOC：

3gのベンジル-L-グルタメートN-カルボキシ無水物(NCA)を8mlの乾燥DMFに溶解した溶液に、0.1gのN-BOC-1,4-ジアミノブタンを1mlのクロロホルムに溶解した溶液を加えた。最初の数時間、気体(二酸化炭素)の発生が認められた。この溶液を窒素雰囲気下室温で1日攪拌した。およそ100mlのメタノールに析出させた後、ポリマーを濾取して乾燥させたところ、BOC-保護アミノ基を含むPBLGを2g得た。

20

$^1\text{H}$ -NMR(CDCl<sub>3</sub>)(溶媒のピークを基準とした)：

BOC：1.4(CH<sub>3</sub>)

PBLG：2.2及び2.6(及び-CH<sub>2</sub>)，4.0(-CH)，5.0(ベンジルCH<sub>2</sub>)，7.3(フェニル)

【0043】

30

PBLG-ジアミノブタン(保護BOC基の除去)：

5mlの4N塩酸/ジオキサランに1.1gのPBLG-ジアミノブタンBOCを溶解した溶液を3~4時間攪拌し、その後およそ80mlのNaHCO<sub>3</sub>溶液(水に6.5g溶解)に滴下した。生成物を濾取し、水で洗浄し真空中で乾燥させた。収量：1g、PBLG-ジアミノブタン

$^1\text{H}$ -NMR(CDCl<sub>3</sub>)(溶媒のピークを基準とした)：

PBLG：2.2及び2.6(及び-CH<sub>2</sub>)，4.0(-CH)，5.0(ベンジルCH<sub>2</sub>)，7.3(フェニル)

BOCシグナル：なし

【0044】

40

PBLG-ジアミノブタンDODASuc(DCC結合)：

170mgのN-スクシニル-ジオクタデシルアミン(DODASuc)と、90mgのDCCと、10mgの4-(ジメチルアミノ)ピリジニウム4-トルエンスルホナート(DPTS)とを4mlのジクロロメタンに溶解した。溶液を室温で1時間攪拌した。0.73gのPBLG-ジアミノブタンと40μlのトリエチルアミンを3mlのクロロホルムに溶解した溶液を添加した。室温で一晩攪拌した後、溶液(ジシクロヘキシル尿素析出分を含む)を過剰なメタノール(およそ100ml)に滴下した。ポリマー生成物を濾取し乾燥させた。収量：0.5g

$^1\text{H}$ -NMR(CDCl<sub>3</sub>)(溶媒のピークを基準とした)：

ジステアリルシグナル：0.8-0.9(CH<sub>3</sub>)，1.2-1.4(メチレンプロトン)

50

P B L G : 2.2及び2.6 ( 及び - C H <sub>2</sub> ) , 4.0 ( - C H ) , 5.0 ( ベンジル C H <sub>2</sub> ) , 7.3 ( フェニル )

#### 【 0 0 4 5 】

##### 8.1 P H E G - ジアミノブタン D O D A S u c

以下のようにして、P B L G - ジアミノブタン D O D A S u c をエタノールアミンでアミノ分解することによってP H E G - ジアミノブタン D O D A S u c を得た。

0 . 5 g の P B L G - ジアミノブタン D O D A S u c と 1 5 m g の 2 - ヒドロキシピリジンを 4 m l の D M F に溶解した。さらに 2 m l のエタノールアミンを加えた。窒素雰囲気下 4 0 で 2 4 時間攪拌した後、溶液をおよそ 1 0 0 m l のジエチルエーテルに析出させた。P H E G - ジアミノブタン D O D A S u c を水に溶解し、透析を行って ( M W C O 5 0 0 ) 凍結乾燥させたところ、精製された P H E G - ジアミノブタン D O D A S u c 結合体を 0 . 3 5 g 得た。

<sup>1</sup> H - N M R ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ジステアリルのシグナル : 0.8-0.85 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2-1.5 ( メチレンプロトン )

P H E G : 1.7-2.2 ( 及び - C H <sub>2</sub> ) , 3.1及び3.3 ( ヒドロキシエチル ) , 4.2 ( - C H ) , 4.7 ( O H ) , 7.8及び8.2 ( N H )

ジステアリルのシグナルと - C H シグナルの積分値の比から P H E G の分子量はおおよそ 4 0 0 0 と算出された。

M a l d i - T O F により、P H E G - ジアミノブタン D O D A S u c 結合体の分子構造が確認されている。

N a <sup>+</sup> 付加物 : 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 ) 等

#### 【 0 0 4 6 】

##### 8.2 ポリ - [ ( 2 - ヒドロキシプロピル ) - L - グルタミン ] ジアミノブタン D O D A S u c

以下のようにして、P B L G - ジアミノブタン D O D A S u c を 2 - プロパノールアミン ( イソプロパノールアミン ) でアミノ分解することによってポリ - [ ( 2 - ヒドロキシプロピル ) - L - グルタミン ] ジアミノブタン D O D A S u c を得た。

0 . 1 5 g の P B L G - ジアミノブタン D O D A S u c と 0 . 0 5 g の 2 - ヒドロキシピリジンを 4 m l の D M F に溶解した。さらに 1 m l の 2 - プロパノールアミンを添加した。窒素雰囲気下 4 0 で 2 4 時間攪拌した後、溶液をおよそ 1 0 0 m l のジエチルエーテルに析出させた。乾燥後、0 . 1 g の P H i s o P G - ジアミノブタン D O D A S u c を得た。ポリマーを水に溶解し、透析を行って ( M W C O 5 0 0 ) 、凍結乾燥させたところ、精製されたポリ - [ ( 2 - ヒドロキシプロピル ) - L - グルタミン ] ジアミノブタン D O D A S u c を得た。

<sup>1</sup> H - N M R ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ジステアリルのシグナル : 0.8-0.85 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2-1.5 ( メチレンプロトン )

P H P G : 1.7-2.2 ( 及び - C H <sub>2</sub> ) , 1.0 ( C H <sub>3</sub> ) , 3.0 , 3.3及び3.7 ( ヒドロキシプロピル ) , 4.2 ( - C H ) , 4.7 ( O H ) , 7.8及び8.2 ( N H )

測定分子量 : 約 4 0 0 0

#### 【 0 0 4 7 】

##### 8.3 ポリ - [ ( 3 - ヒドロキシプロピル ) - L - グルタミン ] ジアミノブタン D O D A S u c

P B L G - ジアミノブタン D O D A S u c を 3 - プロパノールアミンでアミノ分解することによってポリ - [ ( 3 - ヒドロキシプロピル ) - L - グルタミン ] ジアミノブタン D O D A S u c を得た。

0 . 3 g の P B L G - ジアミノブタン D O D A S u c と 0 . 1 g の 2 - ヒドロキシピリジンを 4 m l の D M F に溶解した。さらに 2 m l の 3 - プロパノールアミンを加えた。窒素雰囲気下 4 0 で 2 4 時間攪拌した後、溶液をおよそ 1 0 0 m l のジエチルエーテルに析

10

20

30

40

50

出させた。乾燥後、0.25 gのPHPG5000-ジアミノブタンDODASucを得た。ポリマーを水に溶解し、透析を行って(MWCO500)、凍結乾燥させたところ、精製されたポリ-[(3-ヒドロキシプロピル)-L-グルタミン]ジアミノブタンDODASucを得た。

$^1\text{H}$ -NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)(溶媒のピークを基準とした)：

ジステアリルのシグナル：0.8-0.85(CH<sub>3</sub>)，1.2-1.5(メチレンプロトン)

PHPG：1.7-2.2(及び-CH<sub>2</sub>)，1.5，3.1及び3.3(ヒドロキシプロピル)，4.2(-CH)，4.6(OH)，7.8及び8.2(NH)

分子量：約5000

Malldi TOF：

Na<sup>+</sup>付加物：m/z 3623 (n=15)，3810 (n=16)，3996 (n=17)，4182 (n=18)，4368 (n=19)，4555 (n=20)等

10

【0048】

#### 8.4 ポリ-[(4-ヒドロキシブチル)-L-グルタミン]ジアミノブタンDODASuc

PBLG-ジアミノブタンDODASucを4-ブタノールアミンでアミノ分解することによってポリ-[(4-ヒドロキシブチル)-L-グルタミン]ジアミノブタンDODASucを得た。

0.3 gのPBLG-ジアミノブタンDODASucと0.1 gの2-ヒドロキシピリジンを4 mlのDMFに溶解した。さらに2 mlの4-ブタノールアミンを加えた。窒素雰囲気下40℃で48時間攪拌した後、溶液をおよそ100 mlのジエチルエーテルに析出させた。ポリマーを水に溶解し、透析を行って(MWCO500)、凍結乾燥させたところ、精製されたポリ-[(4-ヒドロキシブチル)-L-グルタミン]ジアミノブタンDODASucを0.2 g得た。

20

$^1\text{H}$ -NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)(溶媒のピークを基準とした)：

ジステアリルのシグナル：0.8-0.85(CH<sub>3</sub>)，1.2-1.5(メチレンプロトン)

PHBG：1.7-2.2(及び-CH<sub>2</sub>)，1.4，3.1及び3.3(ヒドロキシブチル)，4.2(-CH)，4.5(OH)，7.8及び8.2(NH)

分子量：約4000

【0049】

30

#### 8.5 ポリ-[(2,3-ジヒドロキシプロピル)-L-グルタミン]ジアミノブタンDODASuc

PBLG-ジアミノブタンDODASucを2,3-ジヒドロキシプロピルアミンでアミノ分解することによってポリ-[(2,3-ジヒドロキシプロピル)-L-グルタミン]ジアミノブタンDODASucを得た。

0.15 gのPBLG-ジアミノブタンDODASucと0.06 gの2-ヒドロキシピリジンを3 mlのDMFに溶解した。さらに1 mlの2,3-ジヒドロキシプロピルアミンを加えた。窒素雰囲気下40℃で1日攪拌した後、溶液をおよそ100 mlのジエチルエーテルに析出させた。ポリマーを水に溶解し、透析を行って(MWCO500)、凍結乾燥させたところ、精製されたポリ-[(2,3-ジヒドロキシプロピル)-L-グルタミン]ジアミノブタンDODASucを0.1 g得た。

40

$^1\text{H}$ -NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)(溶媒のピークを基準とした)：

ジステアリルのシグナル：0.8-0.85(CH<sub>3</sub>)，1.2-1.5(メチレンプロトン)

ポリ(ジヒドロキシプロピル)G：1.7-2.2(及び-CH<sub>2</sub>)，3.1及び3.3-3.6(ジヒドロキシプロピル)，4.2(-CH)，4.6及び4.8(OH)，7.8及び8.2(NH)

分子量：約4000

【0050】

(実施例9)

#### コレステリル-PHEG

2 mlのクロロホルムに0.2 gのPBLG-NH<sub>2</sub>と20 µlのトリエチルアミンを溶

50

解した溶液に、1 ml のクロロホルムに 0.07 g のコレステリルクロロホルメートを溶解した溶液を加えた。溶液を室温で約 1 時間攪拌し、ジエチルエーテルの中に析出させた。回収し、乾燥させて 0.13 g のポリマー生成物を得た。

エタノールアミンでアミノ分解 (2 - ヒドロキシピリジンは触媒の役目) を 40 で 1 日行くと、コレステリル - P H E G が得られた。ポリマー生成物を透析 (M W C O 5 0 0 ) によって精製した。

$^1\text{H}$  - N M R (D M S O - d 6) (溶媒のピークを基準とした) :

P H E G : 1.7-2.2 ( 及び - C H <sub>2</sub> ), 3.1 及び 3.3 ( ヒドロキシエチル ), 4.2 ( - C H ), 4.7 ( O H ), 7.8 及び 8.2 ( N H )

コレステリル : 0.6-1.6

分子量 : 約 4 0 0 0

M a l d i T O F により、コレステリル - P H E G 結合体の分子構造が確認されている。

N a <sup>+</sup> 付加物 : m / z 3046 (n=14), 3218 (n=15), 3390 (n=16), 3562 (n=17), 3735 (n=18), 3907 (n=19), 4080 (n=20) 等

【 0 0 5 1 】

( 実施例 1 0 )

ポリ ( 2 - ヒドロキシエチル ) - D L - グルタミンジアミノブタン D O D A S u c

合成は、ポリ ( 2 - ヒドロキシエチル ) - L - グルタミンジアミノブタン D O D A S u c ( 実施例 8 ) の合成と同様であるが、いくつか細かい点異なる。

- ベンジル - D L - グルタミン N C A を、 - ベンジル - L - グルタメートと - ベンジル - D - グルタメートの 1 : 1 の混合物から合成し、エチルアセテート / ヘキサン ( 約 1 : 5 ) から結晶化させた ( 実施例 1 参照 ) 。

ポリ ( ベンジル - D L - グルタミン ) ジアミノブタン B O C を、メタノールの代わりに水を使って析出させた。

ポリ ( ベンジル - D L - グルタミン ) ジアミノブタン D O D A S u c をメタノールの中で析出させた。

N M R スペクトルは、ポリ ( 2 - ヒドロキシエチル ) - L - グルタミンジアミノブタン D O D A S u c ( 実施例 8 . 1 ) と実質的に同じである。

分子量 : 約 3 0 0 0

【 0 0 5 2 】

( 実施例 1 1 )

P H E G 共重合体 : ポリ ( H E G - c o - グルタミン酸 ) ジアミノブタン D O D A S u c ; グルタミン酸 5 % 含有

1.5 ml の D M F に 0.14 g の P B L G ジアミノブタン D O D A S u c と、0.05 g の 2 - ヒドロキシピリジンと、約 1 ml のエタノールアミンとを溶解させた溶液を窒素雰囲気下室温で 1 日攪拌した。その後、この溶液をジエチルエーテル中に析出させた。生成物は、部分的にエタノールアミンでアミノ分解された P B L G ジアミノブタン D O D A S u c ( 5 % のベンジルエステル側基を有する P H E G ) であったが、回収して乾燥させた。D M S O 中で記録された N M R によると、未反応ベンジル基が 5 % 存在することが明らかになった。

前記のポリマーを 8.5 ml の 1 M 水酸化ナトリウムに溶解し 4 時間攪拌した。溶液を 1 N 塩酸で中和させ、数日間透析を行った ( M W C O 5 0 0 ) 。透析した溶液を凍結乾燥させた結果、負帯電 ( 生理的 p H 値において ) した共重合体 - 脂質 - 結合体 ( 0.1 g ) を得た。

D M S O 中での N M R によると、ベンジル基が完全に変換されていることがわかった。

M a l d i T O F を使って、グルタミン酸とヒドロキシエチルグルタミン繰り返し単位の両方が存在することを確認した。

分子量 : 約 3 5 0 0

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

## (実施例 12)

P H E G 共重合体：ポリ ( H E G - c o - ジメチルアミノエチルグルタミン ) ジアミノブタン D O D A S u c ; ジメチルアミノエチル側基 5 % 含有

2 . 5 m l の D M F に 0 . 2 5 g の P B L G ジアミノブタン D O D A S u c と、 0 . 0 8 g の 2 - ヒドロキシピリジンと、 1 m l のエタノールアミンとを溶解させた溶液を窒素雰囲気下室温で 2 日間攪拌した。できた溶液をジエチルエーテル中に析出させた。部分的にエタノールアミンでアミノ分解された P B L G ジアミノブタン D O D A S u c ( 5 % のベンジルエステル側基を有する P H E G ) を回収して乾燥させた。C D C l <sub>3</sub> 中で記録された N M R によると、未反応ベンジル基が 5 % 存在することが明らかになった。

2 . 5 m l の D M F に、 0 . 1 6 g の上記の部分エタノールアミン - アミノ分解化 P B L G ジアミノブタン D O D A S u c と、 0 . 0 6 g の 2 - ヒドロキシピリジンと、 1 m l の N , N - ジメチルエチレンジアミンとを溶解させた溶液を、窒素雰囲気下 4 0 ° で 1 日攪拌した。ジエチルエーテルに析出させると粉末が得られ、この粉末を回収し真空中で乾燥させた。D M S O の N M R によると、残っていたベンジル基が完全に変換されていることがわかった。生成物を水に溶解させ、数日間透析 ( M W C O 5 0 0 ) をした後、凍結乾燥させた。収量： 0 . 1 g の正帯電した P H E G 共重合体 - 脂質 - 結合体。

分子量：約 4 0 0 0

## 【 0 0 5 4 】

## (実施例 13)

ステアリルアミンとヘプタデシルオクタデシルアミン末端基をそれぞれ有するポリ ( 2 - ヒドロキシエチル ) - L - アスパラギン ( P H E A )

- ベンジル - L - アスパラテート N - カルボキシ無水物 ( N C A ) :

5 0 m l の蒸留した T H F に 5 g の - ベンジル L - アスパラテートを懸濁させた懸濁液におよそ 1 6 m l のホスゲン 2 0 % のトルエン溶液を含ませ、この懸濁液を 6 0 ~ 6 5 ° で加熱した ( 溶液上は窒素ガス気流 ) 。約 1 0 分後、透明な液を得た。およそ 1 . 5 時間後、溶液を約 1 4 0 m l の n - ヘキサンにゆっくり注いだ。ほとんど即座に結晶が形成された。さらに - 2 0 ° で一晩結晶化させた後、N C A 結晶性生成物を単離した。さらに、T H F / ヘキサンと加熱したクロロホルムで結晶化させ、 4 . 3 g の微細な針状結晶を得た。 ( Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71 )

<sup>1</sup> H - N M R ( C D C l <sub>3</sub> ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ベンジル基：7.3 ( フェニル ) , 5.1 ( C H <sub>2</sub> )

アスパラテート N C A : 2.8 及び 3.0 ( - C H <sub>2</sub> ) , 4.5 ( - C H ) , 6.4 ( N H )

## 【 0 0 5 5 】

ステアリル - P B L A :

0 . 9 5 g の - ベンジル L - アスパラテート N C A の D M F 溶液 2 m l に、 0 . 5 m l のクロロホルムに 0 . 0 4 g のステアリルアミンを溶解させた溶液を加えた。6 0 ° で数時間攪拌した後、濁った液をメタノール中に析出させた。乾燥後、 0 . 5 6 g のポリ ( ベンジル L - アスパラテート ) ステアリルアミンを得た。

## 【 0 0 5 6 】

ヘプタデシルオクタデシル - P B L A :

0 . 5 g の - ベンジル L - アスパラテート N C A の D M F 溶液 2 m l に、約 1 m l のクロロホルムに 0 . 1 g の 1 - ヘプタデシルオクタデシルアミンを溶解させた溶液を加えた。室温で 3 日間攪拌した後、濁った液をメタノール中に析出させた。収量： 0 . 2 g 、ポリマー生成物 P B L A - ヘプタデシルオクタデシルアミン

## 【 0 0 5 7 】

ステアリル - / ヘプタデシルオクタデシル - P H E A :

エタノールアミンと触媒の 2 - ヒドロキシピリジンを使い、上記の P B L A - 結合体を 4 0 ° で 1 日間アミノ分解した後、ジエチルエーテルに析出させたところ、ステアリル又はヘプタデシルオクタデシルのテールをそれぞれ含む水溶性のポリ ( ヒドロキシエチル ) L - アスパラギン ( P H E A ) を得た。脂質 - ポリマー - 結合体を透析 ( M W C O 5 0 0 )

10

20

30

40

50

で精製した。

ステアリル - P H E A :

M a l d i T O F : N a <sup>+</sup>付加物 m / z 2823 (n=16), 2981 (n=17), 3139 (n=18), 3297 (n=19), 3455 (n=20), 3613 (n=21)等

M a l d i T O F により、各 P H E A 鎖は遊離のアミノ末端基を含むという結論がでた。

ヘプタデシルオクタデシル - P H E A :

N M R ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ヘプタデシルオクタデシル : 0.8及び1.2

P H E A : 2.2-2.6 ( - C H <sub>2</sub> ) , 3.1及び3.4 ( ヒドロキシエチル ) , 4.5 ( O H + - C H ) , 7.8及び8.3 ( N H ) 10

分子量 : 約 6 0 0 0

【 0 0 5 8 】

( 実施例 1 4 )

ポリ ( 2 - ヒドロキシエチル ) - L - アスパラギン D O D A S u c

P B L A D O D A S u c :

5 m l の D M F に 1 . 7 g の - ベンジル L - アスパラテート N - カルボキシ無水物 ( N C A ) を溶解させた溶液に、2 M メチルアミンの T H F 溶液 0 . 2 m l を加えた。この透明な溶液を 1 日攪拌した後、メタノール ( 約 1 0 0 m l ) と水 ( 2 5 0 m l ) の混合物中に析出させた。収量 : 1 . 3 g 、メチルアミドとアミノ末端基を有する P B L A 0 . 4 g の P B L A と、3 0 m g の D C C と、1 0 m g の D P T S と、1 0 0 m g の N - スクシニル - ジステアリルアミンとを 5 m l の D M S O と 1 m l のクロロホルムに溶解した溶液を 1 日攪拌してから、水の中で析出させた。ポリマー生成物を攪拌し、ジエチルエーテルで洗浄後、乾燥させた。

【 0 0 5 9 】

P H E A D O D A S u c :

D M F 溶液中、エタノールアミンで P B L A D O D A S u c を 4 0 で 1 日間アミノ分解 ( 触媒として 2 - ヒドロキシピリジン使用 ) したところ、P H E A D O D A S u c を得た ( 透析と凍結乾燥を経て 0 . 2 g ) 。

<sup>1</sup> H - N M R ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ジステアリル : 0.8 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2 ( C H <sub>2</sub> ) , 1.4 ( C H <sub>2</sub> - N )

P H E A : 2.4-2.8 ( - C H <sub>2</sub> ) , 3.2及び3.4 ( ヒドロキシエチル ) , 4.6 ( - C H + O H ) , 7.8-8.5 ( N H ) 30

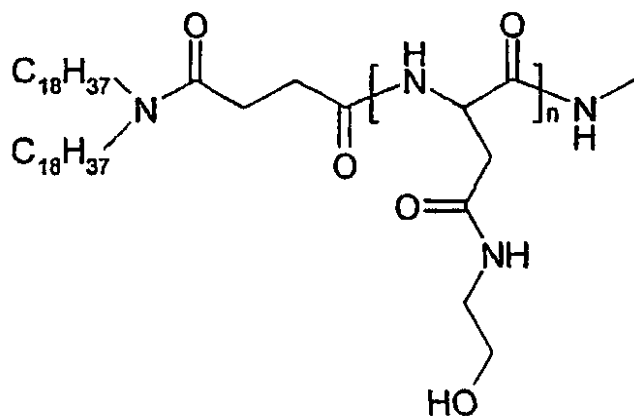
測定分子量 : 約 3 0 0 0

M a l d i T O F により、P H E A D O D A S u c 結合体の分子構造が確認されている。

N a <sup>+</sup>付加物 : m / z 2084 (n=9), 2243 (n=10), 2401 (n=11), 2559 (n=12), 2718 (n=13)、2876 (n=14)等

【 0 0 6 0 】

【 化 1 0 】 40



10

## 【0061】

(実施例15)

ポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-アスパラギンD S P E S u c 結合体

ベンジル-L-アスパラテートN C Aをメチルアミンで開始した重合によって得たP B L A (ポリベンジル-L-アスパラテート)をアミノ分解して、アミノ末端基を有するP H E Aを作製した。スクシニル化D S P E (合成はJACS, 116, 8485 (1994)のD P P Eで記載の方法と同様)は、D C C (ジシクロヘキシルカルボジイミド)を使って現場でまずN H S エステルに変換された。 20

70mgのスクシニル化D S P Eと、20mgのN H S (N-ヒドロキシスクシンイミド)と、5mgのD M A Pと、30mgのD C C (ジシクロヘキシルカルボジイミド)とを2mlのジクロロメタンに溶解させた溶液を、約3~4時間攪拌した。この混合物に、0.13gのアミノ末端基を有するP H E A (分子量約4000)を含む2mlのD M S O溶液を加えた。一晩攪拌した後、混合物をエーテル中に析出させた。析出物を回収し、水に溶かし数日間透析した(M W C O 500)。凍結乾燥させたところ、約80mgのP H E A - D S P Eを得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (溶媒のピークを基準とした) :

D S P E : 0.8 (C H<sub>3</sub>), 1.2 (C H<sub>2</sub>), 1.4 (C H<sub>2</sub>-N)

P H E A : 2.4-2.8 ( - C H<sub>2</sub> ), 3.2及び3.4 (ヒドロキシエチル), 4.6 ( - C H + O H ), 7.8-8.4 (N H )

測定分子量 : 約4000

30

## 【0062】

(実施例16)

ポリ(D L -セリン) D O D A S u c

O-ベンジル-D L -セリンN-カルボキシ無水物(N C A) :

30mlの蒸留した(乾燥)T H Fに2.5gのO-ベンジル-D L -セリンを懸濁させた懸濁液に約10mlのホスゲンの20%トルエン溶液を含ませ、60~65℃で加熱した(溶液上は窒素ガス気流)。約5分後、透明な液を得た。約1.5時間後、溶液をおよそ100mlのn-ヘキサンにゆっくり注いだ。生成物は油として分離した。溶媒はデカンテーションによって除去し、油の方は約25mlのエチルアセテートに溶解させ、そこに100mlのヘキサンをゆっくりと加えた。激しくフラスコを振って-20℃で冷却したところ、O-ベンジル-D L -セリンN C Aは結晶化し始めた。エチルアセテート/ヘキサン及び/又はクロロホルム/ヘキサンから同様に再結晶化させて、2gの結晶性物質を得た。(Biopolymers 1976, 15(9), 1869-71) 40

<sup>1</sup>H-NMR (C D C l<sub>3</sub>) (溶媒のピークを基準とした) :

ベンジル基 : 4.5 (C H<sub>2</sub>), 7.2 (フェニル)

セリンN C A : 3.7 ( - C H<sub>2</sub> ), 4.4 ( - C H ), 5.8 (N H )

## 【0063】

50

ポリ( O - ベンジル - D L - セリン ) :

0.9 g の O - ベンジル - D L - セリン N C A の D M F 溶液 2.5 m l に、0.08 m l の 2 M メチルアミンの T H F 溶液を加えた。室温で数時間攪拌すると、溶液が濁り粘性を帯びてきた。1 日後、この粘性を帯びた「結晶化した」溶液をメタノール / 水と混合して、ポリマー生成物を完全に析出させた。収量 : 0.6 g、ポリマー生成物ポリ( O - ベンジル - D L - セリン )

$^1\text{H}$  - N M R ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ベンジル基 : 4.4 ( C H <sub>2</sub> ) , 7.2 ( フェニル )

ポリセリン : 3.5 ( - C H <sub>2</sub> ) , 4.7 ( - C H ) , 8.2 ( N H )

【 0 0 6 4 】

10

ポリ( O - ベンジル - D L - セリン ) D O D A S u c :

150 m g の N - スクシニル - ジオクタデシルアミン ( D O D A S u c ) と、80 m g の D C C と、5 m g の D P T S とを 4 m l のクロロホルムに溶解した。この溶液を室温で 1 時間攪拌した。0.6 g のポリ( O - ベンジル - D L - セリン ) と約 50  $\mu$  l のトリエチルアミンとを約 5 m l のクロロホルムに溶解した溶液を添加した。室温で一晩攪拌した後、溶液(ジシクロヘキシル尿素析出物を含む)を過剰なメタノール(約 100 m l)に滴下した。ポリマー生成物を濾取して乾燥させた。収量 : 0.4 g

$^1\text{H}$  - N M R ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ジステアリル : 0.8 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2 ( C H <sub>2</sub> ) , 1.6 ( C H <sub>2</sub> - N )

ベンジル基 : 4.4 ( C H <sub>2</sub> ) , 7.2 ( フェニル )

ポリセリン : 3.5 ( - C H <sub>2</sub> ) , 4.7 ( - C H ) , 8.2 ( N H )

【 0 0 6 5 】

20

ポリ( D L - セリン ) D O D A S u c :

0.1 g のポリ( O - ベンジル - D L - セリン ) D O D A S u c を約 4 m l の 33% H B r / A c O H 溶液に溶解し、1 時間攪拌した。この溶液を水中で析出させた。ポリマー析出物を濾取し、水で洗浄し回収した後、4 m l の 1 M 水酸化ナトリウムに溶解させた(1 ~ 2 時間)。できた溶液を 1 N 塩酸溶液で中和して、数日間透析をおこなった( M W C O 500 )。この透析をおこなった溶液を凍結乾燥させた。収量 : 20 m g、ポリ( D L - セリン ) D O D A S u c

$^1\text{H}$  - N M R ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ジステアリル : 0.8 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2 ( C H <sub>2</sub> ) , 1.6 ( C H <sub>2</sub> - N )

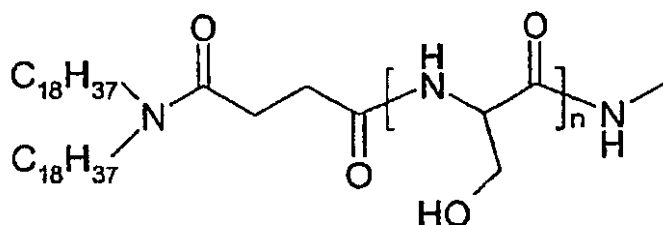
ポリセリン : 3.6 ( - C H <sub>2</sub> ) , 4.3 ( O H ) , 5.0 ( - C H ) , 8.0 ( N H )

ジステアリルのシグナルと - C H シグナルの積分値の比からポリセリンの分子量は約 1500 と算出された。

【 0 0 6 6 】

【 化 1 1 】

30



40

【 0 0 6 7 】

( 実施例 17 )

ポリ - L - スレオニン D O D A S u c

合成は、ポリ( D , L - セリン ) D O D A S u c の合成と同様で、O - ベンジル - L - スレオニン、H C L 及びホスゲンを出発物質として O - ベンジル - L - スレオニン N - カルボキシ無水物( N C A )を介して合成した。

50

ポリ - L - スレオニン D O D A S u c ( M = 約 2 0 0 0 ) :

$^1\text{H}$  - NMR ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ジステアリル : 0.8 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2 ( C H <sub>2</sub> ) , 1.6 ( C H <sub>2</sub> - N )

ポリスレオニン : 1.0 ( C H <sub>3</sub> ) , 4.0 ( - C H ) , 4.3 ( - C H ) , 5.0 ( O H ) , 7.8 ( N H )

【 0 0 6 8 】

( 実施例 1 8 )

ポリ ( D , L - メチオニンスルホキシド ) D O D A S u c

D L - メチオニン N - カルボキシ無水物 ( N C A ) :

4 0 m l の蒸留した ( 乾燥 ) T H F に 2 . 5 g の D L - メチオニンを懸濁させた懸濁液に 10  
約 1 5 m l のホスゲンの 2 0 % トルエン溶液を含ませ、6 0 ~ 6 5 で加熱した ( 溶液上  
は窒素ガス気流 ) 。ほぼ即座に透明な液が形成された。約 1 時間後、溶液をおよそ 1 4 0  
m l の n - ヘキサンにゆっくり注いだ。D L - メチオニン N C A を - 2 0 で結晶化させ  
た ( 数日かかる ) 。エチルアセテート / ヘキサンから再結晶させて、約 0 . 7 g の結晶性  
物質を得た。 ( Biopolymers 1976, 15(9), 1869-71 )

$^1\text{H}$  - NMR ( C D C l <sub>3</sub> ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

メチオニン N C A : 2.0-2.4 ( - C H <sub>2</sub> + C H <sub>3</sub> ) , 4.5 ( - C H ) , 6.8 ( N H )

【 0 0 6 9 】

ポリ ( D L - メチオニン ) :

0 . 7 g の D L - メチオニン N C A の D M F 溶液 2 . 5 m l に、0 . 1 m l の 2 M メチル  
アミンの T H F 溶液を加えた。1 日後、濁った液を約 1 0 0 m l のメタノールに析出させ  
て、その後乾燥させた。収量 : 0 . 3 3 g 、ポリマー生成物 : ポリ ( D L - メチオニン ) 20

$^1\text{H}$  - NMR ( C D C l <sub>3</sub> / T F - d ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ポリメチオニン : 2.0-2.3 ( C H <sub>2</sub> 及び C H <sub>3</sub> ) , 2.6 ( C H <sub>2</sub> ) , 4.7 ( - C H )

【 0 0 7 0 】

ポリ ( D L - メチオニン ) D O D A S u c :

8 0 m g の N - スクシニル - ジオクタデシルアミン ( D O D A S u c ) と、4 5 m g の D  
C C と、5 m g の D P T S とを 2 m l のクロロホルムに溶解した。この溶液を室温で 1 時  
間攪拌した。0 . 3 3 g のポリ ( D L - メチオニン ) と約 2 0  $\mu$  l のトリエチルアミンと  
を約 2 . 5 m l の D M S O に溶解した溶液を添加した。室温で一晩攪拌した後、溶液 ( ジ  
シクロヘキシル尿素析出物を含む ) を過剰なメタノール ( 約 1 0 0 m l ) に滴下した。ポリ  
マー生成物を濾取して乾燥させた。収量 : 0 . 2 2 g 30

$^1\text{H}$  - NMR ( D M S O - d 6 ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

ジステアリル : 0.8 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2 ( C H <sub>2</sub> ) , 1.4 ( C H <sub>2</sub> - N )

ポリメチオニン : 1.8 ( - C H <sub>2</sub> ) , 2.0 ( C H <sub>3</sub> ) , 2.4 ( - C H <sub>2</sub> ) , 4.4 ( - C H ) , 8.1 ( N H )

【 0 0 7 1 】

ポリ ( D L - メチオニンスルホキシド ) D O D A S u c :

ポリ ( D L - メチオニン ) D O D A S u c の一酸素添加 :

0 . 3 g のヨウ素酸ナトリウムの水溶液 2 m l を、約 6 m l の酢酸に 0 . 2 2 g のポリ ( 40  
D L - メチオニン ) ジアミノブタン D O D A S u c を懸濁させた懸濁液にゆっくり添加し  
た。得られたオレンジ / 赤色の溶液 ( 数時間後に形成 ) を一晩攪拌した。その後、約 1 5  
m l の水を加え、できたオレンジ / 赤色の溶液を数日間透析した ( M W C O 5 0 0 ) 。凍  
結乾燥させた後、0 . 2 5 g の生成物を得た。

$^1\text{H}$  - NMR ( D <sub>2</sub> O ) ( 溶媒のピークを基準とした ) :

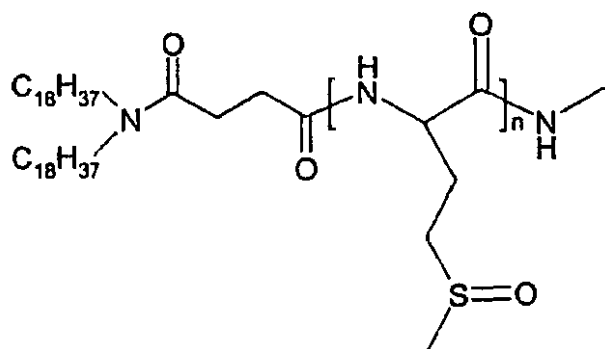
ジステアリル : 0.7 ( C H <sub>3</sub> ) , 1.2 ( C H <sub>2</sub> ) ( 広いピーク )

ポリメチオニンスルホキシド : 2.0 ( - C H <sub>2</sub> ) , 2.5 ( C H <sub>3</sub> ) , 2.8 ( - C H <sub>2</sub> ) , 4.  
3 ( - C H ) , 8.5 ( N H )

計測した分子量 : 約 4 0 0 0

【 0 0 7 2 】

## 【化 1 2】



10

## 【0073】

(実施例 19)

ポリ(DL-グルタミン) DODASuc

ペプチド固相合成方法によって、ポリ(DL-グルタミン) DODASuc 結合体を Ansynth Service B.V. 社が合成した(約 50 mg のスケール)。Fmoc 保護基付きアミノ酸を使って、樹脂に結合したポリ(DL-グルタミン)( $n = 20$ )を順次作り上げた。N 末端に N-スクシニル-ジステアリルアミンを結合した。C 末端はアミドに変えた。

$^1\text{H}$ -NMR スペクトルによって構造が確認された。

20

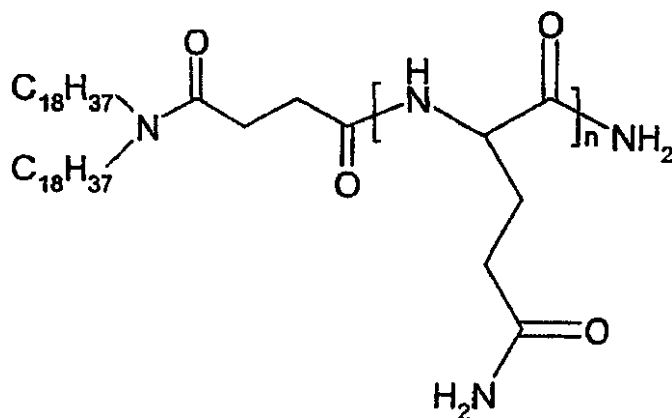
$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ) (溶媒のピークを基準とした) :

ジステアリル : 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.4 (CH<sub>2</sub>-N)

ポリグルタミン : 1.7-2.2 ( - 及び - CH<sub>2</sub> ), 4.2 (CH), 6.8 及び 7.3 (NH<sub>2</sub>), 8.2 (NH)

## 【0074】

## 【化 1 3】



30

## 【0075】

(実施例 20)

ポリ(DL-アスパラギン) DODASuc

ペプチド固相合成方法を用いて、Fmoc 保護基付きアミノ酸から出発してポリ(DL-アスパラギン) DODASuc 結合体を Ansynth Service B.V. 社が合成した(約 50 mg のスケール)。樹脂に結合したポリ(DL-アスパラギン)( $n = 20$ )を順次作り上げた。N 末端に N-スクシニル-ジステアリルアミンを結合した。C 末端はアミドに変えた。DMSO に記録された  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルによって構造が確認された。

40

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ) (溶媒のピークを基準とした) :

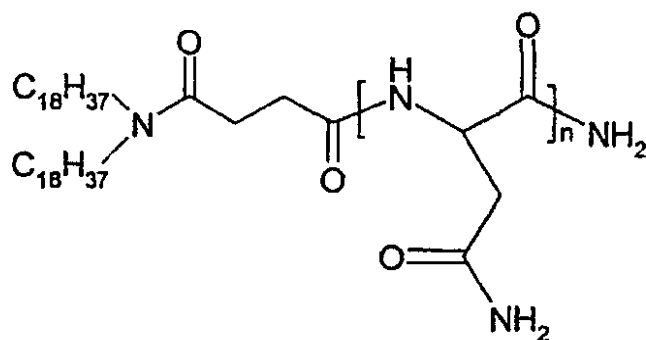
ジステアリル : 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.4 (CH<sub>2</sub>-N)

ポリアスパラギン : 2.5 (CH<sub>2</sub>), 4.5 (CH), 7.0 及び 7.4 (NH<sub>2</sub>), 8.1 (NH)

## 【0076】

50

## 【化 1 4】



10

## 【0077】

(実施例21)

ポリ(D, L - アラニン) DODASuc

95 mg のポリ - D L - アラニン (シグマ社 ; MW : 約 2000) を 4 ml の DMSO に溶解させた。40  $\mu$  l のトリエチルアミンをこの溶液に添加した。さらに、この溶液を 0.1 g の DODASuc と 70 mg の DCC と 5 mg の DPTS とを 2 ml のクロロホルムに溶解して 1 時間攪拌しておいた溶液に加えた。1 日攪拌した後、混合物をメタノール / ジエチルエーテル混合物の中で析出させた。析出物を濾取し乾燥させた。

20

DMSO における  $^1\text{H}$  - NMR :

ジステアリル : 0.8 (CH<sub>3</sub>) , 1.2 (CH<sub>2</sub>) , 1.4 (CH<sub>2</sub>N)

ポリアラニン : 1.2 (CH<sub>3</sub>) , 4.2 (CH) , 8.0 (NH)

## 【0078】

(実施例22)

- アラニンとヒドロキシエチル L - グルタミンのペプチド共重合体

DODASuc-( -Ala)<sub>3</sub>-Glu(OBzl)-( -Ala)<sub>4</sub>-Glu(OBzl)-( -Ala)<sub>3</sub>-Glu(OBzl)-( -Ala)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> :

Fmoc で保護されたモノマーから出発して固相合成方法を用いて、 - アラニンと L - グルタミン酸ベンジルのペプチド共重合体を Ansynth Service B.V. 社が合成した。

30

C 末端 : アミド ; N 末端 : DODASuc

DODASuc-( -Ala)<sub>3</sub>-HEG-( -Ala)<sub>4</sub>-HEG-( -Ala)<sub>3</sub>-HEG-( -Ala)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> :

その後、DMF 中で行われたアミノ分解 (エタノールアミン) 反応によって、グルタミン酸ベンジルの単位をヒドロキシエチルグルタミン (HEG) 単位に変えた。

DMSO 中で記録された  $^1\text{H}$  - NMR により、ベンジル基がなくなり変換されていることが明らかになった。

## 【0079】

(実施例23)

PHEG - ステアリルアミン含有リポソームの調製

33.8 mg の卵黄ホスファチジルコリン (EPC) (Lipoid社 (Ludwigshafen) 製) と、9.67 mg のコレステロール (Sigma Aldrich 社製) と、30.0 mg のポリ - [N - (2 - ヒドロキシエチル) - L - グルタミン] - ステアリルアミン (PHEG - ステアリルアミン) (合成済み) とを秤量し、50 ml の丸底フラスコに移した。500 k B q のトリチウム標識コレステリルオレイルエーテルを脂質マーカーとして添加した。脂質とラベルを約 10 ml のエタノールに溶解させた。その後、Rotavapor を使って真空下 40 で 1 時間乾涸させ、続いて窒素ガスを 1 時間流した。

40

PBS を乾燥した脂質フィルムに添加し、脂質フィルムを完全に水和させるためにガラスビーズの存在下 1 時間振動を与えた。

リポソーム懸濁液を押出し成形機 (Avestin 社製、最大容量 15 ml) に移し、窒素ガスを 50 使って加圧し、孔径がそれぞれ 200 nm と 100 nm の二枚の上下に配置されたポリ

カーボネートフィルターから6回、孔径がそれぞれ100nmと50nmのフィルターから18回押し出した。その後、リポソーム懸濁液を透析部 (Slide-A-Lizer, 10,000MWCO) で1リットルの滅菌したPBSに対して24時間にわたり2回透析をおこなった。

リポソームの平均粒子径は光散乱法 (Malvern Zeta-sizer) によって求めたところ、 $93.6 \pm 0.9$  nmであることがわかった。分散指数は $0.099 \pm 0.02$ であった。リポソーム調製中の脂質損失は、製剤の最終放射能と押し出し工程前の放射能とを比較して求めたところ25%であった。リポソーム懸濁液を窒素雰囲気下4℃で保存した。

【0080】

(実施例24)

#### 脂質 - ポリマー - 結合体を含むリポソームの調製

10

実施例23記載のように、膜法 (film method) を用いてリポソームを調製した。卵黄ホスファチジルコリンの代わりにジパルミトイルホスファチジルコリンを使用した。5mMのHEPESバッファーを乾燥した脂質フィルムに添加し、脂質フィルムを完全に水和させるためにガラスビーズの存在下5分間振動を与えた。孔径が100nmと200nmの2枚の上下に配置されたPC膜からリポソームを12回押し出して分級した。得られたリポソーム分散液を透析し (MWCO 10,000)、平均粒子径を動的光散乱法で求めた。リポソーム製剤の特性については表1を参照。

【0081】

(実施例25)

リポソームに組み込まれた<sup>3</sup>H標識を用いたポリマー - 脂質 - 結合体をラットに静脈内注入 (1回) を行った後の比較動態

20

雄ラット (Wistar, Crl: (WI) BR (非近交系、SPF) (チャールスリバー社、ドイツSulzfeld) が、標準的なペレット状の実験動物用の餌 (altromin社、コードVRF1、ドイツLage) と水道水を自由に利用できるようにした。リポソーム製剤はそれぞれ放射能40 ~ 50 kBqの<sup>3</sup>H標識を用いたコレステリルオレイルエーテル (Amersham社) を含有するが (脂質50μmolあたりのリポソームの組成については表1に示す)、各リポソーム製剤をラットの尻尾の静脈に単回投与した。特に示していない限り、投与した総脂質は5μmolであった。

投与後の以下の時点、5分後、4時間後、24時間後及び48時間後に、各ラットの尻尾の静脈から血液サンプルを採取した。回収したサンプルの量は、採取ごとに約300μlであった。

30

回収したサンプルをヘパリン化生理食塩水で処理した (heparinised) チューブに移し、20℃で保管した。

100μlのアリコートを下の方法に従って可溶化した。

【0082】

- 100μlをシンチレーションバイアル (20ml) に移した。  
- 100μlの「Solvable」を添加した。これを少なくとも1時間培養した。  
- 100μlの1mM EDTAと200μlのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) を添加した。この混合物を室温で24時間、その後50℃で一晩培養した。

- シンチレーション液 (scintillation fluid) として「Ultima Gold」 (10ml) を添加した。

40

- 放射能をLSCで測定した。

すべての放射能測定は、パッカー社 (Packard) のシンチレーション計数管 (1900TR) を用いて行った。計測時間は、統計的精度が±0.2%になるか、最高5分経つまでかのいずれかが先に達成されるまでとした。パッカー社の1900TRは、自動的にバックグラウンド計数を差し引いて、1分間あたりのカウント数 (CPM) を1分間あたりの壊変数 (DPM) に変換するようにプログラムされていた。

記載の製剤のうちのいくつかについては、注入から48時間後にラットの肝臓と脾臓を解剖してリポソームの位置を以下の方法に従って査定した。

器官を均質化し、得られたホモジェネートを25ml (肝臓) 又は5ml (脾臓) に希釈

50

した。1 ml のホモジェネートをシンチレーションバイアルに移し、引き続きそこに以下のものを添加した。

【0083】

- 200 ml の「Solvable」（混合しサンプルを50 で一晩培養）
- 200 ml の0.5 M EDTA 溶液
- 250 ml のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（30%）溶液（50 で一晩培養）
- 10 ml のシンチレーション液「Ultima Gold」（Vortexミキサーにかけて、サンプルを24時間培養）

その後、ベータシンチレーション計数管で10分間サンプルをカウントした。リポソーム製剤の結果について図6に示す。

実施例24で調製したリポソーム製剤の組成と該実施例の生体内テストで得た結果を、表1に示す。血中循環時間の増加を評価したが、評価中、

- 「良好」とは、循環時間への効果がPEG-DSPC含有リポソームによって示される効果に匹敵することを意味する。

- 「中くらい」とは、循環時間への効果が、PEG-DSPC含有リポソームによる効果とポリマーコーティングのない非表面修飾のリポソームによる効果との中間であることを意味する。

- 「わずか」とは、現在の条件下における循環時間への効果が表面修飾のないリポソームの場合とほぼ同様であることを意味する。

【0084】

【表1】

脂質50 μモルあたりのリポソームの組成と特性

DPPC (mg)	コレステロール (mg)	脂質-ポリマー結合体 (mg)	平均粒子径 (nm)	分散指数	血中循環時間の増加
23.1	6.4	実施例2: 15	134±0.5	0.100	わずか
23.1	6.4	実施例6: 10	153±0.5	0.056	良好
23.1	6.4	実施例5: 30	143±2	0.205	中くらい
23.1	6.4	実施例8.1: 11.2	140.3±2.2	0.090	良好
23.1	6.4	実施例8.2: 13.8	153.0±0.9	0.090	中くらい
23.1	6.4	実施例8.4: 11.2	148.2±1.7	0.071	わずか
23.1	5.5	実施例9: 11.0	138.7±1.8	0.116	わずか
23.1	6.4	実施例14: 8.9	146.0±2.1	0.092	良好
23.1	6.4	実施例14: 13.8	147.0±1.1	0.068	良好
23.1	6.4	実施例14: 8.9	141.7±2.3	0.044	良好
23.1	6.4	実施例8.2: 11.2	163.9±3.0	0.068	中くらい
23.1	6.4	実施例23: 2.2	171.6±2.5	0.167	わずか
23.1	6.4	実施例11: 10.1	180.7±6.1	0.113	わずか

【0085】

DPPC (mg)	コレステロール (mg)	脂質-ポリマー結合体 (mg)	平均粒子径 (nm)	分散指数	血中循環時間の増加
23.1	6.4	実施例8.1: 11.2	159.0±3.8	0.073	良好 (#)
23.1	6.4	実施例14: 8.9	152.9±3.4	0.050	良好 (#)
23.1	6.4	実施例12: 11.2	170.3±2.5	0.039	中くらい
23.1	6.4	実施例12: 2.24+実施例8.1: 8.96	166.0±0.9	0.056	中くらい
23.1	6.4	実施例11: 10.1	167.7±0.6	0.170	わずか

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 6 】

DPPC (mg)	コレステ ロール(mg)	脂質-ポリマー- 結合体 (mg)	平均粒子径 (nm)	分散指数	血中循環時間 の増加
23.1	6.4	実施例18: 11.2	159.9±2.3	0.062	良好
23.1	6.4	実施例16: 5.0	162.7±1.6	0.159	わずか
23.1	6.4	実施例19: 8.8	156.3±3.2	0.059	中くらい
25.0	6.4	実施例20: 8.8	164.7±4.0	0.116	中くらい
23.1	6.4	実施例10: 8.8	159.0±3.8	0.073	わずか
23.1	6.4	実施例22: 8.8	152.9±3.4	0.050	中くらい
23.1*	6.4*	実施例14: 8.8*	167.7±0.6	0.170	良好
23.1**	6.4**	実施例14: 8.8**	149.9±2.3	0.062	良好
23.1***	6.4***	実施例14: 8.8***	162.7±0.24	0.159	わずか
23.1	6.4	PEG-DSPE: 6.9	156.3 3.2	0.059	良好
23.1*	6.4*	PEG-DSPE: 8.8*	170.3 2.5	0.039	良好
23.1**	6.4**	PEG-DSPE: 6.9**	166.0 0.9	0.056	良好
23.1***	6.4***	PEG-DSPE: 6.9***	170.5 0.3	0.110	<わずか

10

## 【 0 0 8 7 】

\* : 投与した総脂質は 0 . 5  $\mu$  モル ( 図 1 、 図 2 参照 )

20

\* \* : 投与した総脂質は 0 . 0 5  $\mu$  モル ( 図 1 、 図 2 参照 )

\* \* \* : 投与した総脂質は 0 . 0 0 5  $\mu$  モル ( 図 1 、 図 2 参照 )

( # ) : 2 度目の注入 ( T L : 1  $\mu$  モル ) を 1 週間後に行ったところ、実施例 8 . 1 の脂質 - ポリマー - 結合体を含むリポソームに関して循環時間に減少が見られた。実施例 1 4 の結合体を含むリポソームもまた同様な減少を示したが、2 匹に関してはこの結果がそれほど著しくなかった。

## 【 0 0 8 8 】

( 実施例 2 6 )

脂質 - ポリマー - 結合体とリン酸ブレドニゾロンを含むリポソームの調製

7 5 0 m g のジパルミトイルホスファチジルコリン ( D P P C ) ( Lipoid社 Ludwigshaf en ) と、2 2 0 . 0 m g のコレステロール ( Sigma Aldrich社 ) と、2 7 0 . 0 m g の実施例 1 4 の脂質 - ポリマー - 結合体、並びに 7 5 0 m g のジパルミトイルホスファチジルコリンと、2 5 0 . 8 m g のコレステロールと、2 6 7 . 6 m g の P E G - ジステアロイルホスファチジリエタノール - アミン ( P E G - D S P E ) ( Avanti Polar Lipids社 ) とをそれぞれ秤量し、1 0 0 m l の丸底フラスコで混合した。実施例 1 4 の脂質 - ポリマー - 結合体の方は、脂質類をメタノールとクロロホルムの 1 : 1 の混合物約 3 0 m l に溶解し、P E G - D S P E の方は脂質類をエタノールに溶解させた。この後、真空下 4 0 で 1 時間かけて Rotavapor で乾固させ、続いて窒素ガスを 1 時間流した。

30

1 2 0 0 m g のリン酸ブレドニゾロンニナトリウム ( P L P ) ( O P G Nieuwegein ) を秤量し、1 2 m l の滅菌した P B S に溶解させた。この溶液を乾燥した脂質フィルムに添加し、脂質フィルムを完全に水和させるためにガラスビーズの存在下、1 時間振動を与えた。

40

リポソーム懸濁液を押出し成形機 ( Avestin社製、最大容量 1 5 m l ) に移し、窒素ガスによる加圧のもと、上下に配置された 2 枚のポアフィルターで孔径がそれぞれ 2 0 0 n m と 1 0 0 n m 、1 0 0 n m と 5 0 n m 、及び 5 0 n m と 5 0 n m から 6 回押し出した。その後、リポソーム懸濁液を透析部 ( Slide-A-Lizer, 10,000 M W C O ) で 1 リットルの滅菌した P B S に対して 2 4 時間にわたり 2 回透析をおこなった。

リポソームの平均粒子径を光散乱法 ( Malvern Zeta-sizer ) で求めたところ、それぞれ 8 5 n m と 9 0 n m であることがわかった。分散指数は 0 . 1 より小さかった。リン酸ブレドニゾロンの封入効率を H P L C 方法で求めたところ、2 . 6 % であることがわかった。

50

リポソーム懸濁液を窒素雰囲気下4℃で保存したところ、少なくとも5週間は安定していることがわかった。この間、実施例14の脂質-ポリマー-結合体を含むリポソーム製剤は、参照用の脂質-ポリマー-結合体PEG-DSPPEを含むリポソーム製剤に比べわずかに良い性能をしめした。(図3参照)

【0089】

(実施例27)

アジュバント関節炎モデルのラットにおけるリン酸ブレドニゾロン含有リポソーム調合物の循環時間と治療効果の評価

フロイント不完全アシュバントに熱不活性化させた結核菌を加えたものを、ルイスラットの尻尾の根元に皮下注射(免疫)した。免疫から9~12日で足に炎症がはじめ、およそ20日後にもっともひどくなり、その後次第に炎症が消散した。 10

免疫を与えて10日から35日までの足の炎症の重篤度を目視により点数化して疾病の評価を行った。足の炎症スコアが最高スコアの間接点に達したところで(14~15日目)、すべてのラットをグループ分けし、平均スコアが同じ5匹のグループに分けて以下の静脈注射を1回行った。

1. 10mg/kgのPHEA-DPDASucリポソームに含有されたPLPで、実施例26のようにして調製されたもの、又は

2. 10mg/kgのPEG-DSPERリポソームに含有されたPLPで、実施例26(参照用)のようにして調製されたもの、又は

3. PBS(対照) 20

t=0、24及び48時間において、血液サンプルを回収しリポソームPLPの血漿濃度を分析した。

血液中のPHEA-リポソーム及びPEG-リポソーム両方の循環挙動をPLPの血漿濃度特性として図4に図示したが、両タイプのリポソームは循環半減期に関しては同様に良好な性能を示している。

対照としての生理食塩水で処方したラットに対する、アジュバント関節炎のラットにおける10mg/kgのPLP-PHEA-リポソームと10mg/kgのPLP-PEG-リポソームの治療薬効を図5に示す。

【図面の簡単な説明】

【0090】 30

【図1】総脂質の含有量が異なるPEG-DSPPE含有リポソーム製剤において、注入投与量に対する血液サンプル中の実測した割合(%)の平均値と時間との関係をグラフに表したものである。(実施例25)

【図2】総脂質の含有量が異なるPHEA-DODASuc含有リポソーム製剤において、注入投与量に対する血液サンプル中の割合(%)の平均値と時間との関係をグラフに表したものである。(実施例25)

【図3】PEG-DSPPE含有リポソーム製剤とPHEA-DODASuc含有リポソーム製剤のそれぞれに封入されたリン酸ブレドニゾロンの割合(%)を時間との関係で表したものである。(実施例26)

【図4】PEG-DSPPE含有リポソームとPHEA-DODASuc含有リポソームに封入されたリン酸ブレドニゾロンの血液中濃度と時間との関係をグラフに表したものである。(実施例27) 40

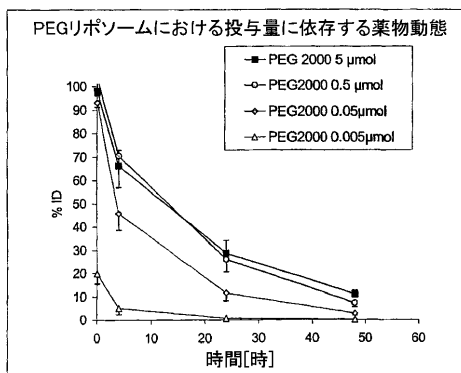
【図5】生理食塩水とリン酸ブレドニゾロン含有リポソーム(各リポソームはPEG-DSPPE又はPHEA-DODASucでコーティング)を一回のみ静脈内注入した場合、注入前後の足の炎症スコアと時間との関係をグラフに表したものである。(実施例27)

【図6】脂質-ポリマー-結合体として、PEG-DSPPE、PHEG-ジアミノブタンDODASuc、PHPGジアミノブタンDODASuc、PHBGジアミノブタンDODASuc及びPHEA-DODASucをそれぞれ含むリポソーム、並びに従来のリポソーム(表面修飾なし)を静脈内投与した後、リポソーム投与注入量に対する肝臓、脾臓、及び(肝臓+脾臓)で検出された割合(%)をグラフに表したものである。(実施例2 50

4 )

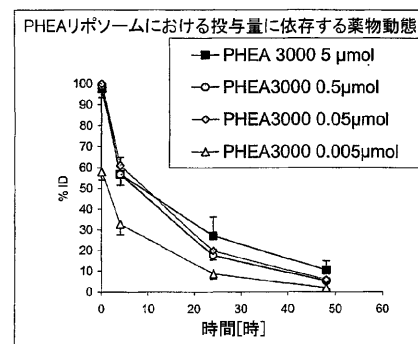
【 図 1 】

Fig. 1



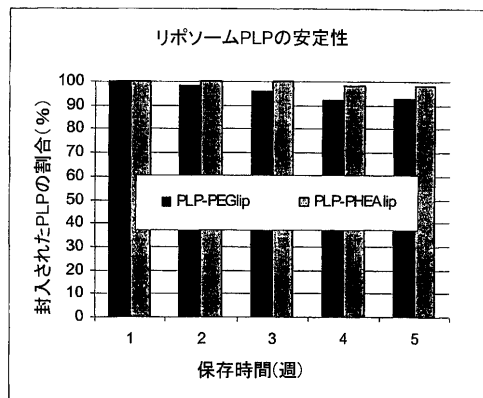
【 図 2 】

Fig. 2



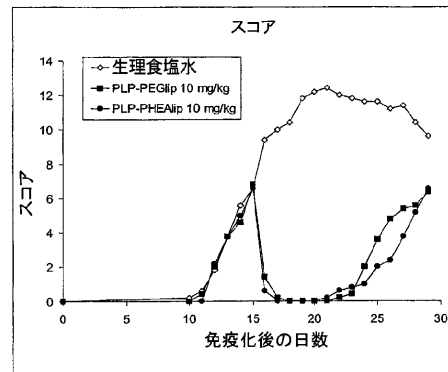
【 図 3 】

Fig. 3



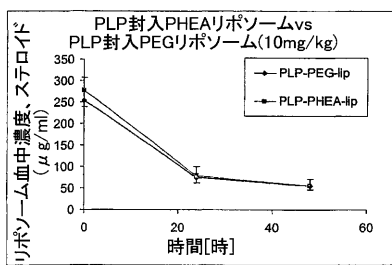
【 図 5 】

Fig. 5



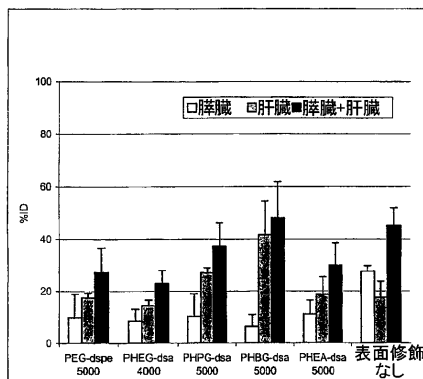
【 図 4 】

Fig. 4



【 図 6 】

Fig. 6



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
12 December 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/098952 A1(51) International Patent Classification: C08G 69/10,  
A61K 9/127

(21) International Application Number: PCT/EP02/06783

(22) International Filing Date: 3 June 2002 (03.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 01202107.7 1 June 2001 (01.06.2001) EP

(81) Designated States (*national*): AI, AG, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GE, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LI, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, SG, SI, SK, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (*for all designated States except US*): YAMANOUCI EUROPE B.V. [NL/NL]; Elisabethhof 19, NL-2350 EW Leiderdorp (NL).

## Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AF, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GE, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, SG, SI, SK, TT, UA, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— of inventorship (Rule 4.17(iii)) for US only  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only  
— of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only  
— of inventorship (Rule 4.17(vi)) for US only  
— of inventorship (Rule 4.17(vii)) for US only

## Published:

with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **METSelaar, Josbert, Maarten** [NL/NL]; Dept. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences, P.O. Box 80082, NL-3508 TB Utrecht (NL). **HENNINK, Wilhelmus, Everardus** [NL/NL]; Dep. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences, P.O. Box 80082, NL-3508 TB Utrecht (NL). **DE VRINGER, Tom** [NL/NL]; Yamanouchi Europe B.V., P.O. Box 108, NL-2350 AC Leiderdorp (NL). **DE BOER, Leonardus, Wilhelmus, Theodorus** [NL/NL]; Yamanouchi Europe B.V., P.O. Box 108, NL-2350 AC Leiderdorp (NL). **OUSSOREN, Christien** [NL/NL]; Dept. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences, P.O. Box 80082, NL-3508 TB Utrecht (NL). **STORM, Gerrit** [NL/NL]; Dept. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences, P.O. Box 80082, NL-3508 TB Utrecht (NL). **BRUIN, Peter** [NL/NL]; Dept. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences, P.O. Box 80082, NL-3508 TB Utrecht (NL).

(74) Common Representative: YAMANOUCI EUROPE B.V.; Dept. Legal Affairs Europe, P.O. Box 108, NL-2350 AC Leiderdorp (NL).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: LIPID-POLYMER-CONJUGATES COMPOSITIONS

(57) Abstract: Colloidal carrier compositions, comprising an active agent and a lipid conjugate of a poly-(amino acid), a poly-(amino acid derivative) or poly-(amino acid analogue), such as poly-[N-(2-hydroxyethyl)-glutamine] (PIIEG), are provided.



WO 02/098952 A1

WO 02/098952

PCT/EP02/06783

5 **LIPID-POLYMER-CONJUGATES COMPOSITIONS**

The present invention relates to colloidal carrier compositions, comprising an active ingredient and a lipid-polymer-conjugate.

10 **BACKGROUND OF THE INVENTION**

Colloidal carrier compositions include vesicular bilayer systems, such as liposomes, niosomes and reversed vesicles, micellar systems, nanocapsules, nanospheres etc.. A well-known representative of such colloidal carrier compositions is formed by liposomes. Although hereinafter especially liposomes are mentioned, the reader should bear in mind that the discussions, disclosures and teachings relate to other colloidal carrier compositions as well.

Liposomes, which belong to the group of colloidal carrier particles, are small vesicles consisting of one or more concentric lipid bilayers enclosing an aqueous space. Because of their structural versatility in terms of size, surface charge, lipid composition, bilayer fluidity and because of their ability to encapsulate almost every drug, their importance as drug delivery systems was readily appreciated. However, on intravenous injecting of liposomes, these are recognised as foreign particles by the Mononuclear Phagocyte System (MPS) and rapidly cleared from the circulation to organs rich in phagocytic cells, like liver, spleen and bone marrow. Several possibilities to reduce this effect have been identified, such as decreasing the particle size of the liposomes and changing the surface charge of the liposomes. Another development relates to surface modification of the liposomes by the introduction of specific hydrophilic polymeric components on the liposomal surface, which groups reduce protein adsorption on the particle surface. Consequently such liposomes are protected against recognition by cells of the MPS and have a prolonged residence time in the general circulation. A well-known example of modification of the liposomal surface is the incorporation during the preparation of liposomal compositions of a lipid derivative of the hydrophilic polymer polyethylene glycol (PEG). Usually this polymer is terminus-modified with a hydrophobic moiety, which is the residue of a phosphatidyl ethanolamine derivative or a long-chain fatty acid. Polyethylene glycol per se is a rather stable polymer, which is a repellant of protein adhesion and which is not subject to enzymatic or hydrolytic degradation

under physiological conditions. Good results with respect to extending plasma half life and diminishing accumulation into the organs rich in phagocytic cells have been obtained following intravenous administration of liposomes, having a PEG-grafted surface, to various animal species and also to human beings (Storm G., Belliot S.O., Daemen T. and Lasic D.D.: Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system in *Adv. Drug Delivery Rev.* 17, 31-48, (1995); Moghimi S.M., Hunter A.C. and Murray J.C.: Long-circulating and target-specific nanoparticles; theory to practice in *Pharmacol. Rev.* 53, 283-318, (2001); Boerman O.C., Dams E.T., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M. and Storm G.: Radiopharmaceuticals for scintigraphic imaging of infection and inflammation in *Inflamm. Res.* 50, 55-64, (2001)). Marketing approvals for such liposomal preparations, containing doxorubicine, have been obtained.

Meanwhile several disadvantages of the use of the polymer polyethylene glycol in long-circulating liposomes have been encountered. The accumulation of PEG-grafted liposomes in macrophages and the skin is of some concern due to non-biodegradability. Loss of the long-circulation property (fast clearance) on injecting PEG-liposomes for a second time has been observed (Dams E.T., Laverman P., Oijen W.J., Storm G., Scherphof G.L., Van der Meer J.W., Corstens F.H. and Boerman O.C.: Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes in *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 1071-1079, (2000)). Recent studies with PEG-liposomes in patients have shown that PEG-liposomes can induce acute side effects (facial flushing, tightness of the chest, shortness of breath, changes in blood pressure), which resolve immediately when the administration (infusion) of the PEG-liposome formulation is terminated. Recent data point to a role of complement activation in the induction of side effects (Szebeni J., Baranyi L., Savay S., Lutz H., Jelezarova E., Bunger R. and Alving C.R.: The role of complement activation in hypersensitivity to Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in *J. Liposome Res.* 10, 467-481, (2000)). Until now the commercially available preparations based on PEG-liposomes are aqueous suspension preparations. It is well-known that the shelf life of liposomal aqueous suspension preparations in general and also of PEG-liposomes is rather limited. Several techniques how to remove the vehicle or continuous phase of such preparations are known, such as, spray-drying, diafiltration, rotational evaporation etc., and preferably freeze-drying. Recently a freeze-drying method, which improved the long term shelf life of PEG-liposomes, containing the technetium-chelator hydrazino nicotinamide, was proposed (Laverman P., van Bloois L., Boerman O.C., Oyen

WO 02/098952

3

PCT/EP02/06783

W.J.G., Corstens F.H.M. and Storm G.: Lyophilisation of Tc-99m-HYNIC labelled PEG-liposomes in *J. Liposome Res.* 10(2&3), page 117-129 (2000)), but further investigations into the results and applicability of this technique to liposomal preparations are required.

The disadvantages inherent to the use of polyethylene glycol urged investigators to look for alternative polymers. Many polymers have been suggested as suitable candidates for derivatising them with (vesicle-forming) lipids for incorporation into liposomes (see e.g. EP-0688207). The hydrophilic water soluble polymers poly(vinylpyrrolidone), poly(acryloylmorpholine), poly(2-(m)ethyl-2-oxazoline, polyacrylamide and polyglycerol have shown to prolong the circulation time of liposomes after intravenous administration to a certain extent. However, until now such lipid-polymer conjugates have not been applied in commercially available drug preparations, mainly because they have not shown any advantages over the known lipid-PEG-conjugates. Therefore there still is a need to find a polymer, which can be derivatised with a lipid to enable incorporation into colloidal carrier compositions, such as liposomes, such polymer having long-circulating properties and in addition thereto having advantages over PEG, such as biodegradability.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

Colloidal carrier compositions are provided, which comprise an active agent and a lipid-polymer conjugate, obtainable from an amphiphilic lipid, consisting of at least one hydrophobic apolar moiety and a hydrophilic polar head group, and a polymer or a monomeric precursor therefor, the polymer being a poly-(amino acid), a poly-(amino acid derivative) or a poly-(amino acid analogue).

#### LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1 is a graphical representation of the mean values for the calculated percentage injected dose in blood samples versus time for PEG-DSPE-containing liposomal preparations, having a different amount of Total Lipid (example 25).

Figure 2 is a graphical representation of the mean values for the calculated percentage injected dose in blood samples versus time for PHEA-DODASuc-containing liposomal preparations, having a different amount of Total Lipid (example 25).

Figure 3 is a graphical representation of the percentage encapsulated prednisolone phosphate in PEG-DSPE and PHEA-DODASuc, respectively, containing liposomal preparations versus time (example 26).

WO 02/098952

4

PCT/EP02/06783

Figure 4 is a graphical representation of the concentration of prednisolone phosphate encapsulated in PEG-DSPE and PHEA-DODASuc containing liposomes in blood versus time (example 27).

Figure 5 is a graphical representation of the paw inflammation score versus time before and after a single intravenous injection of saline and prednisolone phosphate-containing liposomes (coated with PEG-DSPE and PHEA-DODASuc respectively) (example 27).

Figure 6 is a graphical representation of the percentage injected dose of liposomes found in liver, spleen and liver+spleen after intravenous administration of liposomes, containing as the lipid-polymer-conjugates PEG-DSPE, PHEG-diaminobutane DODASuc, PHPG diaminobutane DODASuc, PHBG diaminobutane DODASuc and PHEA-DODASuc respectively, and conventional liposomes (BARE) (Example 24).

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The term active agent as used herein is to be understood as being a therapeutically active agent, a biologically active agent, a physiologically active agent, a prophylactic agent and a diagnostic agent, including imaging agents and radio-actively labeled compounds, which can be included into the colloidal carrier compositions in an amount sufficient to obtain the desired effect. These agents are of use in both humans and animals. Examples of therapeutically active agents are corticosteroids, anti-tumour agents etc. The imaging agents include compounds in the gaseous state, such as oxygen, and radio-actively labeled excipients, such as  $^3\text{H}$ -cholesterylcholesterol. According to the present invention the active agents are not chemically bound to the amphiphilic lipid-polymer-conjugates.

The amphiphilic lipid-polymer-conjugates in the compositions of the present invention are obtainable from an amphiphilic lipid and a polymer or a monomeric precursor therefor.

The amphiphilic lipids to be used in the lipid-polymer conjugate according to the invention may be selected from a variety of synthetic or naturally occurring lipids, consisting of at least one hydrophobic apolar tail and a hydrophilic polar head group, such as vesicle-forming lipids and membrane lipids.

An important feature of the amphiphilic lipid to be used in the lipid-polymer conjugate is that the lipid contains a functional group at its polar head group suitable for covalent attachment to a polymer chain. The polar head group is for example a primary or secondary amine group, a hydroxyl group, an aldehyde group, a halide or a carboxylic group. The

WO 02/098952

5

PCT/EP02/06783

hydrophobic moiety of the lipid enables the incorporation of the lipid-polymer conjugates into bilayer structures, such as liposomes and acts as an anchor.

Examples of amphiphilic lipids are phospholipids, glycolipids, ceramides, cholesterol and derivatives, saturated or partially unsaturated, branched or straight-chain C<sub>8</sub>-C<sub>50</sub> mono- or di-alkylamines, arylalkylamines, cycloalkylamines, alkanols, aldehydes, carbohalides or

More specifically, examples of suitable amphiphilic lipids are phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol, sphingomyeline, stearylamine, myristylalcohol, cholesterol and palmitic acid.

10 A preferred amphiphilic lipid in the lipid-polymer-conjugate is a lipid having two hydrophobic chains, typically alkyl chains, and a polar head group, containing a functional group, as described above. Phosphatidyl ethanolamine derivatives and in particular distearyl phosphatidyl ethanolamine, are such preferred phospholipids since they contain a reactive amino group.

15 Further preferred amphiphilic lipids have as the hydrophilic polar head group a primary or secondary amine and two saturated or unsaturated C<sub>8</sub>-C<sub>50</sub> branched or straight chain hydrophobic apolar moieties. Examples thereof are 1-heptadecyloctadecylamine and distearylamine-containing compounds, such as distearylamine and N-succinyl-dioctadecylamine (DODASuc).

20 The polymer part of the lipid-polymer-conjugates of the present invention is formed by a poly-(amino acid), a poly-(amino acid derivative) or a poly-(amino acid analogue). A poly-(amino acid derivative) is a polymer, which consists of amino acid monomers, to which one or more substituents are attached. An example thereof is poly(2-hydroxyethyl)-L-glutamine. A poly-(amino acid analogue) as herein disclosed is a polymer, wherein the carbon atom chain length of the amino acid monomers is reduced or prolonged. Examples

25 thereof are poly(-homoserine) and poly(pentahomoserine).  
The polymer is a homo-polymer, consisting of monomers that are the same throughout the polymer chain. It is also possible that the polymer part consists of block co-polymers selected from the group consisting of poly-(amino acid), poly-(amino acid derivative) and  
30 poly-(amino acid analogue) or that the polymer part is formed by a series of alternating monomers or a controlled order of monomers or by random polymerisation of suitable monomers selected from the group consisting of one or more amino acids, amino acid

WO 02/098952

6

PCT/EP02/06783

derivatives and amino acid analogues. The polymers may be linear or branched and include graft polymers, but preferably are linear.

Useful amino acids are the naturally occurring  $\alpha$ -amino acids. However also  $\beta$ -amino acids as well as nonprotein or non-naturally occurring amino acids have appeared to be of interest.

- 5 Both the L- and the D-configuration of the amino acids and derivatives can be used. When the amino acid sequence of the polymer in the lipid-polymer-conjugate is formed by residues of the L-amino acid, the resulting polymer will be subject to enzymatic degradation. On the other hand, when the amino acid sequence of the polymer in the lipid-polymer-conjugate of this invention is formed by the D-amino acid, the resulting polymer is likely to be stable
- 10 towards peptide-degrading enzymes. Also mixtures of the L- and D-amino acids can be used. Taking into account the different properties of the polymers, surface-modification of colloidal carrier particles, in which the lipid-polymer-conjugates of the invention are incorporated, can be adjusted by selective use of the L- and/or D-form of the starting materials for preparation of the conjugates.
- 15 An important property of the poly-(amino acid), poly-(amino acid derivative) and poly-(amino acid analogue) compounds, which are suitable for incorporation into the lipid-polymer-conjugates of the present invention, is that they are soluble in water (at least 1 part in 100 parts of water, preferably 1 part in 30 parts of water and most preferably 1 part in 10 parts of water or less). The polymers can also be characterised by their  $\chi$ -parameter in water.
- 20 This polymer-solvent interaction parameter can be determined by e.g. membrane-osmometry. The polymers which can be advantageously used in the lipid-polymer conjugates according to this invention have a  $\chi$ -parameter of  $\leq 0.65$ , preferably  $\leq 0.5$  in water.

- A further important feature of the polymers is that they contain no substantial amount of
- 25 charged groups within a (physiological) pH-range of 4-8. Preferably neutral amino acid monomers or amino acid analogue monomers are used in the preparation of the polymers or amino acid derivative monomers, which are neutral or have been neutralised. As it appeared charged groups can be allowed to be present in a low percentage without disturbing the long-circulating properties of the colloidal carrier compositions according to the present
- 30 invention. As has been demonstrated for co-polymers of 2-hydroxyethyl-L-glutamine and charged monomers, positively charged groups can be allowed to be present in a larger percentage than negatively charged groups.

WO 02/098952

PCT/EP02/06783

7

Suitable monomers for the preparation of the polymer are amongst others alanine, threonine, valine,  $\alpha$ -aminoadipic acid,  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid derivatives, ornithine, glutamine and derivatives, including glutamic acid, asparagine and derivatives, including aspartic acid, lysine derivatives, methionine and derivatives, serine, its derivatives and analogues with additional  $\text{CH}_2$  groups, such as homoserine and pentahomoserine. Suitable side-groups include the  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ -alkyl, hydroxyalkyl, dihydroxyalkyl, acid amides and aryl groups or combinations thereof, provided that the polymer remains water soluble. Examples of these groups are 2-hydroxyethyl, 3-hydroxypropyl, 4-hydroxybutyl and 2,3-dihydroxypropyl. Polymers which can be used are e.g. poly(D,L-serine) (PDLS), poly(2-hydroxyethyl)-D,L-glutamine (PDLHEG), poly(2-hydroxybutyl)-L-glutamine (PHBG) and the copolymer poly(HEG-co-glutamic acid) 1% glutamic acid (PHEG1%GA). Preferred polymers are poly(D,L-glutamine) (PDLG), poly(D,L-asparagine) (PDLA), poly(hydroxypropyl)-L-glutamine (PHPG), poly(2-hydroxypropyl)-L-glutamine (P2HPG) and the copolymers of beta-alanine and 2-hydroxyethyl-L-glutamine (PbAHEG), poly(HEG-co-dimethylaminoethyl-glutamine) containing 5 and 1% dimethylaminoethyl side groups (PHEG5%DG and PHEG1%DG). More preferred polymers are the homopolymers poly-[N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] (PHEG), poly(2-hydroxyethyl)-L-asparagine (PHEA) and poly(D,L-methioninesulfoxide) (PDLMS).

The polymer chain contains between 5 and 500 monomer subunits, preferably between 20 and 100. The mean molecular weight of the polymer varies from 500 to 75,000, preferably from 2,000 to 15,000. The mean molecular weight can be assessed in different ways as known in the art. In the examples of the present application an estimate of the molecular weight has been made based on NMR-data.

For the preparation of the lipid-polymer-conjugates incorporated into the compositions of the present invention manufacturing methods have preferably been used, wherein reactive groups in the side chains of the amino acid monomers were protected prior to polymerisation and coupling of the lipid.

The lipid-polymer-conjugates can be prepared according to methods known in the art.

A well-known method to prepare polymers of amino acids involves the ring opening polymerisation of the corresponding amino acid N-carboxy-anhydride (NCA)s, optionally provided with one or more protective groups, initiated by nucleophiles such as  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$  alkyl primary amines. Another method to obtain the lipid-polymer-conjugates comprises the use of an amine with a protected functional group, for instance N-Boc-1,4-diaminobutane, as the

WO 02/098952

8

PCT/EP02/06783

initiator in the ring opening NCA polymerisation. Although two extra steps, namely deprotection of the functional group and subsequently coupling to a lipid with a reactive group, are required in this process, the lipid-polymer-conjugates prepared by this method are also suitable for incorporating into the colloidal carrier compositions of this invention.

- 5 If the amphiphilic lipid is a C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> branched or straight-chain mono- or di-alkyl, -hydroxyalkyl or -alkylene amine, an alkanol or a ceramide, this can be advantageously used as the initiator in the ring opening polymerisation process. This means that during the polymerisation the amphiphilic lipid is coupled to the polymer in one step. The molecular weight of the poly-amino acids strongly depends on the solvent or the combination of
- 10 solvents, on the purity of the chemicals used and on the ratio of monomer/polymerisation initiator. Generally speaking, the higher the ratio monomer/polymerisation initiator, the higher the molecular weight of the polymer will be.

When a polymer of pre-defined composition should be prepared, the solid phase peptide synthesis method is preferably used.

- 15 Protective groups present in the repeating units of the polymer can be removed by aminolysis using an amino-alcohol such as 2-aminoethanol, 3-aminopropanol or 2,3-dihydroxypropylamine.

For example the preparation of PHEG with an incorporated stearylamine end group (hereinafter referred to as PHEG-stearylamine) consists of the following steps only: the N-carboxyanhydride of  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate (BLG) was polymerised by adding stearylamine

20 in a suitable solvent and the resulting polyBLG-stearylamine was converted into PHEG-stearylamine by subsequent aminolysis using 2-aminoethanol. By using stearylamine as initiator in two different solvents two batches of PBLG-stearylamine with a different molecular weight were obtained, which after aminolysis resulted in 2 batches of PHEG-stearylamine with 2 different molecular weights. The first polymerisation in ethylacetate/

25 dichloromethane gave PHEG-stearylamine with a molecular weight of 6,000 to 9,000. The second polymerisation in dimethylformamide gave PHEG-stearylamine with a molecular weight of 2,000 to 3,500.

- The colloidal carrier compositions of the invention include vesicular bilayer systems,
- 30 such as liposomes, niosomes and reversed vesicles, micellar systems, nanocapsules, nanospheres etc.. Preferred colloidal carrier systems are the vesicular bilayer systems.

On preparing liposomes the lipid-polymer-conjugate according to the invention is mixed with components, normally used in the preparation of liposomes, such as vesicle-forming

WO 02/098952

9

PCT/EP02/06783

- lipids, stabilisers etc.. The conjugate is included at a molar concentration sufficient to extend the blood circulation time of the liposomes several fold over that of corresponding liposomes lacking the polymer-lipid conjugate. The polymer conjugate is typically included at 1-15 mole percent, preferably at 3-10 mole percent and most preferably at 5-7.5 mole percent.
- The average size of the liposomes, to be determined by Dynamic Light Scattering (DLS) techniques, is below 200 nm, preferably below 150 nm and most preferably below 100 nm. The lower limit for this type of colloidal carrier particles is 20 nm.
- The polymer-lipid-conjugates, when incorporated into charged liposomes, showed the ability to reduce the zeta-potential, thus demonstrating that the polymer grafting shielded the surface charge.
- The compositions can be administered in several ways, but parenteral administration is preferred. Dependent on the active ingredient and on the medical indication or disorder to be treated, administration can be done by intravenous, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, intra-articular etc. injection.
- After intravenous administration of liposomal preparations in accordance with the present invention to rats it has been shown that the blood circulation time of the liposomes can be varied in accordance with the desired purpose. The blood circulation time is dependent on the lipid-polymer-conjugate used, in particular on the choice of the lipid/polymer combination, the molecular weight of the polymer and the grafting density. Results similar to those obtained with the corresponding PEG-grafted liposomes have been observed e.g. for lipid-PHEG-conjugates, lipid-PHEA-conjugates and lipid-PDLMS-conjugates, wherein the amphiphilic lipid contains a double hydrophobic tail (PHEG-diaminobutane DODASuc, PHEA-DODASuc and PDLMS-DODASuc).
- The stability of liposomal preparations, prepared with the lipid-polymer-conjugates in accordance with the present invention, is generally improved as compared to that of conventional liposomal preparations. In addition thereto the stability of the liposomal preparations can be further improved by the proper selection of the lipid-polymer-conjugate. It will be appreciated that this selection is also dependent on the choice of the active agent.
- E.g. encapsulation of a water soluble derivative of a corticosteroid instead of the corticosteroid per se into a liposomal preparation will result in an increased stability of the liposomal preparation. Encapsulation of prednisolone phosphate into a polyhydroxyethylasparagine-DODASuc-conjugate-containing liposome gave a slightly

better result than incorporation into a poly(2-hydroxyethyl)-L-glutamine-diaminobutane DODASuc-conjugate-containing liposome. A further improvement of the stability can be reached by removing the aqueous vehicle from the liposomal composition by methods well-known in the art, such as spray-drying, freeze-drying, rotational evaporation etc..

5       The lipid-polymer conjugates, incorporated into the colloidal carrier compositions according to the present invention, provide long-circulating properties to these compositions. Under long-circulating properties is to be understood an increase in blood circulation time of the colloidal carrier composition, as compared with such composition, not containing the lipid-polymer-conjugate. The long-circulating properties can be determined according to  
10       methods known in the art (Torchilin VP, Shtilman MI, Trubetskoy VS, Whiteman K, Milstein AM.: Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* (1994) 1195: 181-184; Torchilin VP, Trubetskoy VS, Whiteman KR, Caliceti P, Ferruti P, Verones FM.: New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo. *Journal of pharmaceutical sciences* (1995) 84 (9):  
15       1049-1053). For liposomes a method has been provided in the examples. Therefore, such compositions and especially the vesicular ones, can be used for a variety of applications. Except as a circulating drug reservoir, they can be used for passive targeting to sites of pathology (tumours, infection, inflammation) and for active targeting to cells in the bloodstream, to endothelium (e.g. to angiogenesis-related receptors), e.g. by coupling to  
20       homing devices, such as monoclonal antibodies. Further applications may be an artificial oxygen delivery system, blood-pool imaging and an anti-fouling coating for biomaterials, such as catheters and blood vessel prostheses.

In addition thereto the lipid-polymer-conjugates are biodegradable and therefore provide a lot of advantages, in particular due to the fact that there is no risk of accumulation in cells of  
25       the human or animal body.

Further the lipid-polymer-conjugates have shown that there is a reduced lipid-dose dependency as compared with PEG-liposomes.

Another additional, but very important advantage may be that an increased clearance after second injection of the compositions according to the invention is not always observed and  
30       that the reduction in blood circulation time is moderate. This would mean a significant advantage as compared to colloidal carrier compositions, coated with PEG.

The colloidal carrier compositions according to the present invention provide a variety of possibilities for use in therapy, diagnosis, prophylaxis etc.. Due to the versatility of the

WO 02/098952

11

PCT/EP02/06783

lipid-polymer-conjugates, the components of which can be selected in accordance with the purpose, and of the variety of colloidal carrier systems from which one can choose, it will be readily apparent that in general it will appear possible for every active agent to design an appropriate colloidal carrier composition. If in first instance after intravenous administration

5 of compositions according to the invention no or only a slight effect on the blood circulation time is observed, the person skilled in the art can vary a lot of different parameters in the lipid-polymer-conjugate (e.g. molecular weight, drafting density, polymer, lipid etc.) and in the composition of the colloidal carrier to increase the circulation time according to the standard set. A very interesting effect is seen when compositions according to the invention

10 contain a water soluble corticosteroid as the active agent. In an in vivo experimental arthritis model one single intravenous injection of such composition has appeared to be as effective as repeated injections of the non-encapsulated corticosteroid compound or when encapsulated in conventional liposomes. Interesting water soluble corticosteroids are budesonide phosphate and water soluble derivatives of flunisolide and fluticasone

15 propionate. The favourable effects may be a complete and long-lasting remission of arthritis-associated symptoms, whilst the side-effects associated with corticosteroid-based therapy will be reduced, due to a reduction in the amount of corticosteroids that has to be administered and because corticosteroids, which normally show a fast clearance from the blood, can now be used. Also in other diseases, in which corticosteroids are the drugs of

20 choice or are used as co-therapy, the beneficial effects of the compositions according to the present invention will be readily recognised. However, also other active agents show interesting effects in the compositions of the invention.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity and understanding, it will be readily apparent

25 to those of ordinary skill in the art in the light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the scope of the appended claims.

The following examples further illustrate the invention.

30

WO 02/098952

12

PCT/EP02/06783

## EXAMPLES

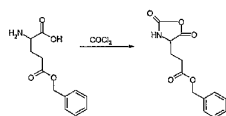
**Example 1****Poly-( $\gamma$ -Benzyl-L-glutamate) having a stearylamine end group (PBLG-stearylamine)**5 **1.1  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate N-carboxy anhydride**

The commercially available  $\gamma$ -benzyl-L-glutamic acid was converted into the N-carboxy anhydride as described by William D. Fuller et al, (Biopolymers 1976, 15(9), 1869-71) as follows:

7.0 g  $\gamma$ -Benzylglutamic acid (29.5 mmol) was suspended in 70 ml of dry tetrahydrofuran  
 10 and 22.4 ml of a 20% solution of phosgene in toluene was added at once. After stirring under nitrogen for 90 minutes at 65 °C the solution was cooled down to room temperature and subsequently added to 150 ml of petroleum ether 40/60. Then the mixture was put in a freezer overnight. The white crystalline product was filtered off and washed with petroleum ether 40/60. After drying, the product was recrystallised twice from tetrahydrofuran and  
 15 petroleum ether 40/60.

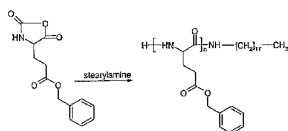
Yield: 6.0 g (77%), melting point: 95-97 °C.

Reaction:

**1.2. (PBLG-stearylamine)**

20 By using the primary amine, stearylamine, as initiator in two different solvents two batches of PBLG-stearylamine having different molecular weights were synthesised.

Reaction:



WO 02/098952

13

PCT/EP02/06783

Example solvent ethylacetate/dichloromethane.

500 mg (1.9 mmol) of  $\gamma$ -Benzyl-L-glutamate N-carboxy anhydride was dissolved in a mixture of 0.5 ml dry ethylacetate and 3 ml of dry dichloromethane. Subsequently 0.255 ml of a 0.37 molar solution (0.095 mmol) of stearylamine in dichloromethane was added. The flask was equipped with a  $\text{CaCl}_2$  tube and the mixture was stirred under nitrogen during 24 hours at room temperature. Then the mixture was added dropwise to methanol, the precipitated polymer was filtered off and dried in vacuo.

Yield: 376 mg PBLG-stearylamine

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) analysis showed that stearyl was present in the product:  $\text{CH}_3$  signal at  $\delta$  0.9 (t) and  $\text{CH}_2$  signal at  $\delta$  1.3-1.2. Other NMR results:

$\delta$  7.4-7.2  $\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\delta$  5.0  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\delta$  4.1-3.8  $\alpha\text{CH}$ , 2.7-1.8  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ .

Maldi TOF ms:

$m/z$  2045 ( $n=8$ ), 2263 ( $n=9$ ), 2482 ( $n=10$ ), corresponding to the masses of the sodium adduct (23 Da) with an incorporated stearylamine (269 Da) group. (Mass of the repeating benzylglutamic acid unit:  $n \times 219$  Da).

$m/z$  1499 ( $n=5$ ), 1719 ( $n=6$ ), 1938 ( $n=7$ ), 2156 ( $n=8$ ), 2375 ( $n=9$ ), 2594 ( $n=10$ ) corresponding to the masses of the sodium adduct with an incorporated stearylamine group and a cyclic peptide end group (112 Da).

Example solvent dimethylformamide.

To 500 mg (1.9 mmol) of  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate N-carboxy anhydride in 4 ml of dry dimethylformamide was added 0.255 ml of a 0.37 molar solution (0.095 mmol) of stearylamine in dichloromethane. The flask was equipped with a  $\text{CaCl}_2$  tube and the mixture was stirred under nitrogen during 24 hours at room temperature. Then the mixture was added dropwise to methanol, the precipitated polymer was filtered off and dried in vacuo.

Yield: 272 mg PBLG-stearylamine.

The  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) spectrum was almost identical to the previous one. The stearyl signals were also present in the product:  $\text{CH}_3$  signal at  $\delta$  0.9 (t) and  $\text{CH}_2$  signal at  $\delta$  1.3-1.2.

Maldi TOF ms:

$m/z$  1826 ( $n=7$ ), 2045 ( $n=8$ ), 2263 ( $n=9$ ), corresponding to the masses of the sodium adduct having a stearylamine group.

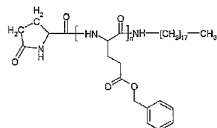
WO 02/098952

14

PCT/EP02/06783

$m/z$  1719 ( $n=6$ ), 1938 ( $n=7$ ), 2156 ( $n=8$ ), 2375 ( $n=9$ ), 2594 ( $n=10$ ) corresponding to the masses of the sodium adduct having a stearylamine group and a cyclic peptide end group.

Structure PBLG-stearylamine with a cyclic peptide end group:

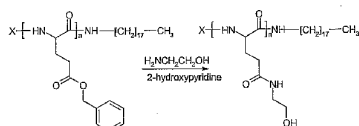


5

### Example 2

**Poly-[N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] having a stearylamine end group (PHEG-stearylamine) and a molecular weight of 6,000-9,000**

PHEG-stearylamine was synthesized by the aminolysis of PBLG-stearylamine using 2-aminoethanol and 2-hydroxypyridine (2-HP) (Literature: A. de Marre et al, Polymer 1994, 35(11), 2443-2446) according to the following reaction: (X=H or cyclic peptide):



287 mg (1.3 mmol) of PBLG-stearylamine, prepared as described in example 1 (solvent ethylacetate/dichloromethane), and 25 mg of 2-HP were dissolved in 3.8 ml of dimethylformamide and 1.63 ml of 2-aminoethanol was added. After stirring for 24 hour at 40 °C under nitrogen the solution was added to a mixture of ether and ethanol (4:1). The product was filtered off and dried in vacuum. Yield: 152 mg.

Finally the polypeptide was dissolved in water and purified by dialysis for 4 days in dialysis tube MWCO 2,000.

Yield: 80 mg.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4.2-4.1  $\alpha\text{CH}$ ,  $\delta$  3.6-3.4  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\delta$  3.2-3.1  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\delta$  2.3-2.1  $\gamma\text{CH}_2$ ,  $\delta$  2.0-1.8  $\beta\text{CH}_2$ ,  $\delta$  1.2-1.0, 16  $\text{CH}_2$  stearylamine,  $\delta$  0.8-0.6  $\text{CH}_3$  stearylamine.

On account of the intensity of the stearyl signals in the NMR spectrum a molecular weight of 6,000-9,000 was calculated.

20

WO 02/098952

15

PCT/EP02/06783

Maldi TOF ms:

Mass of the repeating hydroxyethylglutamic acid unit:  $n \times 172$ .

- 5  $m/z$  920 ( $n=3$ ), 1092 ( $n=4$ ), 1436 ( $n=6$ ), 1608 ( $n=7$ ), 1780 ( $n=8$ ), 1953 ( $n=9$ ), 2124 ( $n=10$ )  
corresponding to the masses of the sodium adduct having a stearylamine (269 Da) group and  
a cyclic peptide (112 Da) end group.  
 $m/z$  1108 ( $n=4$ ), 1452 ( $n=6$ ), corresponding to the masses of the potassium adduct (39 Da)  
having a stearylamine (269 Da) group and a cyclic peptide (112 Da) end group.

10

### Example 3

**Poly-[N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] having a stearylamine end group (PHEG-stearylamine) and a molecular weight of 2,000-3,500**

- 15 By applying the same aminolysis method as mentioned in example 2, 209 mg of PBLG-stearylamine prepared as described in example 1 (solvent dimethylformamide) gave 49 mg of PHEG-stearylamine.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ): identical to PHEG-stearylamine as prepared in example 2, with the exception that the intensity of the stearyl signals was somewhat higher in example 3.

- 20 On account of the intensity of the stearyl signals in the NMR spectrum a molecular weight of 2,000-3,500 was calculated.

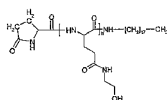
Maldi TOF ms:

- $m/z$  1092 ( $n=4$ ), 1264 ( $n=5$ ), 1436 ( $n=6$ ), 1608 ( $n=7$ ), 1780 ( $n=8$ ), 1953 ( $n=9$ ), 2125 ( $n=10$ )  
corresponding to the masses of the sodium adduct having a stearylamine (269 Da) group and  
a cyclic peptide (112 Da) end group.  
25  $m/z$  1108 ( $n=4$ ), 1280 ( $n=5$ ), 1452 ( $n=6$ ), 1624 ( $n=7$ ), 1796 ( $n=8$ ), 1969 ( $n=9$ ), 2141 ( $n=10$ ),  
corresponding to the masses of the potassium adduct having a stearylamine (269 Da) group  
and a cyclic peptide (112 Da) end group.

On account of the Maldi TOF ms and NMR results the following structure was proposed:

Structure PHEG-stearylamine:

30



WO 02/098952

16

PCT/EP02/06783

**Example 4****Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) having a heptadecyloctadecylamine end group (PBLG-heptadecyloctadecylamine)**

0.94 g (3.6 mmol)  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride (NCA) was dissolved in 5 ml dry DMF under a nitrogen atmosphere. A solution of 25 mg (0.05 mmol) 1-heptadecyloctadecylamine (Sigma Aldrich) in 1 ml dry chloroform was added at once. Almost immediately gas bubbles ( $\text{CO}_2$ ) were formed. The solution was stirred for 1 day at room temperature and then precipitated into a 10-20 fold excess of water. The white precipitate was collected and dried in vacuo. Yield: 0.75 g.

Characterization:

 $^1\text{H-NMR}$  in  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  in ppm relative to solvent peak):Benzylglutamate: 7.2 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.0 (benzylic  $\text{CH}_2$ ), 3.9 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 2.8 & 2.2 ( $\beta$  &  $\gamma$   $\text{CH}_2$ ),Alkyl chain: 1.2 ( $\text{CH}_2$  alkyl chain), 0.85 ( $\text{CH}_3$ )**Example 5****Poly(N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine) having a heptadecyloctadecylamine end group (PHEG-heptadecyloctadecylamine)**

To a solution of 0.60 g PBLG-heptadecyloctadecylamine (see above) in 5 ml dry DMF was added 0.15 g 2-hydroxypyridine and 0.8 ml ethanolamine. This solution was stirred for 3 days at room temperature under a nitrogen atmosphere. The solution was precipitated into a 10-20 fold excess of diethylether. The product was collected and dried in vacuo. The water-soluble polymeric product was dialysed against water in cellulose ester dialysis tubes (MWCO 500) for 2 days. Purified PHEG having the heptadecyloctadecyl end group was obtained after freeze-drying. Yield: 0.30 g.

Characterization:

 $^1\text{H-NMR}$  in  $\text{DMSO-d}_6$  ( $\delta$  in ppm relative to solvent peak):Hydroxyethylglutamine: 4.1 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 2.2 & 1.8-1.9 ( $\beta$  &  $\gamma$   $\text{CH}_2$ ), 3.4 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 3.1 ( $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ),Alkyl chain: 1.2 ( $\text{CH}_2$  alkyl chain), 0.8 ( $\text{CH}_3$ ).From the ratio of integrals of the stearyl signals and the  $\alpha\text{-CH}$  signal the PHEG molecular weight was estimated to be 12,000.

WO 02/098952

17

PCT/EP02/06783

**Example 6****Poly-[N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] having a distearylamine end group introduced via N-Boc-1,4-diaminobutane as initiator (PHEG-diaminobutane-DODASuc)**

2.5 g (9.5 mmol)  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride was dissolved in a mixture of 2.5 ml of dry ethylacetate and 12.5 ml of dry dichloromethane, and 0.95 ml (0.95 mmol) of a 1 molar solution of N-Boc-1,4-diaminobutane in dichloromethane as initiator was added. The mixture was stirred for 3 days under nitrogen at room temperature and then precipitated in methanol. Yield: 1.48 g PBLG-N-Boc-diaminobutane.

The  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) spectrum showed N-Boc-1,4-diaminobutane signals at  $\delta$  1.4-1.3.

Maldi TOF ms:

Mass of the repeating benzylglutamic acid unit:  $n \times 219$ .

$m/z$  1417 ( $n=5$ ), 1636 ( $n=6$ ), 1855 ( $n=7$ ), 2074 ( $n=8$ ), corresponding to the masses of the sodium adduct with an N-Boc-1,4-diaminobutane (187 Da) group and a cyclic peptide end group (112 Da).

$m/z$  1433 ( $n=5$ ), 1652 ( $n=6$ ), 1872 ( $n=7$ ) corresponding to the masses of the potassium adduct with an N-Boc-1,4-diaminobutane (187 Da) group and a cyclic peptide end group (112 Da).

Deprotection of PBLG-N-Boc-diaminobutane.

738 mg of PBLG-N-Boc-diaminobutane was stirred during 3.5 hours in 5 ml of a solution of 4N HCl in dioxane. Subsequently the reaction mixture was evaporated on a Rotavap. The residue was dissolved in 5 ml of tetrahydrofuran and added dropwise to 80 ml of a  $\text{NaHCO}_3$  solution (6.5 g in water). The product was filtered off, washed with water and dried in vacuum. Yield: 677 mg PBLG-diaminobutane.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) showed that the protective group was successfully removed.

Maldi TOF mass analysis showed the desired molmasses.

Mass of the repeating benzylglutamic acid unit:  $n \times 219$ .

$m/z$  1318 ( $n=5$ ), 1537 ( $n=6$ ), 1756 ( $n=7$ ), 1976 ( $n=8$ ), corresponding to the masses of the sodium adduct with a 1,4-diaminobutane (87 Da) group and a cyclic peptide end group (112 Da).

Coupling to DODASuc:

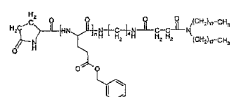
WO 02/098952

18 18

PCT/EP02/06783

- 62 mg (0.1 mmol) of N-succinyl-dioctadecylamine (DODASuc, Schmitt et al, J. Am. Chem. Soc.1994, 116, 19, 8485-8491), 13.7 mg (0.12 mmol) of N-hydroxysuccinimide and 0.66 mg of dimethylaminopyridine (DMAP) were dissolved in 2 ml of dichloromethane. After cooling to 0 °C 24.6 mg (0.12 mmol) of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) was added.
- 5 The solution was stirred for 1 hour at 0 °C and overnight at room temperature. Then the insoluble dicyclohexylurea was filtered off, and the filtrate was added to a solution of 200 mg PBLG-diaminobutane in 3 ml of dichloromethane and 14 µl of triethylamine. After stirring overnight at room temperature the solution was added dropwise to methanol, filtrated and dried. Yield: 135 mg. The <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) spectrum showed that distearyl
- 10 was present, CH<sub>2</sub> signals at δ 1.4-1.2 and CH<sub>3</sub> signals at δ 0.9-0.8.
- Maldi TOF mass analysis showed the desired molmasses indicating that DODASuc was coupled to PBLG-diaminobutane.
- m/z* 1922 (n=5), 2141 (n=6), 2360 (n=7), 2580 (n=8), 2799 (n=9), 3018 (n=10). corresponding to the masses of the sodium adduct of PBLG-diaminobutane-DODASuc, with
- 15 a cyclic peptide end group (112 Da).

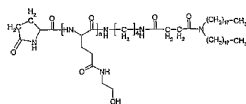
Structure:



Aminolysis.

- 120 mg of PBLG-diaminobutane DODASuc and 10.8 mg of 2-HP were dissolved in 1.3 ml of dimethylformamide and 0.68 ml of 2-aminoethanol was added. After stirring for 24 hours
- 20 at 40 °C under nitrogen the solution was added dropwise to chloroform. The product was filtered off and dried in vacuum. Yield: 83 mg PHEG-diaminobutane-DODASuc.
- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO) showed distearyl signals at δ 1.2-1.4 (CH<sub>2</sub>) and δ 0.8-0.9 (CH<sub>3</sub>).
- From the ratio of integrals of the stearyl signals and the α-CH signal the PHEG molecular
- 25 weight was estimated to be 4,000.

Structure:



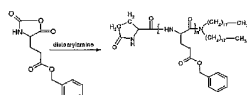
WO 02/098952

19

PCT/EP02/06783

**Example 7****Poly-(N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine having an amine end group introduced by distearylamine as initiator (PHEG-distearylamine)**

- 5 1.0 g (3.8 mmol)  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride was dissolved in a mixture of 1 ml dry ethylacetate and 5 ml of dry chloroform. Subsequently 2 ml (0.19 mmol) of a solution of 163 mg distearylamine in 3.26 ml of chloroform was added. The flask was equipped with a  $\text{CaCl}_2$  tube and the mixture was stirred under nitrogen during 4 days at
- 10 room temperature. The mixture was added dropwise to methanol, the polymer was isolated by filtration and dried in vacuo. Yield: 757 mg PBLG-distearylamine.

*Reaction:*

- 15  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) analysis showed the distearyl signals in the product:  $\text{CH}_3$  signal at  $\delta$  0.9 (t) and  $\text{CH}_2$  signal at  $\delta$  1.3-1.2.

*Maldi TOF ms:*Mass of the repeating benzylglutamic acid unit:  $n \times 219$ .

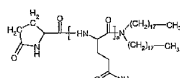
- $m/z$  1971 ( $n=6$ ), 2190 ( $n=7$ ), 2410 ( $n=8$ ), 2629 ( $n=9$ ), 2848 ( $n=10$ ) corresponding to the
- 20 masses of the sodium adduct with a distearylamine (521 Da) group and a cyclic peptide end group (112 Da).

$m/z$  2206 ( $n=7$ ), 2427 ( $n=8$ ), corresponding to the masses of the potassium adduct with a distearylamine (521 Da) group and a cyclic peptide end group (112 Da).

- 25 *Aminolysis*

Aminolysis of the above prepared PBLG-distearylamine (600 mg) with aminoethanol and 2-hydroxypyridine as catalyst in dimethylformamide gave 430 mg of PHEG-distearylamine.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ) showed the distearylamine signals.

*Structure:*

WO 02/098952

20

PCT/EP02/06783

**Example 8****Poly-[N-(hydroxyalkyl)-L-glutamine] having a diaminobutane DODASuc endgroup**

## 5 PBLG-diaminobutaneBOC:

To a solution of 3 g benzyl-L- $\gamma$ -glutamate N-carboxyanhydride (NCA) in 8 ml dry DMF was added a solution of 0.1 g N-BOC-1,4-diaminobutane in 1 ml of chloroform. Formation of gas (carbon dioxide) was noticed during the first hours. This solution was stirred for 1 day under a nitrogen atmosphere at room temperature. After precipitation into ca. 100 ml

10 methanol the polymer was filtered off and dried, yielding 2 g PBLG containing a BOC-protected amino group.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$  relative to solvent peak):

BOC: 1.4 ( $\text{CH}_3$ )

PBLG: 2.2 & 2.6 ( $\beta,\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.0 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 5.0 (benzyl  $\text{CH}_2$ ), 7.3 (phenyl)

15

PBLG-diaminobutane (removal protective BOC group):

A solution of 1.1 g PBLG-diaminobutaneBOC in 5 ml 4N HCl/dioxane was stirred for 3-4 hours and then added dropwise to ca. 80 ml  $\text{NaHCO}_3$  solution (6.5 g in water). The product was filtered off, washed with water and dried in vacuo. Yield: 1 g PBLG-

20 diaminobutane.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$  relative to solvent peak):

PBLG: 2.2 & 2.6 ( $\beta,\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.0 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 5.0 (benzyl  $\text{CH}_2$ ), 7.3 (phenyl)

BOC signals absent

## 25 PBLG-diaminobutane DODASuc (DCC coupling):

170 mg N-succinyl-dioctadecylamine (DODASuc), 90 mg DCC and 10 mg 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluene sulphonate (DPTS) were dissolved in 4 ml dichloromethane. The solution was stirred for 1 hour at room temperature. A solution of 0.73 g PBLG-diaminobutane and 40  $\mu\text{l}$  triethylamine in 3 ml chloroform was added. After stirring

30 overnight at room temperature the solution (containing dicyclohexylurea precipitate) was added dropwise to an excess of methanol (ca. 100 ml). The polymeric product was filtered off and dried. Yield: 0.5 g.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$  relative to solvent peak):

WO 02/098952

21

PCT/EP02/06783

distearyl signals at 0.8-0.9 ( $CH_3$ ) and 1.2-1.4 (methylene protons)  
 PBLG: 2.2 & 2.6 ( $\beta, \gamma$ - $CH_2$ ), 4.0 ( $\alpha$ -CH), 5.0 (benzyl  $CH_2$ ), 7.3 (phenyl)

### 8.1 PHEG-diaminobutane DODASuc

- 5 PHEG-diaminobutane DODASuc was obtained by aminolysis of PBLG-diaminobutane DODASuc with ethanolamine as follows:  
 0.5 g PBLG-diaminobutane DODASuc and 15 mg 2-hydroxypyridine were dissolved in 4 ml DMF. Then 2 ml ethanolamine was added. After stirring for 24 hours at 40 °C under a nitrogen atmosphere the solution was precipitated into ca. 100 ml diethylether. PHEG-diaminobutane DODASuc was dissolved in water, dialyzed (MWCO 500) and subsequently freeze-dried yielding 0.35 g purified PHEG diaminobutane DODASuc conjugate.  
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) ( $\delta$  relative to solvent peak):  
 distearyl signals at 0.8-0.85 ( $CH_3$ ) and 1.2-1.5 (methylene protons)  
 PHEG: 1.7-2.2 ( $\beta, \gamma$ - $CH_2$ ), 3.1 & 3.3 (hydroxyethyl), 4.2 ( $\alpha$ -CH), 4.7 (OH), 7.8 & 8.2 (NH)  
 15 From the ratio of the integrals of the distearyl signals and the  $\alpha$ -CH signal the PHEG molecular weight was calculated to be ca. 4000.  
 Maldi-TOF confirms the molecular structure of the PHEG-diaminobutane DODASuc conjugate.  
 Na<sup>+</sup>-adduct: m/z 3064.5 (n=13), 3236.1 (n=14), 3408.7 (n=15), 3580.6 (n=16), 3752.9  
 20 (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), etc.

### 8.2 Poly-[(2-hydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc

- Poly-[(2-hydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc was obtained by  
 25 aminolysis of PBLG-diaminobutane DODASuc with 2-propanolamine (isopropanolamine) as follows:  
 0.15 g PBLG-diaminobutane DODASuc and 0.05 g 2-hydroxypyridine were dissolved in 4 ml DMF. Then 1 ml 2-propanolamine was added. After stirring for 24 hours at 40 °C under nitrogen atmosphere the solution was precipitated into ca. 100 ml diethylether. 0.1 g  
 30 PHisoPG-diaminobutane DODASuc was obtained after drying. Polymer was dissolved in water, dialyzed (MWCO 500) and subsequently freeze-dried yielding purified poly-[(2-hydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc.

WO 02/098952

22

PCT/EP02/06783

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ relative to solvent peak):

distearyl signals at 0.8-0.85 (CH<sub>3</sub>) and 1.2-1.5 (methylene protons)

PHPG: 1.7-2.2 (β,γ-CH<sub>2</sub>), 1.0 (CH<sub>3</sub>) & 3.0 & 3.3 & 3.7 (hydroxypropyl), 4.2 (α-CH), 4.7 (OH), 7.8 & 8.2 (NH).

5 Calculated molecular weight: ca. 4000.

### **8.3 Poly-[(3-hydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc**

Poly-[(3-hydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc was obtained by aminolysis of PBLG-diaminobutane DODASuc with 3-propanolamine:

10 0.3 g PBLG-diaminobutane DODASuc and 0.1 g 2-hydroxypyridine were dissolved in 4 ml DMF. Then 2 ml 3-propanolamine was added. After stirring for 24 hours at 40 °C under nitrogen atmosphere the solution was precipitated into ca. 100 ml diethylether. 0.25 g PHPG5000-diaminobutane DODASuc was obtained after drying. Polymer was dissolved in water, dialyzed (MWCO 500) and subsequently freeze-dried yielding purified poly-[(3-

15 hydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ relative to solvent peak):

distearyl signals at 0.8-0.85 (CH<sub>3</sub>) and 1.2-1.5 (methylene protons)

PHPG: 1.7-2.2 (β,γ-CH<sub>2</sub>), 1.5 & 3.1 & 3.3 (hydroxypropyl), 4.2 (α-CH), 4.6 (OH), 7.8 & 8.2 (NH).

20 Molecular weight: ca. 5000.

Maldi-TOF:

Na<sup>+</sup>-adduct: m/z 3623 (n=15), 3810 (n=16), 3996 (n=17), 4182 (n=18), 4368 (n=19), 4555 (n=20), etc.

### **8.4 Poly-[(4-hydroxybutyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc**

Poly-[(4-hydroxybutyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc was obtained by aminolysis of PBLG-diaminobutane DODASuc with 4-butanolamine:

0.3 g PBLG-diaminobutane DODASuc and 0.1 g 2-hydroxypyridine were dissolved in 4 ml DMF. Then 2 ml 4-butanolamine was added. After stirring for 48 hours at 40 °C under nitrogen atmosphere the solution was precipitated into ca. 100 ml diethylether. Polymer was dissolved in water, dialyzed (MWCO 500) and subsequently freeze-dried yielding 0.2 g purified poly-[(4-hydroxybutyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc.

30

WO 02/098952

23

PCT/EP02/06783

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ relative to solvent peak):

distearyl signals at 0.8-0.85 (CH<sub>3</sub>) and 1.2-1.5 (methylene protons)

PHBG: 1.7-2.2 (β,γ-CH<sub>2</sub>), 1.4 & 3.1 & 3.3 (hydroxybutyl), 4.2 (α-CH), 4.5 (OH), 7.8 & 8.2 (NH).

5 Molecular weight: ca. 4000

#### **8.5 Poly-[(2,3-dihydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc**

Poly-[(2,3-dihydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc was obtained by aminolysis of PBLG-diaminobutane DODASuc with 2,3-dihydroxypropylamine:

10 0.15 g PBLG-diaminobutane DODASuc and 0.06 g 2-hydroxypyridine were dissolved in 3 ml DMF. Then 1 ml 2,3-dihydroxypropylamine was added. After stirring for 1 day at 40 °C under nitrogen atmosphere the solution was precipitated into ca. 100 ml diethylether. Polymer was dissolved in water, dialyzed (MWCO 500) and subsequently freeze-dried yielding 0.1 g purified poly-[(2,3-dihydroxypropyl)-L-glutamine] diaminobutane DODASuc.

15 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ relative to solvent peak):

distearyl signals at 0.8-0.85 (CH<sub>3</sub>) and 1.2-1.5 (methylene protons)

Poly(dihydroxypropyl)G: 1.7-2.2 (β,γ-CH<sub>2</sub>), 3.1 & 3.3-3.6 (dihydroxypropyl), 4.2 (α-CH), 4.6 & 4.8 (OH), 7.8 & 8.2 (NH).

Molecular weight: ca. 4000.

20

#### **Example 9**

##### **Cholesteryl-PHEG**

To a solution of 0.2 g PBLG-NH<sub>2</sub> and 20 μl triethylamine in 2 ml chloroform was added a solution of 0.07 g cholesteryl chloroformate in 1 ml chloroform. The solution was stirred for  
25 ca. one hour at room temperature and then precipitated into diethyl ether. After collecting and drying 0.13 g polymeric product was obtained.

Aminolysis with ethanolamine (2-hydroxypyridine in the role of catalyst) for 1 day at 40 °C yielded cholesteryl-PHEG. The polymeric product was purified by dialysis (MWCO 500).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ relative to solvent peak):

30 PHEG: 1.7-2.2 (β,γ-CH<sub>2</sub>), 3.1 & 3.3 (hydroxyethyl), 4.2 (α-CH), 4.7 (OH), 7.8 & 8.2 (NH)  
cholesteryl: 0.6-1.6.

Molecular weight: ca. 4000.

WO 02/098952

24

PCT/EP02/06783

Maldi TOF confirms the molecular structure of the cholesteryl-PHEG conjugate

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

#### 5 **Example 10**

##### **Poly(2-hydroxyethyl)-DL-glutamine diaminobutane DODASuc**

The synthesis is analogous to that of poly(2-hydroxyethyl)-L-glutamine diaminobutane DODASuc (example 8), however differing in a few details:

- 10  $\gamma$ -Benzyl-DL-glutamine NCA was synthesized from a 1:1 mixture of  $\gamma$ -benzyl-L- and  $\gamma$ -benzyl-D-glutamate and crystallized from ethylacetate/hexane (ca. 1:5) (see example 1).
- Poly(benzyl-DL-glutamine) diaminobutane BOC was precipitated into water instead of methanol.
- Poly(benzyl-DL-glutamine) diaminobutane DODASuc was precipitated into methanol.
- 15 NMR spectrum is virtually identical to that of poly(2-hydroxyethyl)-L-glutamine diaminobutane DODASuc (example 8.1).
- Molecular weight: ca. 3000.

#### **Example 11**

##### **PHEG copolymers: poly(HEG-co-glutamic acid) diaminobutane DODASuc; 5% glutamic acid**

- 20 A solution of 0.14 g PBLG diaminobutane DODASuc, 0.05 g 2-hydroxypyridine, ca. 1 ml ethanolamine in 1.5 ml DMF was stirred under a nitrogen atmosphere for one day at room temperature. The solution was then precipitated into diethylether. The product, partially ethanolamine-aminolyzed PBLG diaminobutane DODASuc (PHEG with 5% benzyl ester
- 25 side groups), was collected and dried. NMR recorded in DMSO revealed the presence of 5% unreacted benzyl groups.
- Said polymer was dissolved in 8.5 ml 1 M NaOH and stirred for 4 hours. The solution was neutralized with 1 N HCl, and then dialyzed (MWCO 500) for a few days. The negatively charged (at physiological pH) copolymer-lipid-conjugate (0.1 g) was obtained after freeze-
- 30 drying the dialyzed solution.
- NMR in DMSO showed full conversion of benzyl groups.
- MaldiTOF was used to confirm the presence of both glutamic acid and hydroxyethylglutamine repeating units.

WO 02/098952

25

PCT/EP02/06783

Molecular weight: ca. 3500.

#### Example 12

**PHEG copolymer: poly(HEG-co-dimethylaminoethylglutamine) diaminobutane**

#### 5 **DODASuc; 5 % dimethylaminoethyl sidegroups**

A solution of 0.25 g PBLG diaminobutane DODASuc, 0.08 g 2-hydroxypyridine, and 1 ml ethanolamine in 2.5 ml DMF was stirred under a nitrogen atmosphere for two days at room temperature. The resulting solution was precipitated into diethylether. The partially ethanolamine-aminolyzed PBLG diaminobutane DODASuc (PHEG with 5 % benzyl ester side groups) was collected and dried. NMR recorded in CDCl<sub>3</sub> revealed the presence of 5 % unreacted benzyl groups.

A solution of 0.16 g of this partially ethanolamine-aminolyzed PBLG diaminobutane DODASuc, 0.06 g 2-hydroxypyridine, 1 ml N,N-dimethylethylenediamine in 2.5 ml DMF was stirred for 1 day under a nitrogen atmosphere at 40 °C. Precipitation into diethylether gave a powder that was collected and dried in vacuo. NMR in DMSO showed full conversion of the remaining benzyl groups. Product was dissolved in water and dialyzed (MWCO 500) for a few days and subsequently freeze-dried. Yield: 0.1 g of positively charged PHEG copolymer-lipid-conjugate.

Molecular weight: ca. 4000.

20

#### Example 13

**Poly(2-hydroxyethyl)-L-asparagine (PHEA) having a stearylamine and heptadecyloctadecylamine end group, respectively**

β-benzyl-L-aspartate N-carboxyanhydride (NCA):

25 A suspension of 5 g β-benzyl L-aspartate in 50 ml distilled THF containing ca. 16 ml of a 20 % phosgene solution in toluene was heated at 60-65 °C (stream of nitrogen gas over the solution). After ca.10 minutes a clear solution was obtained. After ca. 1.5 hours the solution was slowly poured into ca. 140 ml n-hexane. Crystals were formed almost immediately. After further crystallization during one night at -20 °C the NCA crystalline product was isolated. Further crystallizations from THF/hexane and from hot chloroform yielded 4.3 g fine needles. (Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) (δ relative to solvent peak):

benzyl group: 7.3 (Phenyl), 5.1 (CH<sub>2</sub>)

WO 02/098952

26

PCT/EP02/06783

aspartate NCA: 2.8 & 3.0 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 4.5 ( $\alpha$ -CH), 6.4 (NH)

stearyl-PBLA:

- 5 To a solution of 0.95 g  $\beta$ -benzyl L-aspartate NCA in 2 ml DMF was added a solution of 0.04 g stearylamine in 0.5 ml chloroform. After stirring for several hours at 60 °C the cloudy solution was precipitated into methanol. After drying 0.56 g poly(benzyl L-aspartate) stearylamine was obtained.

heptadecyl octadecyl-PBLA:

- 10 To a solution of 0.5 g  $\beta$ -benzyl L-aspartate NCA in 2 ml DMF was added 0.1 g 1-heptadecyl octadecylamine in ca. 1 ml chloroform. After stirring for 3 days at room temperature the cloudy solution was precipitated into methanol. Yield: 0.2 g polymeric product PBLA-heptadecyl octadecyl amine.

- 15 stearyl/heptadecyl octadecyl-PHEA:

Aminolysis of the above PBLA-conjugates using ethanolamine and 2-hydroxypyridine as a catalyst at 40 °C for 1 day, followed by precipitation into diethyl ether, yields the water-soluble poly(hydroxyethyl) L-asparagine (PHEA), containing a stearyl or a heptadecyl octadecyl tail respectively. The lipid-polymer-conjugates were purified by dialysis (MWCO 20 500).

stearyl-PHEA:

Maldi TOF: Na<sup>+</sup> adduct  $m/z$  2823 (n=16), 2981 (n=17), 3139 (n=18), 3297 (n=19), 3455 (n=20), 3613 (n=21), etc.

From Maldi TOF it was concluded that each PHEA chain contains a free amino end group.

- 25 heptadecyl octadecyl-PHEA:

NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) ( $\delta$  relative to solvent peak):

heptadecyl octadecyl: 0.8 & 1.2

PHEA: 2.2-2.6 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 3.1 & 3.4 (hydroxyethyl), 4.5 (OH +  $\alpha$ -CH), 7.8 & 8.3 (NH)

Molecular weights: ca. 6000.

30

#### Example 14

#### Poly(2-hydroxyethyl)-L-asparagine DODASuc

WO 02/098952

27

PCT/EP02/06783

**PBLA DODASuc:**

To a solution of 1.7 g  $\beta$ -benzyl L-aspartate N-carboxyanhydride (NCA) in 5 ml DMF was added 0.2 ml of a 2 M solution of methylamine in THF. The clear solution was stirred for one day and then precipitated into a mixture of methanol (ca. 100 ml) and water (250 ml).

- 5 Yield 1.3 g PBLA, containing a methyl amide and an amino end group.

A solution of 0.4 g PBLA, 30 mg DCC, 10 mg DPTS and 100 mg N-succinyl-distearylamine in 5 ml DMSO and 1 ml chloroform was stirred for one day and then precipitated into water. Polymeric product was stirred/washed with diethyl ether and dried.

- 10 PHEA DODASuc

Aminolysis of PBLA DODASuc with ethanolamine (using 2-hydroxypyridine as a catalyst) in DMF solution at 40 °C for 1 day yielded PHEA DODASuc (0.2 g after dialysis and freeze-drying).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) ( $\delta$  relative to solvent peak):

- 15 distearyl: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.4 (CH<sub>2</sub>-N)

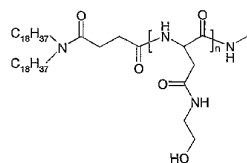
PHEA: 2.4-2.8 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 3.2 & 3.4 (hydroxyethyl), 4.6 ( $\alpha$ -CH + OH), 7.8-8.5 (NH)

Calculated molecular weight: ca. 3000.

Maldi TOF confirms the molecular structure of the PHEA DODASuc conjugate:

Na<sup>+</sup>-adduct: *m/z* 2084 (n=9), 2243 (n=10), 2401 (n=11), 2559 (n=12), 2718 (n=13), 2876

- 20 (n=14), etc.

**Example 15****Poly(2-hydroxyethyl)-L-asparagine DSPEsuc conjugate**

- 25 Amino-terminated PHEA was obtained after aminolysis of PBLA (polybenzyl-L-aspartate), obtained from the methylamine-initiated polymerization of benzyl-L-aspartate NCA. Succinylated DSPE (synthesis analogous to the one described for DPPE in JACS, 116, 8485 (1994)) was first converted to its NHS ester in-situ using DCC (dicyclohexylcarbodiimide):

WO 02/098952

28

PCT/EP02/06783

- A solution of 70 mg succinylated DSPE, 20 mg NHS (N-hydroxysuccinimide), 5 mg DMAP and 30 mg DCC (dicyclohexylcarbodiimide) in 2 ml dichloromethane was stirred for ca. 3-4 hours. To this mixture was added a solution of 0.13 g of the amino-terminated PHEA (molecular weight ca. 4000) in 2 ml DMSO. After stirring overnight the mixture was precipitated into ether. The precipitate was collected and dissolved in water and dialyzed (MWCO 500) for a few days. After freeze-drying ca. 80 mg PHEA-DSPE was obtained.
- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ relative to solvent peak):
- DSPE: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.4 (CH<sub>2</sub>-N)
- PHEA: 2.4-2.8 (β-CH<sub>2</sub>), 3.2 & 3.4 (hydroxyethyl), 4.6 (α-CH + OH), 7.8-8.4 (NH)
- 10 Calculated molecular weight: ca. 4000

**Example 16****Poly(DL-serine) DODASuc**

O-benzyl-DL-serine N-carboxyanhydride (NCA):

- 15 A suspension of 2.5 g O-benzyl-DL-serine in 30 ml distilled (dry) THF containing ca. 10 ml of a 20 % phosgene solution in toluene was heated at 60-65 °C (stream of nitrogen gas over the solution). After ca. 5 minutes a clear solution was obtained. After ca. 1.5 hours the solution was slowly poured into ca. 100 ml n-hexane. The product separated as an oil. The solvent was decanted and the oil was dissolved in ca. 25 ml ethylacetate to which 100 ml
- 20 hexane was slowly added. After violently shaking the flask and refrigerating at -20 °C O-benzyl-DL-serine NCA started to crystallize. Similar recrystallizations from ethylacetate/hexane and/or from chloroform/hexane yielded 2 g crystalline material. (Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71)
- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) (δ relative to solvent peak):
- 25 benzyl group: 4.5 (CH<sub>2</sub>), 7.2 (Phenyl)
- serine NCA: 3.7 (β-CH<sub>2</sub>), 4.4 (α-CH), 5.8 (NH)

poly(O-benzyl-DL-serine):

- To a solution of 0.9 g O-benzyl-DL-serine NCA in 2.5 ml DMF was added 0.08 ml of a solution of 2 M methylamine in THF. After stirring for several hours at room temperature the solution became cloudy and viscous. After 1 day the viscous, "crystallized" solution was mixed with methanol/water to precipitate the polymeric product completely. Yield: 0.6 g polymeric product poly(O-benzyl-DL-serine).
- 30

WO 02/098952

29

PCT/EP02/06783

<sup>1</sup>H-NMR in DMSO-d<sub>6</sub> (δ relative to solvent peak):

benzyl groups: 4.4 (CH<sub>2</sub>), 7.2 (Phenyl)

polyserine: 3.5 (β-CH<sub>2</sub>), 4.7 (α-CH), 8.2 (NH)

5 Poly(O-benzyl-DL-serine) DODASuc:

150 mg N-succinyl-dioctadecylamine (DODASuc), 80 mg DCC and 5 mg DPTS were dissolved in 4 ml chloroform. The solution was stirred for 1 hour at room temperature. A solution of 0.6 g poly(O-benzyl-DL-serine) and ca. 50 μl triethylamine in ca. 5 ml chloroform was added. After stirring overnight at room temperature the solution (containing dicyclohexylurea precipitate) was added dropwise to an excess of methanol (ca. 100 ml). The polymeric product was filtered off and dried. Yield: 0.4 g.

<sup>1</sup>H-NMR in DMSO-d<sub>6</sub> (δ relative to solvent peak):

distearyl: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.6 (CH<sub>2</sub>-N)

benzyl groups: 4.4 (CH<sub>2</sub>), 7.2 (Phenyl)

15 polyserine: 3.5 (β-CH<sub>2</sub>), 4.7 (α-CH), 8.2 (NH)

Poly(DL-serine) DODASuc:

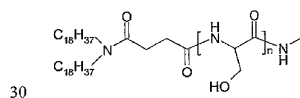
0.1 g poly(O-benzyl-DL-serine) DODASuc was dissolved in ca. 4 ml of a 33% HBr/AcOH solution and stirred for 1 hour. The solution was then precipitated into water. The polymeric precipitate was filtered off, washed with water, collected and subsequently dissolved (1-2 hours) in 4 ml 1M NaOH. The resulting solution was neutralized with 1 N HCl solution, and then dialyzed (MWCO 500) for several days. The dialyzed solution was freeze dried. Yield: 20 mg poly(DL-serine) DODASuc.

<sup>1</sup>H-NMR in DMSO-d<sub>6</sub> (δ relative to solvent peak):

25 distearyl: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.6 (CH<sub>2</sub>-N)

polyserine: 3.6 (β-CH<sub>2</sub>), 4.3(OH), 5.0 (α-CH), 8.0 (NH)

From the ratio of integrals of the distearyl signals and the α-CH signal the polyserine molecular weight was calculated to be ca. 1500.



WO 02/098952

30

PCT/EP02/06783

**Example 17****Poly-L-threonine DODASuc**

The synthesis is analogous to the synthesis of poly(D,L-serine) DODASuc and was done via

- 5 O-benzyl-L-threonine N-carboxyanhydride (NCA), starting from O-benzyl-L-threonine.HCl and phosgene.

Poly-L-threonine DODASuc(M = ca. 2000):

<sup>1</sup>H-NMR in DMSO-d<sub>6</sub> (δ relative to solvent peak):

diasteryl: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.6 (CH<sub>2</sub>-N)

- 10 polythreonine: 1.0 (CH<sub>3</sub>), 4.0 (β-CH), 4.3(α-CH), 5.0(OH), 7.8 (NH)

**Example 18****Poly(D,L-methionine sulfoxide) DODASuc**

DL-methionine N-carboxyanhydride (NCA):

- 15 A suspension of 2.5 g DL-methionine in 40 ml distilled (dry) THF containing ca. 15 ml of a 20 % phosgene solution in toluene was heated at 60-65 °C. (Stream of nitrogen gas over the solution.). Almost immediately a clear solution was formed. After ca. 1 hour the solution was slowly poured into ca. 140 ml n-hexane. DL-methionine NCA was crystallized at -20 °C (takes a few days). Recrystallization from ethylacetate/hexane yielded ca. 0.7 g crystalline
- 20 material. (Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) (δ relative to solvent peak):

methionine NCA: 2.0-2.4 (β-CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>), 4.5(α-CH), 6.8 (NH)

poly(DL-methionine):

- 25 To a solution of 0.7 g DL-methionine NCA in 2.5 ml DMF was added 0.1 ml of a solution of 2 M methylamine in THF. After 1 day the cloudy solution was precipitated into ca. 100 ml methanol and subsequently dried. Yield: 0.33 g polymeric product poly (DL-methionine).

<sup>1</sup>H-NMR in CDCl<sub>3</sub>/TF-d (δ relative to solvent peak):

polymethionine: 2.0-2.3 (CH<sub>2</sub> & CH<sub>3</sub>), 2.6 (CH<sub>2</sub>), 4.7 (α-CH).

30

Poly(DL-methionine) DODASuc:

80 mg N-succinyl-diocetadecylamine (DODASuc), 45 mg DCC and 5 mg DPTS were dissolved in 2 ml chloroform. The solution was stirred for 1 hour at room temperature. A

WO 02/098952

31

PCT/EP02/06783

solution of 0.33 g poly(DL-methionine) and ca. 20  $\mu$ l triethylamine in ca. 2.5 ml DMSO was added. After stirring overnight at room temperature the solution (containing dicyclohexylurea precipitate) was added dropwise to an excess of methanol (ca. 100 ml). The polymeric product was filtered off and dried. Yield: 0.22 g.

5  $^1\text{H-NMR}$  in DMSO- $d_6$  ( $\delta$  relative to solvent peak):

distearyl: 0.8 ( $\text{CH}_3$ ), 1.2 ( $\text{CH}_2$ ), 1.4 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ )

polymethionine: 1.8 ( $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.0 ( $\text{CH}_3$ ), 2.4 ( $\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.4 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 8.1 (NH)

Poly(DL-methionine sulfoxide) DODASuc:

10 mono-oxidation of poly(DL-methionine) DODASuc:

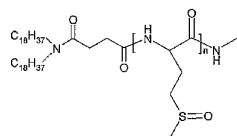
A solution of 0.3 g sodium periodate in 2 ml water was slowly added to a suspension of 0.22 g poly(DL-methionine) diaminobutane DODASuc in ca. 6 ml acetic acid. The resulting orange/red solution (which was formed after a few hours) was stirred for 1 night. Then ca. 15 ml water was added and the resulting orange/red solution was dialyzed (MWCO 500) for several days. After freeze-drying 0.25 g product was obtained.

$^1\text{H-NMR}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta$  relative to solvent peak):

distearyl: 0.7 ( $\text{CH}_3$ ), 1.2 ( $\text{CH}_2$ ) (broad peaks)

polymethionine sulfoxide: 2.0 ( $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.5 ( $\text{CH}_3$ ), 2.8 ( $\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.3 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 8.5 (NH)

Calculated molecular weight: ca. 4000.



20

#### Example 19

##### Poly(DL-glutamine) DODASuc

A poly(DL-glutamine) DODASuc conjugate was synthesized by Ansynth Service B.V. using a solid phase peptide synthesis method (ca. 50 mg scale). Poly(DL-glutamine) ( $n=20$ ) bound to a resin was built up step by step using Fmoc-protected aminoacids. To the N-terminus was coupled N-succinyl-distearylamine. The C-terminus was transformed to an amide.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum confirmed the structure.

$^1\text{H-NMR}$  in DMSO- $d_6$  ( $\delta$  relative to solvent peak):

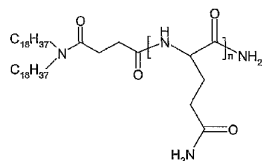
WO 02/098952

32

PCT/EP02/06783

distearyl: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.4 (CH<sub>2</sub>-N)

polyglutamine: 1.7 - 2.2 (β,γ-CH<sub>2</sub>), 4.2 (CH), 6.8 & 7.3 (NH<sub>2</sub>), 8.2 (NH)



5

#### Example 20

##### Poly(DL-asparagine) DODASuc

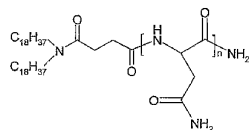
A poly(DL-asparagine) DODASuc conjugate was synthesized by Ansynth Service B.V. using a solid phase peptide synthesis method starting from Fmoc-protected aminoacids (ca.

- 10 50 mg scale). Poly(DL-asparagine) (n=20) bound to a resin was built up step by step. To the N-terminus was coupled N-succinyl-distearylamine. The C-terminus was transformed to an amide. <sup>1</sup>H-NMR spectrum recorded in DMSO confirmed the structure.

<sup>1</sup>H-NMR in DMSO-d<sub>6</sub> (δ relative to solvent peak):

distearyl: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.4 (CH<sub>2</sub>-N)

- 15 polyasparagine: 2.5 (CH<sub>2</sub>), 4.5 (CH), 7.0 & 7.4 (NH<sub>2</sub>), 8.1 (NH)



#### Example 21

##### Poly-(D,L-alanine) DODASuc

- 20 95 mg poly-DL-alanine (Sigma; MW: ca. 2000) was dissolved in 4 ml DMSO. 40 μl triethylamine was added to this solution. Subsequently, this solution was added to a solution of 0.1 g DODASuc, 70 mg DCC and 5 mg DPTS in 2 ml chloroform that has been stirred for 1 hour. After stirring for 1 day the mixture was precipitated into a methanol/diethylether mixture. The precipitate was filtered off and dried.

WO 02/098952

33

PCT/EP02/06783

<sup>1</sup>H-NMR recorded in DMSO:

Distearyl: 0.8 (CH<sub>3</sub>), 1.2 (CH<sub>2</sub>), 1.4 (CH<sub>2</sub>N)

Polyalanine: 1.2(CH<sub>3</sub>), 4.2 (CH), 8.0 (NH).

#### 5 **Example 22**

##### **Copolyptide of β-alanine and hydroxyethyl L-glutamine**

DODASuc-(β-Ala)<sub>3</sub>-Glu(OBzl)-(β-Ala)<sub>4</sub>-Glu(OBzl)-(β-Ala)<sub>3</sub>-Glu(OBzl)-(β-Ala)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

Copolyptide of β-alanine and benzyl L-glutamate was synthesized via a solid phase method by Ansynth Service B.V. starting from Fmoc-protected monomers

10 C-terminus: amide; N-terminus: DODASuc.

DODASuc-(β-Ala)<sub>3</sub>-HEG-(β-Ala)<sub>4</sub>-HEG-(β-Ala)<sub>3</sub>-HEG-(β-Ala)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>

Afterwards the benzyl glutamate units were converted to hydroxyethyl glutamine (HEG) ones by an aminolysis (ethanolamine) reaction carried out in DMF.

<sup>1</sup>H-NMR recorded in DMSO revealed absence/conversion of benzyl groups.

15

#### **Example 23**

##### **Preparation of PHEG-stearylamine-containing liposomes**

33.8 mg of egg phosphatidylcholine (EPC) (Lipoid Ludwigshafen), 9.67 mg of cholesterol (Sigma Aldrich) and 30.0 mg of poly-[N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine]-stearylamine (PHEG-stearylamine) (synthesised) were weighed and transferred in a 50 ml round-bottom flask. 500 kBq of tritium-labeled cholesteryloleylether was added as a lipid marker. The lipids and the label were dissolved in about 10 ml of ethanol. Thereafter evaporating to dryness in a Rotavapor during 1 hour under vacuum at 40°C, followed by flushing with nitrogen gas during 1 hour took place.

25 PBS was added to the dry lipid film and shaken during one hour in the presence of glass beads in order to enable complete hydration of the lipid film.

The liposomal suspension was transferred to an extruder (Avestin, maximum volume 15 ml) and extruded under pressure, using nitrogen gas, 6 times through 2 polycarbonate filters one placed on top of the other, having a pore size of 200 and 100 nm respectively, and 18 times through filters having a pore size of 100 nm and 50 nm respectively. Subsequently the liposomal suspension was dialysed in a dialysing compartment (Slide-A-Lyzer, 10,000 MWCO) 2 times during 24 hours against 1 liter of sterilised PBS.

The mean particle size of the liposomes was determined by means of light scattering (Malvern Zeta-sizer) and was found to be  $93.6 \pm 0.9$  nm, the polydispersity index being  $0.099 \pm 0.02$ . The lipid loss during preparation of the liposomes was 25 %, determined by comparing the final radioactivity of the preparation with the activity before the extrusion  
 5 procedure. The suspension of liposomes was stored in a nitrogen atmosphere at 4°C.

#### **Example 24**

##### **Preparation of further lipid-polymer-conjugates-containing liposomes**

Liposomes were prepared using the film method, as described in example 23. Instead of egg  
 10 phosphatidylcholine dipalmitoyl phosphatidylcholine was used. 5 mM HEPES buffer was added to the dry lipid film and shaken during 5 minutes in the presence of glass beads in order to enable complete hydration of the lipid film. The liposomes were sized by extrusion 12 times through 2 stacked PC membranes having pore sizes of 100 and 200 nm. The resulting liposome dispersions were dialysed (MWCO 10,000) and  
 15 average particle sizes were determined using dynamic light scattering technique. See table 1 for the properties of the liposomal preparations.

#### **Example 25**

##### **Comparative kinetics of $^3\text{H}$ -labelled polymer-lipid-conjugates incorporated into liposomes after a single intravenous injection to the rat**

Male rats (Wistar, CrI: (WI) BR (outbred, SPF-Quality) (Charles River, Sulzfeld, Germany))  
 20 had free access to standard pelleted laboratory animal diet (Altromin, code VRF 1, Lage, Germany) and to tap-water. Single-dose intravenous injection of liposomal preparations, each containing  $^3\text{H}$ -labelled cholesteryl-oleylether (Amersham) having 40-50 kBq of  
 25 radioactivity, (compositions per 50  $\mu\text{mol}$  lipid are shown in Table 1) was given into the tail-vein. Total Lipid administered was 5  $\mu\text{mol}$ , except in the cases indicated. Blood samples were collected from the tail vein of each rat at the following time points post-dose: 5 minutes and 4, 24 and 48 hours. The amount of sample collected was approx. 300  $\mu\text{l}$  per sampling event.

30 Sampled blood was transferred into heparinised tubes and stored at -20 °C.

A single aliquot of 100  $\mu\text{l}$  was solubilised according to the following method:

- 100  $\mu\text{l}$  was transferred to a scintillation vial (20 ml).

WO 02/098952

35

PCT/EP02/06783

- 100 µl of Solvable was added. This was incubated for at least 1 hour.
  - 100 µl of 1 mM EDTA and 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% were added. This mixture was incubated for 24 hours at room temperature and overnight at 50 °C thereafter.
  - Ultima Gold (10 ml) was added as the scintillation fluid.
- 5      • Radioactivity was measured by LSC.

All radioactive measurements were performed using a Packard scintillation counter (1900TR). Counting time was to a statistical precision of  $\pm 0.2\%$  or a maximum of 5 minutes, whichever comes first. The Packard 1900TR was programmed to automatically subtract background and convert counts per minute (CPM) to disintegrations per minute (DPM).

10

For some of the preparations mentioned the liver and spleen of the rats were dissected 48 hours after injection and liposomes localisation was assessed according to the following method:

15

The organs were homogenised and the homogenates diluted to 25 ml (liver) or 5 ml (spleen). 1 ml of the homogenates was transferred to scintillation vials to which subsequently were added:

- 200 ml Solvable (mixed and sample incubated at 50 °C overnight)
  - 200 ml 0.5 M EDTA solution
  - 250 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) solution (incubated at 50 °C overnight)
  - 10 ml Ultima Gold scintillation liquid (vortexed and sample incubated for 24 hours.
- 20

Thereafter the samples were counted in a beta-scintillation counter for 10 minutes. Results for some liposomal preparations are shown in Figure 6.

25 The compositions of the liposomal preparations, prepared according to Example 24 and the results, obtained in the in vivo test of this example, are shown in Table 1. The increase of blood circulation time was assessed, wherein:

- Good means effect on circulation time comparable to that shown by PEG-DSPE-containing liposomes.
  - Moderate means effect on circulation time in between those shown by PEG-DSPE-containing liposomes and bare liposomes without polymer coating.
- 30

WO 02/098952

36

PCT/EP02/06783

- Slightly means effect on circulation time under the current conditions almost similar to that shown by bare liposomes.

Table 1

5 Composition of liposomes per 50  $\mu$ mol lipid and properties

DPPC (mg)	Cholesterol (mg)	Lipid-Polymer- conjugate of (mg)	Average particle size (nm)	Polydispersity index	Increase of blood circulation time
23.1	6.4	Ex. 2: 15	134 $\pm$ 0.5	0.100	Slightly
23.1	6.4	Ex. 6: 10	153 $\pm$ 0.5	0.056	Good
23.1	6.4	Ex. 5: 30	143 $\pm$ 2	0.205	Moderate
23.1	6.4	Ex. 8.1: 11.2	140.3 $\pm$ 2.2	0.090	Good
23.1	6.4	Ex. 8.2: 13.8	153.0 $\pm$ 0.9	0.090	Moderate
23.1	6.4	Ex. 8.4: 11.2	148.2 $\pm$ 1.7	0.071	Slightly
23.1	5.5	Ex. 9: 11.0	138.7 $\pm$ 1.8	0.116	Slightly
23.1	6.4	Ex. 14: 8.9	146.0 $\pm$ 2.1	0.092	Good
23.1	6.4	Ex. 14: 13.8	147.0 $\pm$ 1.1	0.068	Good
23.1	6.4	Ex. 14: 8.9	141.7 $\pm$ 2.3	0.044	Good
23.1	6.4	Ex. 8.2: 11.2	163.9 $\pm$ 3.0	0.068	Moderate
23.1	6.4	Ex. 23: 2.2	171.6 $\pm$ 2.5	0.167	Slightly
23.1	6.4	Ex. 11: 10.1	180.7 $\pm$ 6.1	0.113	Slightly

DPPC (mg)	Cholesterol (mg)	Lipid-Polymer- conjugate of (mg)	Average particle size (nm)	Poly- dispersity index	Increase of blood circu- lation time
23.1	6.4	Ex. 8.1: 11.2	159.0 $\pm$ 3.8	0.073	Good §
23.1	6.4	Ex. 14: 8.9	152.9 $\pm$ 3.4	0.050	Good §
23.1	6.4	Ex. 12: 11.2	170.3 $\pm$ 2.5	0.039	Moderate
23.1	6.4	Ex. 12: 2.24 + Ex. 8.1: 8.96	166.0 $\pm$ 0.9	0.056	Moderate
23.1	6.4	Ex. 11: 10.1	167.7 $\pm$ 0.6	0.170	Slightly

WO 02/098952

37

PCT/EP02/06783

DPPC (mg)	Cholesterol (mg)	Lipid-Polymer- conjugate of (mg)	Average particle size (nm)	Poly- dispersity index	Increase of blood circu- lation time
23.1	6.4	Ex. 18: 11.2	159.9 ± 2.3	0.062	Good
23.1	6.4	Ex. 16: 5.0	162.7 ± 1.6	0.159	Slightly
23.1	6.4	Ex. 19: 8.8	156.3 ± 3.2	0.059	Moderate
25.0	6.4	Ex. 20: 8.8	164.7 ± 4.0	0.116	Moderate
23.1	6.4	Ex. 10: 8.8	159.0 ± 3.8	0.073	Slightly
23.1	6.4	Ex. 22: 8.8	152.9 ± 3.4	0.050	Moderate
23.1 *	6.4*	Ex. 14: 8.8*	167.7 ± 0.6	0.170	Good
23.1 **	6.4**	Ex. 14: 8.8**	149.9 ± 2.3	0.062	Good
23.1 ***	6.4***	Ex. 14: 8.8***	162.7 ± .024	0.159	Slightly
23.1	6.4	PEG-DSPE: 6.9	156.3 3.2	0.059	Good
23.1*	6.4*	PEG-DSPE: 8.8*	170.3 2.5	0.039	Good
23.1**	6.4**	PEG-DSPE: 6.9**	166.0 0.9	0.056	Good
23.1***	6.4***	PEG-DSPE: 6.9***	170.5 0.3	0.110	< Slightly

\* : Total Lipid administered 0.5 µmol (see Figures 1 and 2)

\*\* : Total Lipid administered 0.05 µmol (see Figures 1 and 2)

\*\*\*: Total Lipid administered 0.005 µmol (see Figures 1 and 2)

- §: when a second injection (TL 1 µmol) was given after 1 week, a reduction was seen in the circulation time for liposomes, containing the lipid-polymer-conjugate of example 8.1. The liposomes, containing the conjugate of example 14, also showed such reduction, but for 2 animals this effect was observed to be moderate.

**Example 26**

- 10 **Preparation of liposomes containing a lipid-polymer-conjugate and prednisolone phosphate**
- 750 mg of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) (Lipoid Ludwigshafen), 220.0 mg of cholesterol (Sigma Aldrich) and 270.0 mg of the lipid-polymer conjugate of example 14 and 750 mg of dipalmitoyl phosphatidylcholine, 250.8 mg of cholesterol and 267.6 mg of PEG-distearoylphosphatidylethanol-amine (PEG-DSPE) (Avanti Polar Lipids) respectively were
- 15

WO 02/098952

38

PCT/EP02/06783

weighed and mixed in a 100 ml round-bottom flask. The lipids were dissolved in about 30 ml of a 1:1 mixture of methanol and chloroform (lipid-polymer-conjugate of example 14) or ethanol (PEG-DSPE). Thereafter evaporating to dryness in a Rotavapor during 1 hour under vacuum at 40°C, followed by flushing with nitrogen gas during 1 hour took place.

- 5 1200 mg of prednisolon disodium phosphate (PLP) (OPG Nieuwegein) were weighed and dissolved in 12 ml of sterilised PBS. The solution was added to the dry lipid films and shaken during one hour in the presence of glass beads in order to enable complete hydration of the lipid films.

- 10 The liposomal suspensions were transferred to an extruder (Avestin, maximum volume 15 ml) and extruded under pressure, using nitrogen gas, 6 times through 2 pore filters one placed on top of the other, having a pore size of 200 and 100 nm respectively, 100 and 50 nm respectively and 50 and 50 nm respectively. Subsequently the liposomal suspensions were dialysed in a dialysing compartment (Slide-A-Lyzer, 10.000 MWCO) 2 times during 24 hours against 1 liter of sterilised PBS.

- 15 The mean particle size of the liposomes was determined by means of light scattering (Malvern Zeta-sizer) and was found to be about 85 and 90 nm respectively, the polydispersity index being < 0.1. The encapsulation efficiency of the prednisolone phosphate was determined by means of a HPLC method and was found to be 2.6%. The suspensions of liposomes were stored in a nitrogen atmosphere at 4°C and found to be stable for at least 5 weeks, wherein the liposomal preparations, containing the lipid-polymer-conjugate of example 14 performed slightly better than the liposomal preparations, containing the reference lipid-polymer-conjugate PEG-DSPE (see figure 3).

#### Example 27

- 25 **Assessment of circulation time and therapeutic efficacy in rat adjuvant arthritis model of prednisolone phosphate-containing liposomal formulations**

- Lewis rats were immunised subcutaneously at the tail base with heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* in incomplete Freund's adjuvant. Paw inflammation started between 9 and 12 days after immunization, reached maximum severity approximately after 20 days, and then gradually resolved.

Assessment of the disease was performed by visually scoring paw inflammation severity from day 10 until day 35 after immunisation. When paw inflammation scores were about to reach

WO 02/098952

39

PCT/EP02/06783

values halfway the maximal score (day 14-15), all rats were divided in groups of 5 with equal average scores and treated with a single intravenous injection of:

1. 10 mg/kg PLP in PHEA- DODASuc liposomes, as prepared according to example 26 or
2. 10 mg/kg PLP in PEG-DSPE liposomes, as prepared according to example 26 (reference)

5 or

3. PBS (control).

At t=0, 24 and 48 hours blood samples were collected and assayed for the plasma concentration of liposomal PLP.

10 The circulation behavior of both PHEA- and PEG-liposomes in blood is shown by the plasma concentration profiles of PLP, which are depicted in the figure 4 Both liposome types perform equally well concerning circulation half-life.

Figure 5 shows the therapeutic activity in rat adjuvant arthritis of 10 mg/kg PLP-PHEA- and 10 mg/kg PLP-PEG-liposomes versus saline-treated rats as controls.

15

WO 02/098952

PCT/EP02/06783

40

CLAIMS

1. Colloidal carrier composition, comprising an active agent and a lipid-polymer  
5 conjugate, obtainable from an amphiphilic lipid, consisting of at least one hydrophobic apolar moiety and a hydrophilic polar head group, and a polymer or a monomeric precursor therefor, characterised in that the polymer is a poly-(amino acid), a poly-(amino acid derivative) or a poly-(amino acid analogue) and that the lipid-polymer-conjugate provides long-circulating properties to the colloidal carrier composition.
- 10 2. Composition according to claim 1, characterised in that the colloidal carrier is a vesicular system.
3. Composition according to claim 1 or 2, characterised in that the amphiphilic lipid is  
15 selected from the group consisting of phospholipids, glycolipids, ceramides, cholesterol and derivatives, saturated or unsaturated, branched or straight chain C<sub>8</sub>-C<sub>50</sub> mono- or di-alkylamines, arylalkylamines, cycloalkylamines, alkanols, aldehydes, carbohalides or alkanolic acids and the anhydrides thereof.
- 20 4. Composition according to claim 3, characterised in that the amphiphilic lipid contains at least two hydrophobic apolar moieties.
5. Composition according to claim 4, characterised in that the amphiphilic lipid is  
25 selected from the group consisting of 1-heptadecyloctadecylamine, N-succinyldioctadecylamine and distearylphosphatidylethanolamine.
6. Composition according to any of the preceding claims, characterised in that the polymer has a  $\chi$ -parameter of  $\leq 0.65$ , preferably  $\leq 0.5$  in water.
- 30 7. Composition according to any of the preceding claims, characterised in that the polymer contains no substantial amount of charged groups within a physiological pH of 4-8.

WO 02/098952

PCT/EP02/06783

41

8. Composition according to claim 7, characterised in that the polymer consists of amino acid monomers, amino acid analogue monomers or amino acid derivative monomers, that are neutral or that have been neutralised at a physiological pH of 4-8.
- 5 9. Composition according to any of the preceding claims, characterised in that the polymer consists of  $\alpha$ -amino acids and derivatives or analogues thereof.
- 10 10. Composition according to any one of the preceding claims, characterised in that the polymer has a molecular weight between 500 and 75,000, preferably between 2,000 and 15,000.
11. Composition according to any one of the preceding claims, characterised in that the polymer is biodegradable.
- 15 12. Composition according to claim 1, characterised in that the polymer is poly[N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine].
13. Composition according to claim 1, characterised in that the polymer is poly(2-hydroxyethyl)-L-asparagine.
- 20 14. Composition according to claim 1, characterised in that the polymer is poly(D,L-methionine sulfoxide).

25

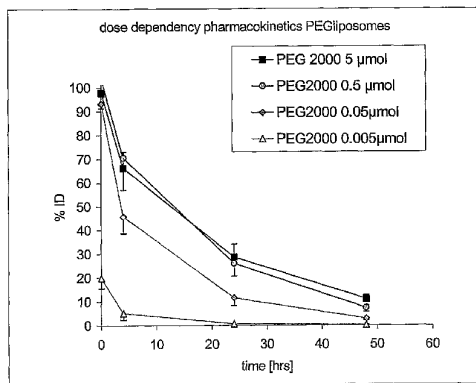
**Fig. 1**

Fig. 2

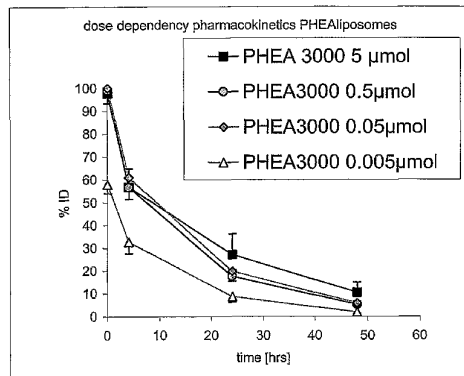
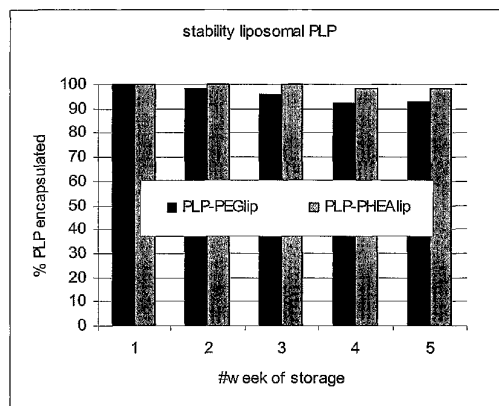


Fig. 3



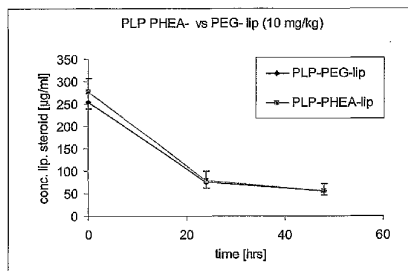
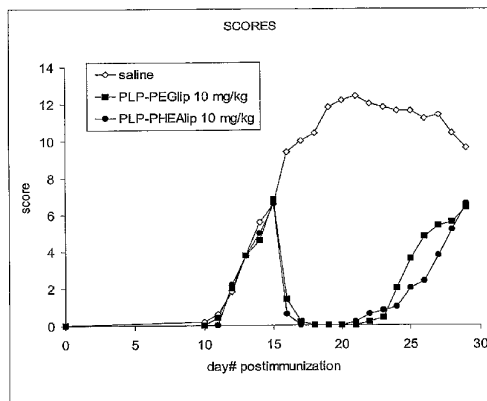
**Fig. 4**

Fig. 5

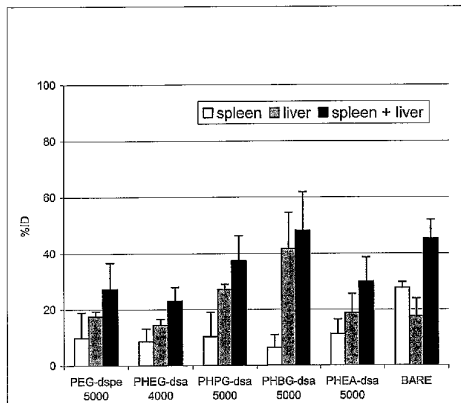


WO 02/098952

6/6

PCT/EP02/06783

Fig. 6



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/06783
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C08G69/10 A61K9/127		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C08G A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU X ET AL: "LIPOPHILIC POLYLYSINES MEDIATE EFFICIENT DNA TRANSFECTION IN MAMMALIAN CELLS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1065, no. 1, 31 May 1991 (1991-05-31), pages 8-14, XP000197616 ISSN: 0005-2736 the whole document --- -/--	1-4,6-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 November 2002		Date of mailing of the international search report 19/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Boulois, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/EP 02/06783
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU X. ET AL: "DNA transfection mediated- by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1189, 1994, pages 195-203, XP001039665 Amsterdam, NL the whole document	1-4,6-11
X	WO 94 20073 A (LIPOSOME TECHNOLOGY INC) 15 September 1994 (1994-09-15) cited in the application page 3, line 23 - line 34 page 29 -page 30; example 3 claim 1	1-4,6-8, 10,11
A	SHIBATA A ET AL: "PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LIPOSOMES INCORPORATING HYDROPHOBIC POLY(AMINO ACID)S WITH DIFFERENT SECONDARY STRUCTURE" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 42, no. 5, 1 May 1994 (1994-05-01), pages 1151-1153, XP000466176 ISSN: 0009-2363 the whole document	1
X	WO 99 61512 A (UCHEGBU IJEOMA FLORENCE ;UNIV STRATHCLYDE (GB)) 2 December 1999 (1999-12-02) page 4, line 1 - line 4 page 5, line 7 - line 18 page 6, line 8 - line 19 page 9 -page 15; examples	1-4,6-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

 In International Application No.  
 PCT/EP 02/06783

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9420073 A	15-09-1994	US 5395619 A	07-03-1995
		AT 162710 T	15-02-1998
		AU 6357594 A	26-09-1994
		CA 2156901 A1	15-09-1994
		DE 69408304 D1	05-03-1998
		DE 69408304 T2	20-08-1998
		DK 688207 T3	06-04-1998
		EP 0688207 A1	27-12-1995
		ES 2114186 T3	16-05-1998
		JP 3066437 B2	17-07-2000
		JP 8507523 T	13-08-1996
		WO 9420073 A1	15-09-1994
		US 5631018 A	20-05-1997
WO 9961512 A	02-12-1999	EP 1084172 A1	21-03-2001
		WO 9961512 A1	02-12-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/16	A 6 1 K 47/16	
A 6 1 K 47/18	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/24	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/26	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/28	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/34	A 6 1 K 47/34	
C 0 8 G 69/48	C 0 8 G 69/48	Z B P
// C 0 8 L 101/16	C 0 8 L 101/16	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AU,BA,BB,BG,BR,BZ,CA,CN,CO,CR,CU,CZ,DM,DZ,EC,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KP,KR,LC, LK,LR,LT,LV,MA,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OM,PH,PL,RO,SG,SI,SK,TT,UA,US,UZ,VN,YU,ZA

(72)発明者 メツツェラー ジョスベルト マールテン  
オランダ エヌエル - 3 5 0 8 テーバー ユトレヒト ピーオーボックス 8 0 0 8 2 ユトレ  
ヒト インスティテュート オブ ファーマシューティカルサイエンス ファキュリティー  
オブ ファーマシー デパートメント オブ ファーマシューティクス

(72)発明者 ヘニンク ウィルヘルムス エヴェラルドゥス  
オランダ エヌエル - 3 5 0 8 テーバー ユトレヒト ピーオーボックス 8 0 0 8 2 ユトレ  
ヒト インスティテュート オブ ファーマシューティカルサイエンス ファキュリティー  
オブ ファーマシー デパートメント オブ ファーマシューティクス

(72)発明者 デ ヴリンゲル トム  
オランダ エヌエル - 2 3 5 0 アーサー レイデルドルプ ピーオーボックス 1 0 8 ヤマノ  
ウチ ユーロープ ベスローテン フェンノートシャップ内

(72)発明者 デ ベール レオナルドゥス ウィルヘルムス テオドルス  
オランダ エヌエル - 2 3 5 0 アーサー レイデルドルプ ピーオーボックス 1 0 8 ヤマノ  
ウチ ユーロープ ベスローテン フェンノートシャップ内

(72)発明者 オウソレン クリスティエン  
オランダ エヌエル - 3 5 0 8 テーバー ユトレヒト ピーオーボックス 8 0 0 8 2 ユトレ  
ヒト インスティテュート オブ ファーマシューティカルサイエンス ファキュリティー  
オブ ファーマシー デパートメント オブ ファーマシューティクス

(72)発明者 ストルム ゲリット  
オランダ エヌエル - 3 5 0 8 テーバー ユトレヒト ピーオーボックス 8 0 0 8 2 ユトレ  
ヒト インスティテュート オブ ファーマシューティカルサイエンス ファキュリティー  
オブ ファーマシー デパートメント オブ ファーマシューティクス

(72)発明者 ブルイン ペテル  
オランダ エヌエル - 3 5 0 8 テーバー ユトレヒト ピーオーボックス 8 0 0 8 2 ユトレ  
ヒト インスティテュート オブ ファーマシューティカルサイエンス ファキュリティー  
オブ ファーマシー デパートメント オブ ファーマシューティクス

F ターム(参考) 4C076 AA19 BB11 CC27 CC37 DD37E DD40E DD41E DD49E DD50E DD52E  
DD63E DD70E EE41F FF16 FF31 FF43  
4J001 DA01 DB01 DB02 DC12 DD14 EA33 EA35 EA36 EE25C EE27C  
EE38C EE45C EE74C FA03 FA06 FB01 FC01 GE02 GE04 JA20  
JB01  
4J200 AA04 BA29 DA22 EA04