



(12) PATENT

(19) NO

(11) 338835

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.
C08F 8/34 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20083573	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.01.19 PCT/US2006/001820
(22)	Inng.dag	2008.08.18	(85)	Videreføringsdag	2008.08.18
(24)	Løpedag	2006.01.19	(30)	Prioritet	2006.01.19, WO, PCT/US06/001820
(41)	Alm.tilgj	2008.10.17			
(45)	Meddelt	2016.10.24			
(73)	Innehaver	Allexcell Inc, 135 Wood Street, US-CT06516 WEST HAVEN, USA			
(72)	Oppfinner	Anil Diwan, c/o Allexcell Inc, 135 Wood Street, US-CT06516 WEST HAVEN, USA Ann Louise Onton, 69 First Street, US-CT06825 FAIRFIELD, USA Jayant G Tataka, 14 Misty Vale Road, US-CT06482 SANDY HOOK, USA			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Amfifile polymerer for oppløseliggjøring og målrettet avgivelse av legemidler			
(56)	Anførte publikasjoner	US 5919442 A WO 03078489 A US 2004248842 A			
(57)	Sammendrag				

Amfifile bionedbrytbare kopolymerer omfattende en hydrofil ryggrad med alifatiske sidegrupper som den hydrofobe komponent. I vandige omgivelser danner polymerene molekylaggregater i nanoskala med en hydrofob indre del som kan oppløseliggjøre uløselige organiske forbindelser som legemidler, vitaminer, fargestoffer og bildegivende midler. Polymerene har eventuelt reaktive funksjonelle grupper som gir bindingspunkter for antistoffer, ligander og andre målrettende grupper som er anvendelige for målrettende avlevering av legemidler og bildegivende midler.

Område for oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse angår området amfifile polymerer, og nærmere bestemt biokompatible micelledannende polymerer av kamtype. Oppfinnelsen angår også områdene legemiddelsolubilisering og målrettet avlevering av legemiddel.

5

Bakgrunn

Amfifile blokk-kopolymerer som omfatter en hydrofob blokk og en hydrofil blokk er blitt nøye studert i de siste år på grunn av at de har evne til å samle seg i en rekke nanostrukturer etter som det omgivende løsningsmiddel varierer. Se Cameron et al., *Can. J. Chem./Rev. Can. Chim.* 77:1311-1326 (1999). I vannløsninger har den hydrofobe del av en amfifil polymer en tendens til å samle seg for å unngå kontakt med vann og for å minimere systemets frie grenseflateenergi. Samtidig danner de hydrofile blokker en hydratisert "korona" i de vandige omgivelser, og således opprettholder aggregatene en termodynamisk stabil struktur. Resultatet er en stabil, latekslignende kolloidal suspensjon av partikler av polymeraggregater som har hydrofobe kjerner og hydrofile koronaer.

15

Amfifile kopolymerer av kamtype skiller seg fra blokk-kopolymerer ved at ryggraden for en stor grad er hydrofob eller hydrofil, med polymerkjeder av motsatt polaritet som går ut fra ryggraden i stedet for å være innlemmet i ryggraden. Kopolymerer av kamtype er blitt fremstilt med hydrofob ryggrad og hydrofile grener (Mayes et al., US patentskrift nr. 6399700), og også med hydrofil ryggrad og hydrofobe grener (Watterson et al., US patentskrift nr. 6521736). De førstnevnte anvendes til å oppnå multivalent presentasjon av ligander for celleoverflatereseptorer, mens den sistnevnte anvendes til å solubilisere legemidler og avlevere disse til celler.

20

Amfifile polymeraggregater er blitt undersøkt som bærere for solubilisierende uoppløselige legemidler, vehikler for målrettet avlevering av legemidler, og gen-avleveringssystemer. De har en mer stabil struktur enn konvensjonelle lavmolekylære celler på grunn av sammenfiltrering av kjedene og/eller krystallinitet hos det indre hydrofobe området. Vehiklenes polymere natur gjør aggregatene relativt immune overfor desintegreringen som ordinære liposomer lider av når de fortynnes under sin kritiske micellekonsentrasjon. De har også en fordel fremfor tradisjonelle liposomale legemiddelavleveringsblandinger ved at fraværet av en dobbeltlagsmembran gjør dem i stand til lettere å kondensere med cellemembranene og avlevere lasten sin direkte til cellen.

25

30

På grunn av at polyetylenglykol (PEG) har utmerket biokompatibilitet og den åpenbare evne som PEG-overtrukne "usynlige" partikler har til å innvandre det retikuloendoteliale system, er miceller, liposomer og polymerer hvor det er inkorporert PEG, blitt omfattende vurdert som materialer for legemiddelavleveringssystemer. Det

35

er mange rapporter angående anvendelse av polyetylenglykol (PEG) som den hydrofile komponent i PEG-lipider (som danner liposomer og miceller), se for eksempel Krishnadas et al., *Pharm. Res.* 20:297-302 (2003). Selvsamling av amfifile blokk-kopolymerer, som selvsamler seg til de mer robuste "polymersomer", er også blitt undersøkt som vehikler for legemiddelsolubilisering og avlevering (Photos et al., *J. Controlled Release*, 90:323-334 (2003)). Se også Gref et al., *Int. Symp. Controlled Release Mater.* 20:131 (1993). Kwon et al., *Langmuir*, 9:945 (1993); Kabanov et al., *J. Controlled Release*, 22:141 (1992); Allen et al., *J. Controlled Release*, 63:275 (2000); Inoue et al., *J. Controlled Release*, 51:221 (1998); Yu og Eisenberg, *Macromolecules*, 29:6359 (1996); Discher et al., *Science*, 284:113 (1999); Kim et al., US 6322805; Seo et al., US 6616941 og Seo et al., EP 0583955. Anvendelse av polyetylenimin (PEI) i denne henseende, er også blitt rapportert med fokus på avlevering av oligonukleotider (Nam et al., US 6569528; Wagner et al., US patentsøknad 20040248842). På tilsvarende måte beskriver Luo et al., i *Macromolecules* 35:3456 (2002) PEG-konjugert polyamidamin ("PAMAM")-dendrimer som er egnet for avlevering av polynukleotider.

I tillegg til behovet for å solubilisere, fordele og avlevere legemidler, er det et behov for målrettede legemiddelavleveringssystemer som er spesielt rettet på et målvev, en tumor eller et organ. Dette er vanligvis utført ved å feste antistoffer eller andre ligander med en spesifikk affinitet for celleveggen på målstedet. Imidlertid mangler PEG funksjonelle grupper, unntatt på endene av polymerkjedene, og størstedelen av terminalgruppen er uunngåelig opptatt av bindinger til den andre komponenten i blokk-kopolymeren. Av denne årsak er det å feste målrettende grupper, så som antistoffer eller celledhesjonsmolekyler, til PEG-blokk-kopolymerer generelt begrenset til den PEG-frie blokk, som uheldigvis ikke er den del av kopolymeren som normalt blir eksponert i koronaen i det selvsamlende aggregatet.

Faseseparasjonsfenomenet som er et resultat av selvsamlingen av blokk-kopolymerer til polymeraggregater, er lett reversibel, og det har vært gjort forsøk på å øke aggregatens stabilitet ved tverrbinding av den hydrofobe kjerne (se EP 0552802). Kovalent binding av legemidlet til den hydrofobe komponent i en blokk-kopolymer har også vært forsøkt (Park and Yoo, US 6623729, EP 0397307).

US5919442 beskriver hyper kam-forgrenede polymer konjugater omfattende en langstrakt kjerne med en flerhet av armer som forgrenes derfra for å gi inntrykk av en kam, dvs. disse polymerene omfatter påfølgende generasjoner av grener som forgrenes fra tidligere generasjoner av grener.

Den amerikanske baserte internasjonale søknaden WO 03/078489 beskriver diblokk, triblokk-kopolymerer og start kopolymerer som består av alternerende hydrofobe og hydrofile komponenter.

I tillegg beskriver US 2004/248842 lineær polyetylenimin konjugert tilfeldig til

hydrofile (f.eks polyetylen glykol) sidekjeder og omtaler komplekseringen av disse tilfeldig forgrenede ko-polymerer med DNA.

Det er fortsatt behov for et legemiddelavleveringssystem som er stabilt, biokompatibelt, forenlig med å feste målgrupper på aggregatenes utvendige overflate, og som er effektive ved avlevering av legemidler til de ønskede cellulære mål.

Sammenfatning av oppfinnelsen

Fremlagt her er kam-polymerer i henhold til de foreliggende kravene, så vel som farmasøytiske preparater som omfatter disse polymerer og fremgangsmåter som anvender disse polymerer i henhold til de foreliggende krav.

Ytterligere beskrevet her er biokompatible polymermolekyler av kamtype, som omfatter en hydrofil ryggrad med forgreningsdeler, og hydrofobe grener bundet til disse forgreningsdeler. Beskrevet her er vandige suspensjoner av polymeraggregater dannet av slike polymerer, og fremgangsmåter for å solubilisere uløselige eller dårlig løselige organiske forbindelser, så som legemidler, fargestoffer, vitaminer og lignende, ved å inkorporere slike forbindelser i de hydrofobe kjerner i polymeraggregatene. Fremgangsmåten for å solubilisere en vannuløselig organisk forbindelse i et vandig løsningsmiddel omfatter i utgangspunktet å bringe den vannuløselige organiske forbindelse i kontakt med en polymer beskrevet her i et vandig eller vannholdig løsningsmiddel.

I bestemte utførelsesformer omfatter videre forgreningsdelene reaktive funksjonelle grupper med evne til å tjene som bindingspunkter for målgruppene. I særlig foretrukne utførelsesformer er målgruppene, så som ligander eller antistoffer, kovalent bundet til forgreningsdelene i polymerene beskrevet her, og et legemiddel er inkorporert i kjernen i aggregatene slik at det dannes et målrettet legemiddelkompleks.

Videre er det tilveiebragt fremgangsmåter for fremstilling av polymerene av kamtype, aggregatene og de målrettede legemiddelkomplekser beskrevet her. Polymerene beskrevet her selvsamler seg til polymeraggregater som effektivt solubiliserer, fordeler og avleverer legemidler in vivo, de er ikke-toksiske og biokompatible, de er stabile og har evne til å bære mange cellemålrettende grupper på sine overflater.

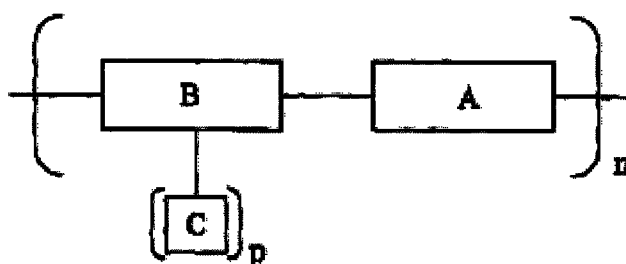
Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 viser 20 μ l prøver av mettede oppløsninger av 3 lipofile fargestoffer (A. Sudan IV; B, diklorfluorescein; C, spritløselig Eosin Y) i avionisert vann, som danner flekker på en TLC-plate med silikagel. Øvre rad: med 50 mg/ml av π -polymeren i eksempel 1; nedre rad: uten π -polymer.

Fig. 2 viser 50 µl prøver av mettede oppløsninger av 4 uløselige legemidler (rad 1, purpurin; rad 2, kamptotecin; rad 3, amfotericin B; rad 4, dokсорubicin) i avionisert vann, som danner flekk på en silikagel-TLC-plate. Kolonne A, foliert polymer A, kolonne B, polymer A, kolonne C, ingen polymer. Tre blyantmerker rundt hver flekk viser omfatningen av spredningen av løsningsmiddel på platen. De sentrale sirkler i kolonner A og B er jevnt fordelt i silikaen, hvilket antyder klare oppløsninger. De sentrale sirkler i kolonne C består for en stor grad av avsetninger av fast stoff.

Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

10 Polymerene beskrevet her omtales her som " π -polymerer", har en arkitektur av kamtype, med en ryggrad dannet av alternerende forgreningsdeler B og hydrofile vannløselige polymerblokker A, og de har flere hydrofobe sidekjeder C bundet til hver forgreningsdel. De består hovedsakelig av strukturen vist i formel 1. Sidekjedene er forholdsvis korte, hydrofobe grupper som kan være alifatiske molekyler, kjeder eller
15 oligomerer. Verdien på p er ideelt et helt tall, enten 2, 3 eller 4. I praksis vil sidekjedene vanligvis være innført med mindre enn perfekt effektivitet via kjemiske reaksjoner, og dette resulterer i at polymerpreparatet som en helhet får en middelvei for p som ikke er det ønskede hele tall. Middelveier som ikke er helt tall kan også bli



1

oppnådd gjennom design, som diskutert nedenfor. Polymerene ifølge oppfinnelsen vil
20 således ha en middelvei for p som er større enn 1 og som kan være så høy som fire ($1 < p \leq 4$). I foretrukne utførelsesformer er p i området fra 2 til 4, og mest foretrukket $1,5 < p \leq 2$.

25 Polymerblokken A i ryggraden er valgt blant hydrofile og/eller vannløselige polymerkjeder, innbefattede polyetylenglykol, polypropylenglykol, polyetylenimin, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, polysakkarider og lignende. Fortrinnsvis er polymerenhetene A polyetylenglykolkjeder med formel $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$, hvor m er mellom 1 og 10000, fortrinnsvis mellom 3 og 3000. Polymerkjedenes terminale funksjonelle grupper er ikke blitt karakterisert og er ikke relevant for oppfinnelsen.

Ved fremstillingen av forskjellige kvaliteter av polyetylenglykol, er det kjent i industrien å koble en toverdig linkergruppe (f.eks. bisfenol A-diglycidyleter) til to polyetylenglykolkjeder, hvilket effektivt fordobler polymerens molekylvekt samtidig som det opprettholdes et relativt smalt molekylvektsområde. De resulterende

5 "polyetylenglykol"-molekyler er følgelig avbrutt ved midtpunktet av polymerkjeden med linkergruppen som ikke er glykol (se f.eks. polyetylenglykol-bisfenol A-diglycidyleter-adykt, CAS-registreringsnummer 37225-26-6). Høyere oligomerer, dvs. de som har tre PEG-kjeder separert med to grupper bisfenol A-diglycidyleter er også kjent, se f.eks. internasjonal patentsøknad WO 00/24008. Anvendt her innbefatter

10 derfor uttrykkene "polyetylenglykol" og "polypropylenglykol" polyetylenglykol- og polypropylenglykol-polymerkjeder hvor det er inkorporert glykolfrie linkerenheter, innbefattende bisfenol A-diglycidyleter, bisfenol B-diglycidyleter, bisfenol S-diglycidyleter, hydrokinon-diglycidyleter, og lignende. For formålene med denne beskrivelse er alle slike linkergrupper ikke regnet med som "monomerenheter".

15 Polymerblokken A har mest foretrukket en midlere lengde på mellom 20 og 50 monomerenheter. Polyetylenglykolkjedene kan være endesubstituert med funksjonelle grupper som er egnet for anvendelse som linkere til andre grupper, innbefattende amino, merkapt, akrylat, akrylamid, maleat, maleimid og lignende, i én eller begge ender. Verdien på n er i området fra 1 til 1000, og er fortrinnsvis mellom 3 og 100. Den

20 totale molekylvekt for π -polymeren kan være i området fra 1000 til 100000 dalton eller mer, den er fortrinnsvis over 2000 dalton og mer foretrukket over 7000 dalton.

Hydrofobe grupper C kan være like eller forskjellige og kan for eksempel være lineære hydrokarboner (eventuelt substituert med én eller flere hydrofile substituer), polysykliske hydrokarboner (eventuelt substituert med én eller flere substituer),

25 hydrofobe aminosyrer, peptider og polymerer. Egnede hydrofile substituer innbefatter hydroksyl-, eter-, cyano- og amidfunksjonelle grupper. Det er spesielt tatt i betraktning C₈- til C₂₀-alkylgrupper som bærer ω -hydroksy-, ω -cyano-, ω -amido- eller ω -alkoksy-substituer. I denne sammenheng innbefatter uttrykket "substituent" å sette inn et heteroatom, så som O, N eller S, i stedet for et karbonatom i hydrokarbonkjeden

30 eller ringsystemet i gruppen C. Således kan eter- og amidbindinger og heterosykliske ringer være inkorporert i C.

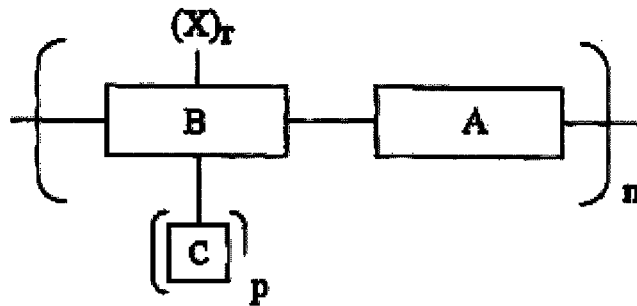
Hydrofobe grupper C er fortrinnsvis relativt korte alifatiske C₈-C₂₀-kjeder, men kan også være korte oligomerer. Egnede oligomerer innbefatter oligo-hydroksysyrer så som polyglykolsyre, poly-DL-melkesyre, poly-L-melkesyre og kopolymerer av

35 polyglykolsyre og polymelkesyre-hydroksysyrer, og polyaminosyrer, polyanhydrid, polyortoestere og polyfosfoestere, polylaktone så som poly- ϵ -kaprolakton, poly- δ -valerolakton, poly- γ -butyrolakton og poly- β -hydroksybutyrat. C-gruppene kan også være valgt blant hydrofobe molekyler, så som kolesterol, kolsyre, litokolsyre, hydro-

fobe peptider og lignende. Hver gruppe C har molekylvekt som er større enn 40, fortrinnsvis mellom 50 og 1000, og mest foretrukket mellom 100 og 500. Generelt er enhver gruppe C som ikke er vesentlig løselig i vann når den er i molekylformen C-H, ment å være egnet for anvendelse beskrevet her.

5 Det er et særtrekk ved kam-polymerene beskrevet her at sidekjedene C ikke er regulært og jevnt fordelt langs polymerkjeden, men snarere opptrer i klynger $[C]_p$. Avstandene mellom disse klynger er mer eller mindre regulær langs polymerkjeden, avhengig av graden av monodispersitet hos polymerenhetene A. Således vil avstanden mellom to sidekjedener C bundet til en felles forgreningsgruppe B være forskjellig fra
10 avstanden mellom to sidekjedener bundet til forskjellige forgreningsgrupper.

I en andre utførelsesform beskrevet her omfatter forgreningspunktgruppene B også én eller flere reaktive funksjonelle grupper X, og polymerene består hovedsakelig av strukturen vist med formel 2.



2

I formel 2 kan de individuelle reaktive grupper X være lik hverandre eller
15 forskjellige, og de kan eventuelt være i form av blokker eller være beskyttet, alt etter hva som kan være nødvendig for å sette sammen polymeren 2. Middelveien for r vil være i området fra 0 (ingen X-grupper) til ca. 4. Typisk vil de reaktive grupper være valgt blant funksjonelle grupper som i faget er kjent å være anvendelige for dannelsen av kovalente bindinger mellom molekylære forbindelser. Gruppene X tjener som til-
20 knytningspunkter for legemiddelmolekyler, vev- eller cellemålrettende grupper, virusmålrettende grupper eller matriks-tilknytningsgrupper (som når det gjelder å belegge overflaten på en stent eller en annen medisinsk innretning). I bestemte utførelsesformer kan det være ett enkelt tilknytningspunkt X. I andre utførelsesformer kan det være tre eller fire forskjellige typer reaktive grupper. Matriks-tilknytningsgruppen kan
25 være bundet til en matriks via kovalente bindinger, spesifikke ikke-kovalente interaksjoner (f.eks. antistoff-antigen) eller ikke-spesifikke interaksjoner (f.eks. via ioneparing eller "hydrofob" interaksjon). Egnede reaktive grupper X innbefatter -OH, -NH₂, -SH, -CHO, -NHNH₂, -COOH, -CONHNH₂, halogenacyl, acetoacetyl, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS og lignende; reaktive dobbeltbindinger som vinyl-, akryl-, allyl-,

malein- eller kanel-grupper og lignende; og grupper med reaktive trippelbindinger så som acetylenkarboksy og acetylenkarboksamid (egnet for Michael-addisjoner, Diels-Alder-reaksjoner og friradikaladdisjonsreaksjoner).

Eksempler på celle-målrettende grupper innbefatter reseptorspesifikke
 5 ligander, antistoffer og andre målrettende grupper, så som peptider som har en arginin-glycin-aspartinsyre (RGD)-aminosyresekvens eller et tyrosin-isolaucin-serin-arginin-glycin (YISRG)-motiv, vekstfaktorer innbefattende epidermal vekstfaktor, vaskulær endotelial vekstfaktor og fibroblastvekstfaktor, viraloverflateligander som sialsyre- og N-acetylneuraminsyrederivater, cellereseptorligander som folat, metotreksat,
 10 pteroinsyre, østradiol, østratriol, testosternon og andre hormoner, mannose-6-fosfat, sukkere, vitaminer, tryptofan og lignende. Antistoffer er fortrinnsvis monoklonale antistoffer rettet på cellespesifikke overflateantigener. Egnede målrettende grupper innbefatter ikke bare hele antistoffer, men også antistoffragmenter som inneholder den aktive antigen-bindingssekvens, så som Fab'²-fragmenter, Fab'-fragmenter eller
 15 kortkjedede peptidanaloger av de aktive antigen-bindingssekvenser i slike antistoffer.

Eksempler på virus-målrettende grupper innbefatter småmolekyl-ligander som binder til et virus, så som aminoalkyladamantaner, Fuzeon, PRO-542, BMS-488043, sialsyre, 2-deoksy-2,3-didehydro-N-acetylneuramin-syre, 4-guanidin-Neu5Ac2en (zanamivir), oseltamivir, RWJ-270201 og lignende; oligopeptider, oligosakkarider og
 20 glykopeptider som binder til virusoverflater, og antistoffer og antistoffragmenter rettet på virusspesifikke overflateantigener. I foretrukne utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes π -polymerer som er bærere av ligander for viralt neuraminidase eller hemagglutinin. Det er vel etablert at slike polymerer i seg selv har antivirale egenskaper, se for eksempel T. Masuda et al., Chemical & Pharmaceutical
 25 Bulletin 51:1386-98 (2003), M. Itoh et al., Virology, 212:340-7 (1995), og Reece et al., US 6680054 (2004). De hydrofobe kjernene til de antivirale polymerer og polymer-aggregater beskrevet her kan eventuelt være fylt med ett eller flere konvensjonelle legemidler mot virus, og som fordelaktig frigjøres i nærheten av viruspartikkelen.

Andre tilknyttende grupper av medisinsk relevans kan være små kjemikalier,
 30 peptider, antistoffer eller antistoffragmenter, enzymer eller aktive farmasøytiske ingredienser som kan påvirke biologiske prosesser, så som hormoner eller hormonagonister eller -antagonister, stoffer som interfererer med virusbinding, stoffer som interfererer med cellyklusen eller cellulære prosesser etter intracellulær innføring, og lignende. Målet kan være encellede og flercellede organismer, inn-
 35 befattede bakterier, sopp, høyere dyr og planter. Biotin kan være bundet til π -polymeren og bli anvendt som et tilknytningspunkt for avidin- og streptavidin-koblede proteiner, peptider og andre målrettende eller farmakologisk aktive midler, så som antistoffer, veksthormoner, avbildingsreagenser og lignende.

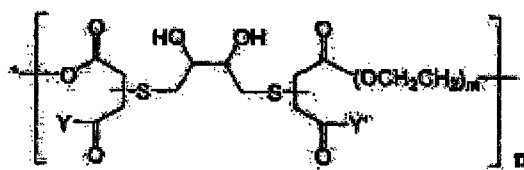
"Matriks" refererer til organiske eller uorganiske materialer, overflater og avsetninger, så som glass-, silika- eller metalloverflater, ekstracellulær matriks, avsatte proteiner så som amyloidplakk av forskjellige typer, celleoverflate, virusoverflate og generelt homogene eller heterogene overflater som eventuelt kan være godt karakterisert, innbefattende prioner.

Eksempler på glass- eller silikamatriks tilknytningsgrupper innbefatter forskjellige halogensilaner, alkoksysilaner, acylsilaner samt kjemikalier som inneholder slike funksjonelle grupper, innbefattende polymerer. Andre tilknyttende grupper kan være utvalgt basert på bestemte fysisk-kjemiske karakteristika hos matriksen. Egnede tilknyttende grupper, f.eks. slike som er anvendt ved belegging av stenter, er kjent av fagfolk på området.

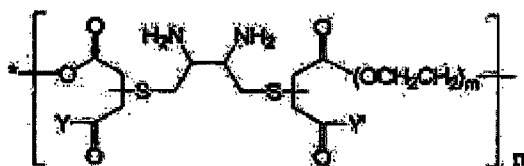
I et tredje aspekt beskrevet her er forgreningspunktgruppene B bundet til andre forgreningspunktgrupper andre steder i polymerkjeden slik at det dannes en tverrbundet hydrogelstruktur. Slik tverrbinding kan oppnås ved at polymeren reagerer med multifunksjonelle grupper som inneholder homofunksjonelle eller heterofunksjonelle grupper, hvorav minst én av disse reagerer med X eller en reaktiv gruppe på C lokalisert på en første forgreningspunktgruppe, og minst én av disse reagerer med X eller med en reaktiv funksjonell gruppe som er til stede på C i en andre forgreningspunktgruppe. Tverrbinding kan også skje via en link til de terminale funksjonelle grupper på polymerkjeden A. Slike tverrbundne polymerer kan eventuelt inneholde reaktive funksjonelle grupper som er egnet for tilknytning av legemiddelmolekyler eller målrettende grupper.

Forgreningsdelen B er typisk avledet fra et multifunksjonelt molekyl som har et antall reaktive grupper, hvorav to er egnet for binding til den hydrofile polymerenhet A, og hvorav to er egnet for binding til de hydrofobe deler C. Del B kan eventuelt ha ytterligere reaktive grupper X som beskrevet ovenfor.

Særlig fortrukne forgreningsdeler er konjugatene av ditiotreitol (DTT), ditioerytritol (DTE) eller 2,3-diaminobutan-1,4-ditiol med to molekyler maleinsyre. Kombinasjonen av denne forgreningsdel med polyetylenglykol som del A, danner polymerryggraden med formeler 3 og 3a



3



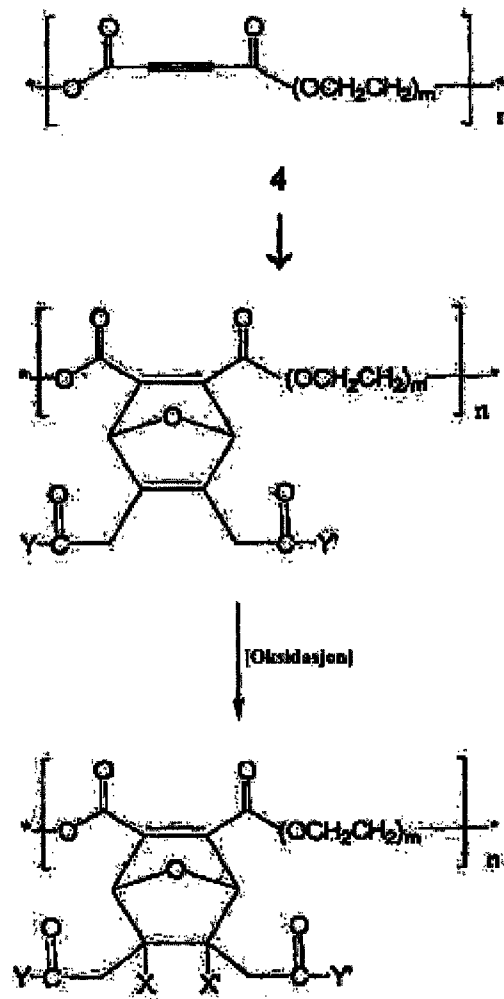
3a

hvor Y og Y' kan være like eller forskjellige, og de er fortrinnsvis valgt blant OH, NH₂, ONH₂, NHOH og NHNH₂. I en foretrukket utførelsesform er ditiolens hydroksyl- eller aminogrupper de reaktive grupper X som tjener som bindingspunkter for de målrettende grupper eller legemiddelgrupper, mens de funksjonelle grupper Y og Y' tjener som bindingspunkter for C-deler. Alternativt kan gruppene Y og Y' tjene som bindingspunkter, mens hydroksyl- eller aminogruppene anvendes til å binde C-delene.

Formeler 3 og 3a er ment å vise at hvert svovelatom fritt kan være bundet i α - eller β -stilling til en karbonylgruppe i PEG-esteren. Det som er beskrevet her innbefatter enkle isomersammensetninger samt blandinger av regioisomerer med én eller begge C-S-bindinger. På grunn av de fire asymmetriske karbonatomene i formel 1, innbefatter det som er beskrevet her videre alle enantiomere, meso og diastereomere isomerer og blandinger derav.

Diels-Alder-adduktet av acetylendikarboksylysyre og et furan kan også tjene som en egnet forgreningsdel. For eksempel er det kjent at polyesteren 4 avledet fra PEG og acetylendikarboksylysyre gjennomgår Diels-Alder-reaksjoner med furaner (M. Delerba et al., *Macromol. Rapid Commun.* 18(8):723-728 (1997)).

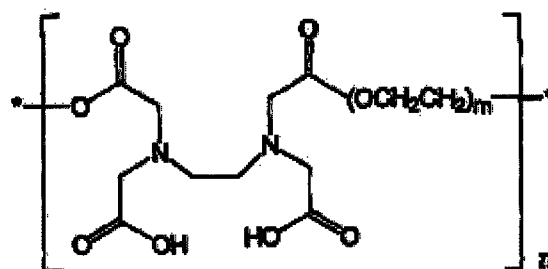
10



Reaksjonsskjema 1

Således kan den bli underkastet en Diels-Alder-reaksjon med et 3,4-di-
 5 substituert furan og generere forbindelser som 5, og polymer 5 kan bli modifisert ved
 hydroksylering eller epoksidering og danne reaktive grupper, (f.eks. X og X' i
 reaksjonsskjema 1).

Likeledes vil reaksjonen mellom PEG og etylendiamintetraeddiksyre-
 dianhydrid gi en polyester med formel 6:

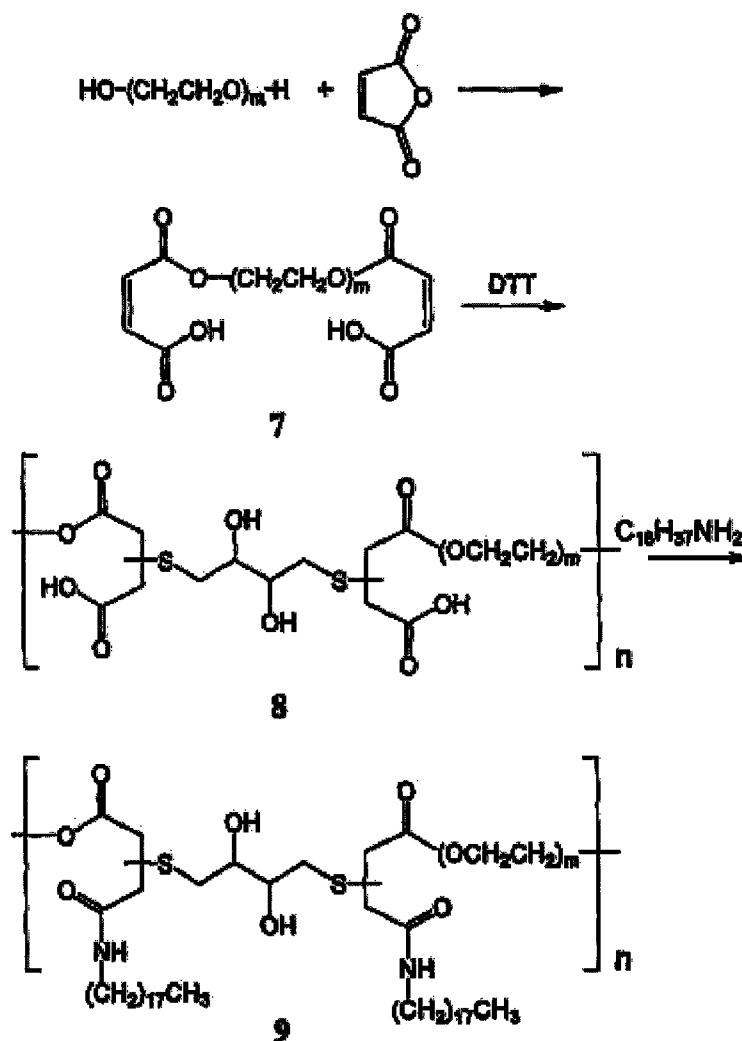


6

Andre egnede forgreningsdeler kan bli avledet fra vinsyre, acetylen-
 dikarboksytsyre, nitriltrieddiksyre, 3,4,3',4'-difenylsulfontetrakarboksytsyredianhydrid,
 3,4,3',4'-difenyleter-tetrakarboksytsyredianhydrid, pyromellitinsyredianhydrid, alkan-
 ditioler så som 1,2-etanditiotol og 1,4-butanditiotol, bis(2-merkaptotetyl)eter, 2-merkaptotetyl-
 5 etylsulfid, dimerkaptopropanol, dimerkaptopurin, dimerkaptotiadiazol, dimerkaptot-
 ravsyre, benzendimetantioler, benzenditioler, dihalogenerte benzendimetantioler,
 dihalogenert 4,4'-tiobisbenzentioler, og lignende.

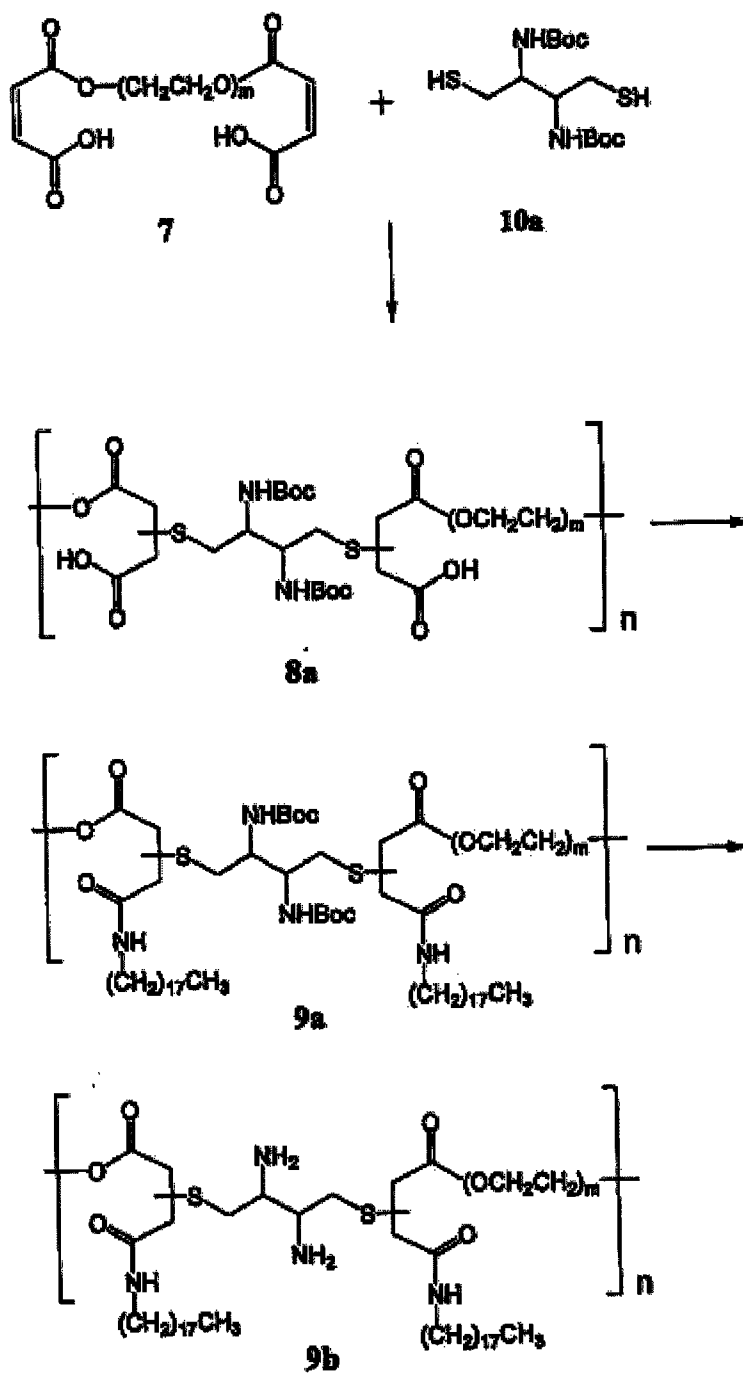
Når Y og Y' er OH, kan hydrofobe grupper C bli bundet til polymeren ved
 amidering eller forestring av karboksytsyregruppene. De hydrofobe grupper C er
 10 fortrinnsvis relativt små (C_8 - C_{20}) og overveiende hydrokarbondeler, og de kan være
 lineære eller forgrenede eller inneholde én eller flere ringer. Eksempler innbefatter,
 kovalent bundne dodecylamin-, pentadecylamin-, kolesterol- og kolinsyregrupper. Selv
 om polymerene beskrevet her av hensiktsmessige årsaker er vist å ha høyst to
 forskjellige hydrofobe sidekjeder, så vil det være underforstått at blandinger av to eller
 15 flere hydrofobe forbindelser kan anvendes for å innføre en rekke hydrofobe sidekjeder i
 en bestemt polymer.

Som ett spesifikt eksempel ble en polymer med formel 2, hvor $X = OH$ og
 $r = 2$, fremstilt ved å omsette en polyetylenglykol med maleinsyreanhydrid for å danne
 polyesteren 7, fulgt av omsetning med ditiotreitotol for å danne 8. Syre 7 ble deretter
 20 amidert med oktadecylamin for å danne den ønskede kam-polymer 9 (reaksjonsskjema
 2). De DTT-avlede amid-kampolymerer representert med formel 9, er her henvist til
 som " π -polymer A". Den spesifikke polymer 9 i reaksjonsskjema 2 vil så bli betegnet
 " C_{18} - π -polymer A".



Reaksjonsskjema 2

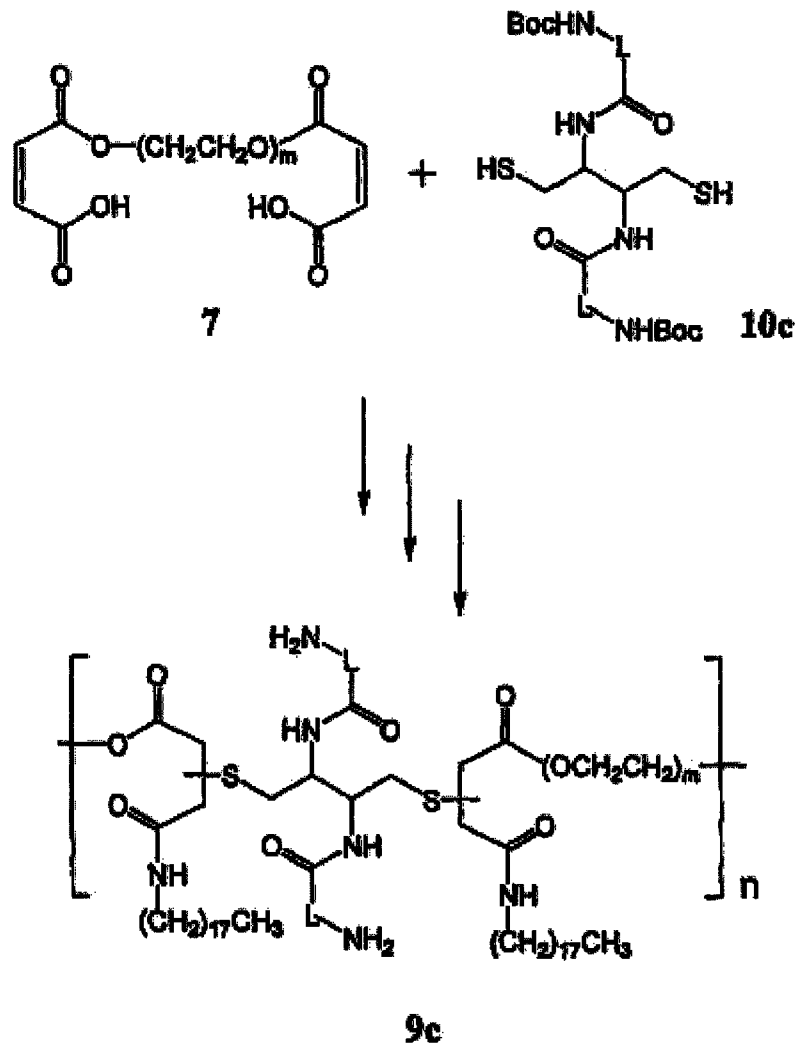
- 5 Substitusjon av 2,3-bis(t-butoksykarbonylamino)butan-1,4-ditiol (fremstilt ved fremgangsmåten ifølge DuPriest et al., US 475528) leder for ditiotreitol, etter avbeskyttelse, til den korresponderende amin-funksjonaliserte π -polymer 9b (reaksjonsskjema 3).



Reaksjonsskjema 3

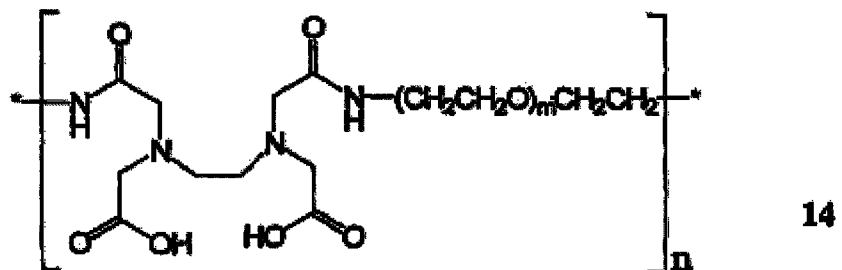
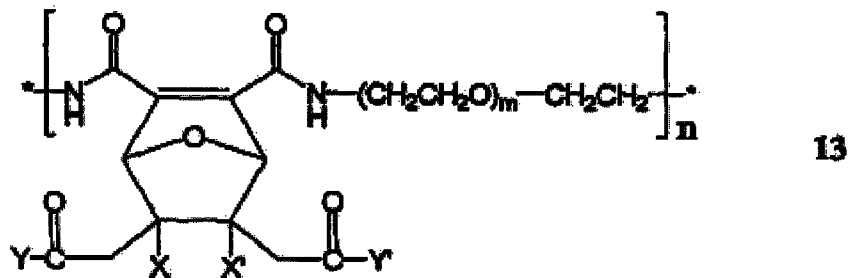
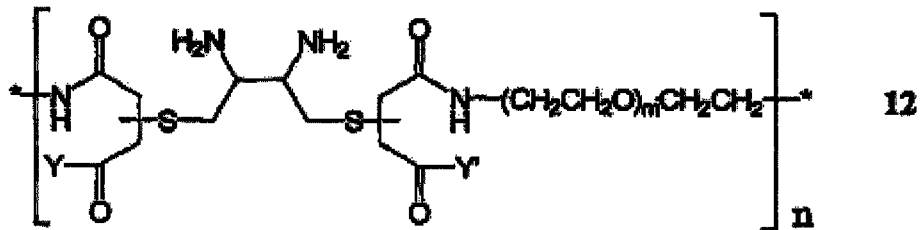
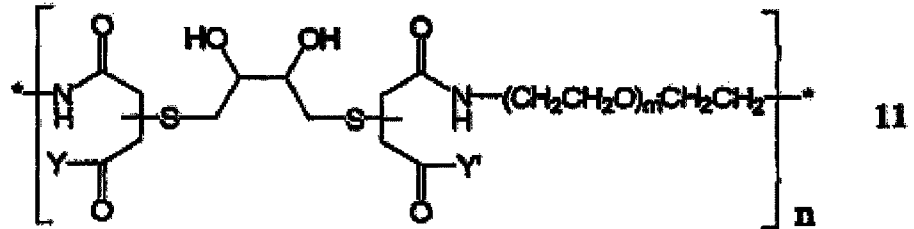
Anvendelse av butanditiol 10c leder likeledes til polymerene med generell struktur 9c, med avstandsgrupper L i stedet for påfølgende tilbinding av målrettende grupper (reaksjonsskjema 4). Avstandsgruppene L kan være enhver avstandsgruppe kjent i faget for anvendelse ved binding av ligander til eller merking av substrat-

5 molekylar, innbefattende C₂-C₂₀-alkylen- og oligoetylen-glykol-avstandsgrupper.

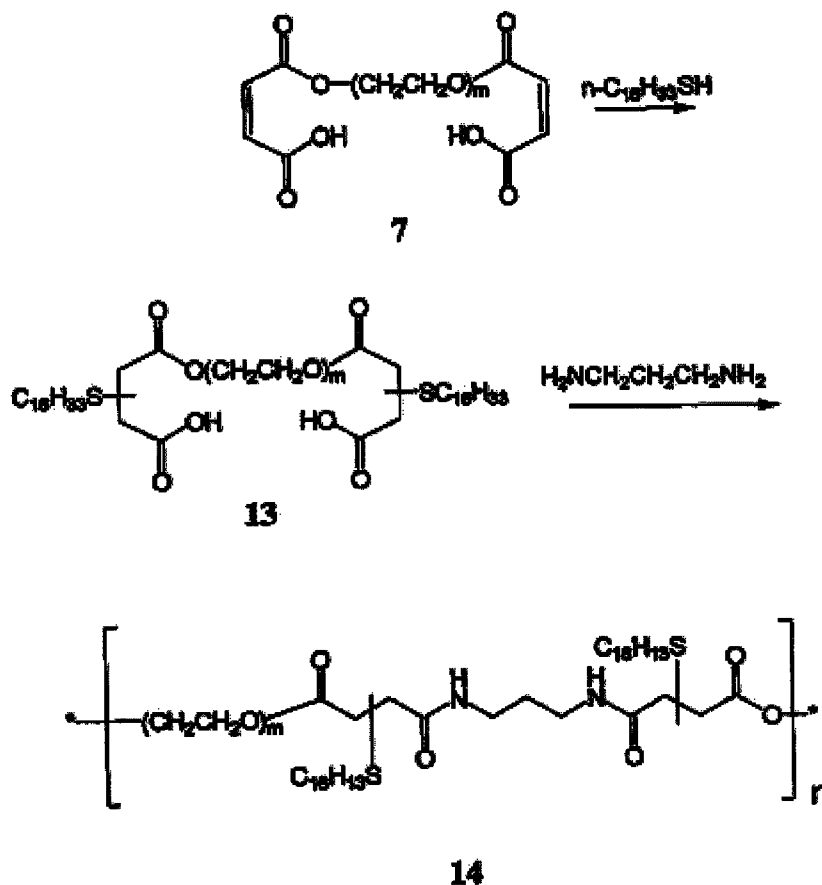


Reaksjonsskjema 4

I andre utførelsesformer kan en PEG-polymer med terminale aminogruyper bli anvendt til å fremstille eksempler som har amidbindinger mellom A- og B-enhetene, som vist med strukturer 10-14 nedenfor. Hvert av disse polyamider kan bli oppnådd via omsetning av PEG-diaminet $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ med et hensiktsmessig syklisk anhydrid:

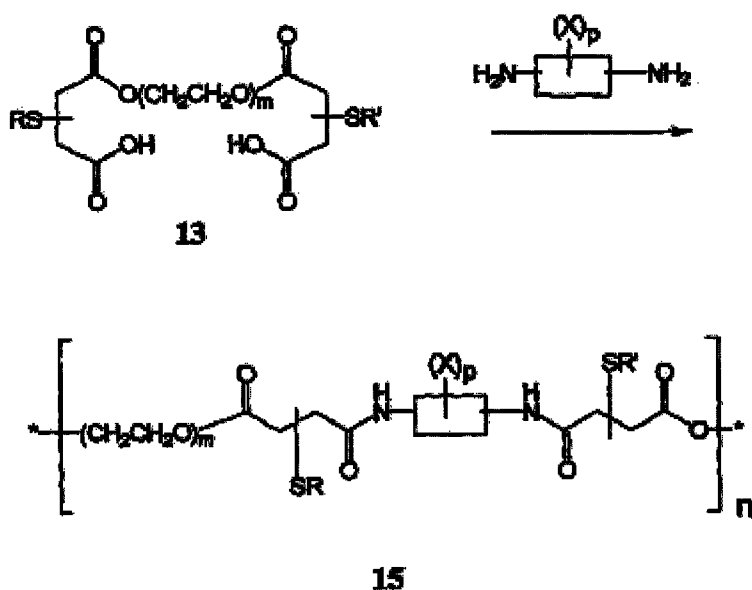


Under milde betingelser er de ovennevnte amidsyrer de forventede produkter. Ved oppvarming kan det forventes imiddannelse, hvilket leder til polymerer med færre reaktive grupper, men som fortsatt er egnet for tilbinding av hydrofobe C-deler. Alternativt kan sidekjedene C bli addert til endene av polymerblokk A, og forgreningsdelene kan oppstå på polymerisasjonstidspunktet (reaksjonsskjema 5).



Reaksjonsskjema 5

I tillegg til enkle diaminer, så som 1,3-diaminpropan som vist i reaksjonsskjema 5, kan det bli benyttet diaminer som har (eventuelt maskerte) reaktive funksjonelle grupper X, hvilke leder til polymerer 15 som er egnet for tilbinding av målrettende grupper (reaksjonsskjema 6). I formlene nedenfor kan p være i området 0-4, og hver X er uavhengig lik, eller forskjellig fra, enhver annen gruppe X som kan være til stede. En reaktiv gruppe X behøver ikke være sidegruppe, men kan for eksempel være en NH-gruppe inne i kjeden av atomer som utgjør diaminet, som i monomeren $H_2H-(CH_2)_3-NK-(CH_2)_3-NH_2$.



Reaksjonsskjema 6

Noen bestemte av π -polymerene fremstilt som vist over, har reaktive grupper

5 X som er egnet for videre derivatisering for å tilbinde målrettende grupper, så som små molekylar, peptider, nukleotider, sukkere, antistoffer, etc., eller for å oppnå tverrbinding av polymerkjedene via bifunksjonelle eller multifunksjonelle tverrbindingsmidler. I bestemte utførelsesformer utføres partiell derivatisering av de reaktive

10 forskjellige reaktive grupper som gjør det mulig å binde en rekke målrettende grupper og legemiddelgrupper til en enkelt polymerkjede. Således vil addisjon av en substøkiometrisk mengde akryloylklorid (eller maleinsyreanhydrid) til π -polymeren i eksempel 1, gi en polymer med både akryloylgrupper (eller maleylgrupper) og gjenværende hydroksylgrupper. Påfølgende Michael-addisjon av en sub-støkiometrisk

15 mengde av en merkpto-karboksylysyre, for eksempel HS-(π -CH₂)₃-COOH, vil gi en polymer med hydroksyl-, akryloyl- og karboksylgrupper. Addisjon av cystein innfører amino- og karboksylgrupper, i tillegg til mulige gjenværende reaktive grupper som er tilbake etter den sub-støkiometriske mengde med reagenser.

En annen metode for å oppnå polyfunksjonelle π -polymerer innebærer bevisst

20 utelatelse av en fraksjon av de hydrofobe kjeder C. For eksempel kan π -polymeren i eksempel 1 bli fremstilt med uomsatte karboksylsyregrupper ved ganske enkelt å begrense mengden sidegruppedannende alkylamin i amidringstrinnet. En annen metode er amidring med en blanding av aminer, hvorav en fraksjon inneholder en reaktiv gruppe X. Under passende betingelser (overskudd av maleinsyreanhydrid i trinn

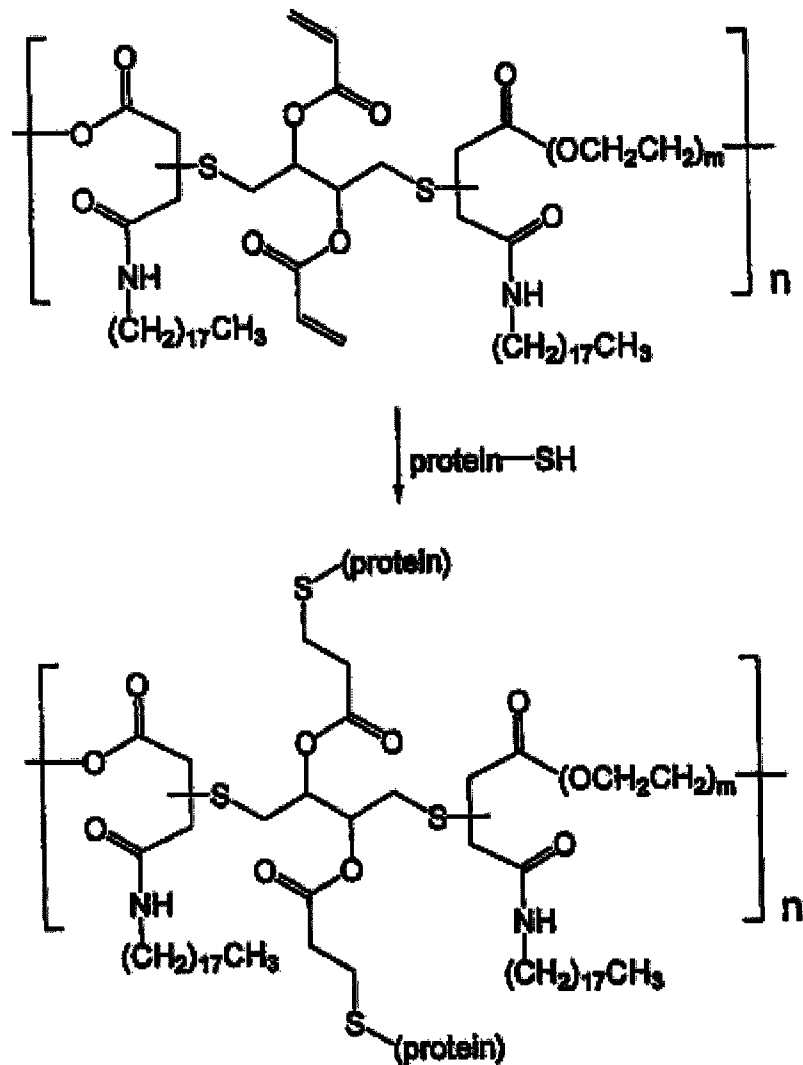
A og overskudd av DTT i trinn B) kan det bli oppnådd en fremstilt polymer med ønsket populasjon av frie tiolgrupper.

Gjennom planlegging kan π -polymeren i eksempel 1 inneholde hydroksylgrupper som kommer fra DTT-delen i ryggraden, og disse tjener som reaktive grupper

5 X. Forestring av disse grupper med akryloylchlorid eller metakryloylchlorid i vandig medium i nærvær av en karbonat/bikarbonat-buffer resulterer i akryloylsubstitusjon av -OH-gruppene. Den akrylerte polymer kan lett bli underkastet radikalpolymerisasjon

(med eller uten addert radikalmonomer, så som en akrylforbindelse eller et tvrrbindingsmiddel så som bis-akrylforbindelse) for å oppnå hydrogeler som er egnet for

10 regulert avlevering av legemiddel (virker som polymerdepoter eller reservoarer) og for topisk anvendelse (så som hudplastere eller salver).



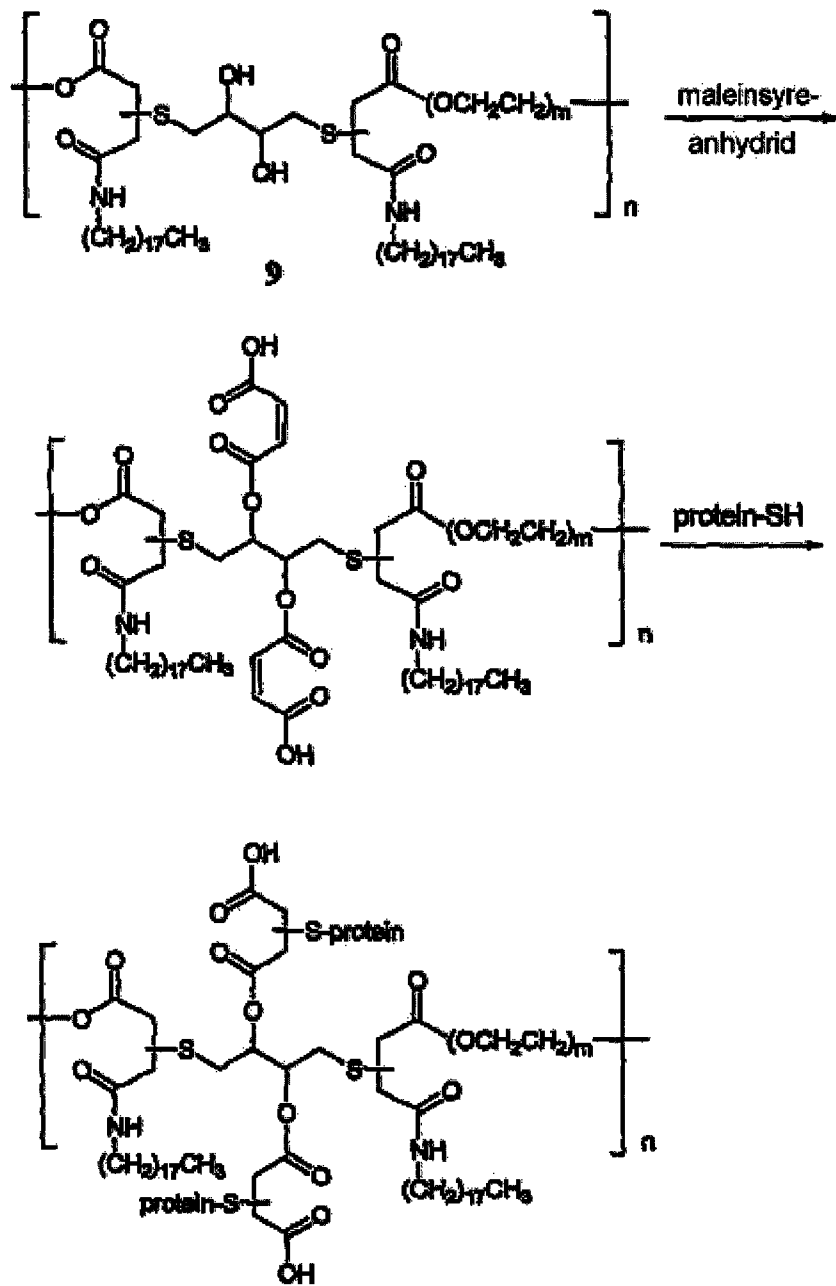
Reaksjonsskjema 7

Spesielt kan akrylgruppen også bli underkastet en Michael-addisjon med en tiol, så som et cysteinresidu i et protein, enzym, peptid, antistoff, Fab'2-fragment eller Fab'-fragment, eller en annen målrettende gruppe (reaksjonsskjema 7). En π -polymer som inneholder reaktive hydroksylgrupper etter tørking kan også bli foresteret med maleinsyreanhydrid for å binde maleatgruppen, en Michael-akseptor, samtidig som det genereres en fri karboksylgruppe. I den resulterende polymer er malein-dobbeltbindingen tilgjengelig for en Michael-addisjon, spesielt med en tiol så som et cysteinresidu i et protein, enzym, peptid, antistoff, Fab'2-fragment eller Fab'-fragment, eller en annen målrettende gruppe (reaksjonsskjema 8), og karboksylgruppen er tilgjengelig for kobling til aminogru-
per i legemidler eller ligander, eller til lysinresiduer i proteiner og peptider.

Videre kan en annen del bli bundet til den nylig innførte (eller tilgjengelig fra før) karboksylgruppe via amidering. Således kan det bli bundet minst to forskjellige målrettende grupper, selv under reaksjonsbetingelser hvor det er metning (dvs. gruppen som skal bli bundet er til stede i støkiometrisk overskudd).

Polymerer som har karboksylat-sidegrupper kan bli amidert med aminer under typiske koblingsbetingelser, og de kan også bli konvertert til isocyanatgrupper via Curtius-omleiring og deretter bli koblet til aminer eller alkoholer for å danne henholdsvis ureaer og karbamater. Slike reaksjoner kan bli anvendt for å innføre de hydrofobe grupper C, eller til å binde målrettende grupper.

Frie aminer kan bli innført i polymeren ved minst delvis omsetning av én av de reaktive grupper med et diamin. Diaminet må velges slik at én av amingruppene er enten beskyttet eller ureaktiv under reaksjonsbetingelsene. Det sistnevnte kan hyppig bli oppnådd ved å anvende etylendiamin ved pH på ca. 7,5, siden de to aminogru-
per har en pKa som er vesentlig forskjellige. Fortrinnsvis utføres amideringen som et separat trinn etter innføringen av de hydrofobe sidegrupper. Et peptid eller et annet molekyl som har en karboksylgruppe, kan så bli bundet ved amidering til dette frie amin.



Reaksjonsskjema 8

Selv under betingelser med metning kan således så mange som tre forskjellige
 5 peptider eller andre målrettende grupper bli bundet til π -polymeren: én via tiolen, én
 via aminet eller hydroksylet, og én via karboksylsyregruppen.

Hydroksyl- og tiolgrupper kan også bli konvertert til primære aminer ved
 omsetning med aziridin eller et halogenalkylamin (så som brometylamin eller kloretyl-
 amin). Amidering med cysteamin vil innføre et disulfid som kan bli direkte omsatt med
 10 cysteinet i et peptid eller antistoff for å binde peptidet eller antistoffet, eller det kan

først foretas reduksjon, for eksempel med aminoetantiol eller DTT, for videre omsetning med et peptid eller antistoff.

Ved å foreta partielle reaksjoner kan man innføre flere reaktive funksjonelle grupper i en polymer beskrevet her, innbefattende (1) tiol-reaktive grupper så som
 5 akrylsyre- eller maleinsyrederivater, (2) karboksylsyre-reaktive grupper så som amino eller hydroksyl, (3) amin-reaktive grupper så som karboksyl og (4) disulfid-reaktive grupper så som merkaptol. Antallet slike adderte funksjonelle grupper pr. polymermolekyl kan være i området fra $1/r$ og opp til flere multipler av r , avhengig av det anvendte reagens og den anvendte mengde.

10 Alternativt kan det bindes to eller flere spesifikke ligander for å forbedre bindingsspesifiteten til for eksempel et virus eller en celleoverflate. To eller flere spesifikke ligander kan også bli anvendt for således å frembringe en interaksjon mellom forskjellige cellulære mål, for eksempel kan én ligand ha som mål en viruspartikkel, og en annen ligand kan underlette binding til en fagocyt, og derved bringe
 15 viruspartikkelen i nærhet av eller i kontakt med fagocytten og fremme fagocytose.

Slik derivatisering tillater binding av tre eller flere distinkte målrettende og/eller terapeutiske grupper til polymeren gjennom forskjellige funksjonelle gruppebindinger (så som amin, karboksylat og tiol). Således kan man binde et vevsspesifikt målrettet middel, et bildedannende middel og et terapeutisk middel til en
 20 enkelt polymerkjede, og deretter vil polymeren selvsamle seg og gi et målrettet terapeutikum hvor fordelingen og effektiviteten av målrettingen kan bli overvåket.

Binding av ligander til de repeterende enheter i polymerene ifølge oppfinnelsen gir multivalent tilgjengelighet av liganden på polymerkjeden og på overflaten av nanopartikkelen. Multivalent tilgjengelighet leder ofte til stor økning i affiniteten for målet.
 25 For eksempel kan multivalente antistoffer være langt mer effektive for å nå målstedene enn normale divalente antistoffer. Karbohydratbindende proteiner og karbohydrater er kjent for å være multivalente av natur og ineffektive når de er monovalente. Likeledes vil multivalente peptid- og karbohydratmålrettende grupper være langt mer effektive enn monomeren alene. Økningen i molekylvekt på grunn av bindingen til polymeren
 30 resulterer i redusert renal utskillelseshastighet for peptider og andre ligander. I tillegg gir PEG-ryggraden peptidet tilsvarende fordeler som ved PEGylering, innbefattende evasjon av immunovervåkning.

Videre vil en multivalent målrettende gruppe tapetsere et multivalent mål (gjørne en viruspartikkel) og nøytralisere det langt mer effektivt enn den monomere
 35 målrettende gruppe. Evnen til å fremvise mange (forskjellige) peptider i multivalent format vil lede til økt spesifitet. For eksempel kan en sann HIV-spesifikk (HIV-virusbindende) polymer bli oppbygd ved å binde et peptid korresponderende til virusets CD4-bindingsregion, og et annet peptid korresponderende til virusets CCR-5- eller

CXCR-4-bindingsregion, og eventuelt et tredje peptid korresponderende til den andre reseptor (henholdsvis CXCR-4 eller CCR-5). En slik polymer kunne maskere virusets bindingsregioner fullstendig og gjøre viruset ute av stand til å angripe celler og derved bli ikke-infektive. I tillegg ville polymerenes surfaktantegenskaper lede til destabilisering av selve virusstrukturen ved binding. I stedet for peptider kan det anvendes små molekylar som interfererer med de samme bindingsmønstre (CD4, CCR-5, CXCR-4) eller en blanding av peptider og små molekylar, for eksempel med kompletterende aktiviteter. De resulterende polymerer vil gjøre ethvert fritt virus ineffektivt og de kan således være ideelle for å stoppe spredning av infeksjon, ved å anvende dem som komponenter i smøremidler på kondomer og lignende. I tillegg kan slike polymerer bli injisert i pasienter for å redusere HIV-byrden.

Når et polyfunksjonelt reagens, så som DTT, blir benyttet, kan det generelt være en partiell tverrbinding av polymerkjedene via forestring av karboksylsyren med DTT eller lignende bireaksjoner. Sekundære hydroksylgrupper i det sentrale området av PEG-kjedene, for eksempel dem forbundet med rester av bisfenol A-diglycidyleter, kan også bidra til tverrbinding dersom de er til stede i PEG-utgangsmaterialet. De resulterende tverrbundne hydrogelstrukturer er også anvendelige materialer. Ved en passende økning i omfanget av denne tverrbinding, eller ved eksplisitt tverrbinding ved anvendelse av alternative tverrbindere (som f.eks. bis-oksyraner), kan det fremstilles materialer som er fleksible hydrogeler som kan tjene som lagerdepoter for legemidler. Ved hensiktsmessig modifisering av materialene (f.eks. kortere PEG-lengde, større åpne karboksylgrupper og inkorporering av egnede akrylgrupper) kan det bli dannet enten lineære eller tverrbundne hydrogelmateriale som kan tjene som lagre som kan være båret enten immobilisert på innretninger så som stenter, eller absorbert i innretninger så som puter for adhesive plastery eller plastery innført subdermalt. Generelt vil slike tverrbundne materialer være egnet for regulert frigivelse snarere enn økt målrettet frigivelse.

Kam-polymerene beskrevet her er anvendelige til å oppløseliggjøre dårlig vannløselige materialer i vandige løsningsmiddelsystemer. Fremgangsmåten med å oppløseliggjøre en substans i et vandig løsningsmiddel omfatter å bringe den dårlig oppløselige substans i kontakt med en kamtype-polymer ifølge oppfinnelsen i nærvær av vann slik at det dannes et vannløselig kompleks av substansen og av polymeren. Alternativt kan polymeren og substansen som skal bli oppløst, bli kombinert i en vandig-organisk tofase-emulsjon, og det organiske løsningsmiddel fjernes ved fordampning. Et eksempel på en prosess er beskrevet i US 6838089. Det antas at i de fleste tilfeller vil polymeren selvsamles til nanopartikler som har den dårlig løselige substans oppløst blant de hydrofobe C-kjeder som koalescerer i kjernen av partiklene,

mens A-blokkene danner en hydrofil korona som senker den frie energi i grenseflaten tilstrekkelig til at det oppnås en vandig partikkelsuspensjon som forblir stabil.

I noen tilfeller vil den dårlig løselige substans ikke bli fullstendig oppløst i kjernen, men kan eksistere som en fast nanopartikkel omgitt av og suspendert i C-kjedene i kjerne av partiklene. For målet med det som er beskrevet her er dette en
5 gradsforskjell siden praktiseringen av det som er beskrevet her ikke avhenger av noen bestemt grad av blanding av C-kjedene med den dårlig løselige substans. Substansen kan i noen tilfeller bli oppløst på molekylnivå blant C-kjedene, men i andre tilfeller kan den vise en grad av fase-separasjon fra de omgivende C-kjeder. I noen tilfeller kan
10 det forventes at systemet vil bevege seg fra én tilstand til en annen som en funksjon av temperatur.

Den hydrofobe kjerne i polymerpartiklene kan få modifisert solvatiseringskraften ved å modifisere de hydrofobe C-kjeder. Egnede modifikasjoner innbefatter innføring av én eller flere hydrofile substituent, så som hydroksyl-, eter-, amid- og
15 cyanofunksjonelle grupper, for å øke polariteten og/eller polariserbarheten i den hydrofobe kjerne.

Dårlig løselige materialer som kan bli gjort løselige med disse polymerer, innbefatter fettløselige vitaminer og næringsstoffer, innbefattende vitamin A, D, E og K, karotener, kolekasiferol og koenzym Q, uløselige legemidler så som docetaxsel, amfotericin B, nystatin, paklitaxsel, oksorubicin, rubitekan, teniposid, etoposid,
20 daunomycin, metotreksat, mitomycin C, syklosporin, irinotekan-metabolitt (SN-38), statiner og stereoider, fargestoffer, fotodynamiske midler og bildegivende midler, og nukleinsyrer, nukleinsyreanaloger og nukleinsyrekomplekser. Nukleinsyreanaloger innbefatter forbindelser så som tiofosfater og peptidnukleinsyrer.
25 Nukleinsyrekomplekser er ioniske komplekser av oligonukleinsyrer med en vesentlig ladningsnøytraliserende mengde av kationiske eller polykationiske forbindelser.

For målet med denne beskrivelse er et legemiddel som er uløselig ved nøytral pH, ansett å være "dårlig løselig", fordi det i mange tilfeller er behov for et nøytralt farmasøytisk preparat. For eksempel er ciprofloksacin temmelig løselig i vann med pH
30 under 4,5, men denne pH kan være sterkt irriterende når legemidlet blir formulert for okkular administrasjon. En polymer beskrevet her vil gjøre ciprofloksacin oppløselig i normalt saltvann ved pH 7. For hensikten med denne beskrivelse skal altså "dårlig løselig" være underforstått å betegne enhver substans hvor løseligheten i en vandig vehikkel er slik at en økning i løseligheten ville gi et forbedret eller mer anvendelig
35 preparat. Således vil et legemiddel som er moderat løselig, for eksempel med rundt 2 g/l, være "dårlig løselig" dersom en enhetsdose for intravenøs administrasjon er 5 g.

Som et resultat av evnen polymerene ifølge oppfinnelsen har til å oppløseliggjøre farmakologisk aktive forbindelser, tilveiebringes med den foreliggende

oppfinnelse også farmasøytiske preparater som omfatter én eller flere π -polymerer ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med en terapeutisk effektiv mengde av ett eller flere farmakologisk aktive midler. Polymerene beskrevet her kan gjøre effektivt det som ellers ville være en ineffektiv mengde av et farmakologisk aktivt middel. For hensikten med denne beskrivelse er derfor en "terapeutisk effektiv mengde" den mengde av midlet som gjør det totale preparat effektivt.

Eksperimentelt

1. Generelle fremgangsmåter

10 Det som er beskrevet her angår også fremgangsmåter for fremstilling av kampolymerene beskrevet her. Syntetisering av disse polymerer utføres lett av fagfolk på området organisk syntese ved å følge fremgangsmåtene beskrevet nedenfor. Det sentrale utgangsmateriale er polyetylenglykol, som fortrinnsvis tørkes før bruk. Dette 15 gjøres hensiktsmessig ved at smeltet PEG omrøres i vakuum ved en forhøyet temperatur inntil det ikke lenger dannes bobler. Dette kan ta 8-12 timer, avhengig av kvaliteten på PEG. Når PEG er tørket kan det bli lagret under argon i uendelig tid. Kommersielt tilgjengelige industrielle kvaliteter og forskningskvaliteter av PEG kan bli benyttet ved fremstillingen av polymerene ifølge oppfinnelsen, for eksempel det 20 kommersielt tilgjengelige polydisperse "PEG 1500" som har en molekylvektsfordeling på 1430-1570. I et slikt materiale kan det være inkorporert bisfenol A-diglycidyleter som innfører sekundære hydroksylgrupper i midten av PEG-kjeden. For å sikre at polymerene beskrevet her har de mest reproduserbare og konsistente egenskaper, er PEG fortrinnsvis fri for bisfenol A, og har lav dispersitet. Mest foretrukket er PEG-polymerer som er > 95 % monodisperse, slike som er kommersielt tilgjengelige fra 25 Nektar Therapeutics (tidligere Shearwater Polymers), Huntsville AL og Polypure AS, Oslo, Norge. Et eksempel på et særlig foretrukket PEG er "PEG-28" fra Polypure, som er > 95 % $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{28}\text{H}$, molekylvekt 1252.

Alle reaksjoner utføres i inert atmosfære, så som nitrogen eller argon, med magnetrøring eller fortrinnsvis mekanisk røring.

30 I trinn A blir tørr PEG smeltet, og maleinsyreanhydrid (2 mol pr. mol PEG) tilsettes under omrøring. Mengden maleinsyreanhydrid bør stemme overens med antallet PEG-terminale hydroksylgrupper så godt som mulig. Et underskudd på maleinsyreanhydrid vil resultere i hydroksyl-terminerte polymerkjeder, mens et overskudd av maleinsyreanhydrid vil forbruke tiolgruppene i neste trinn og lede til en for tidlig 35 kjedeterminering og terminale karboksylgrupper. Reaksjonstemperaturen er ikke kritisk og prosessen kan hensiktsmessig utføres ved temperaturer mellom 45 °C og 100 °C. Den foretrukne reaksjonstemperatur er mellom 65 °C og 90 °C. Dersom det benyttes forhøyede temperaturer har maleinsyreanhydrid en tendens til å sublimeres, og det bør

tas trinn for å påse at maleinsyreanhydridet forblir i oppløsning. Minimering av rommet over løsningen og nedsenking av reaksjonskaret i et oljebad er effektive metoder.

Avhengig av den valgte temperatur kan reaksjonen være fullstendig i løpet av to timer eller kortere, eller den kan utføres over natten. Reaksjonen kan overvåkes med TLC på silikagelplater, og den får fortsette inntil maleinsyreanhydridet har forsvunnet. Visuell kontrast, UV og jodfarging, kan alle bli anvendt for å undersøke TLC-platene.

I trinn B blir urent PEG-bis-maleatester produsert i trinn A kombinert med ditionitretol (DTT) og N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED) (om nødvendig med tilsatt vann for fluiditet), og blandingen omrøres ved 70 °C. Reaksjonen er fullstendig i løpet av 30 minutter, dette vises ved en hurtig viskositetsøkning. Produktets molekylvekt vil bli redusert dersom det anvendes mindre enn optimal mengde DTT. Produktets molekylvekt kan også bli redusert, om ønsket, ved å erstatte TEMED med en mindre effektiv tertiær aminbase, så som TEA.

I trinn C blir det til reaksjonsblandingen tilsatt tilstrekkelig vann til å redusere viskositeten, det tilsettes 0,1 mol N-hydroksysuksinimid (NHS) og 1,05 mol hekсадecylamin pr. mol karboksylsyregrupper i polymeren. (Denne mengde NHS viser seg optimalt å minimere graden av sidereaksjoner.) Et overskudd av N-(3-dimeylamino-propyl)-N'-etylkarbodiimid (EDC) (1,4 mol EDC pr. mol karboksylsyregrupper) tilsettes deretter i porsjoner, og ytterligere vann tilsettes etter behov for å kunne opprettholde omrøring. Reaksjonsblandingens pH holdes over 7, og fortrinnsvis mellom 9 og 11, for å optimalisere reaktiviteten hos alkylaminet. Med dodecylamin kan denne reaksjon bli utført ved ca. 40-45 °C, mens med oktadecylamin er temperaturen ca. 55 °C - 57 °C. Reaksjonen følges av TLC inntil det observeres et konstant nivå av gjenværende alkylamin, typisk etter kjøring over natten.

Reaksjonsblandingen surgjøres til pH fra ca. 3,0 til ca. 4,5 og omrøres ved romtemperatur i ca. 24 timer for å ødelegge uomsatt EDC, deretter titreres til pH 7,0 ved å anvende 1 N NaOH. Reaksjonsblandingen blir til slutt sentrifugert ved ca. 800 xg i 1-3 timer for å fjerne faste forurensninger og biprodukter.

Etter sentrifugering kan den overliggende væske bli kromatografert på en GPC-kolonne (Toyopearl, Sephadex, Sephacryl, Biogel, etc). π -Polymerene er amfipatiske materialer og vil vise affinitet for de fleste GPC-kolonnepakninger, og dette vil således komplisere fjerningen av kontaminanter. Alternativt kan polymeren bli kromatografert på en storporet hydrofob interaksjonskolonne (f.eks. TOYOPEARL Phenyl 650C, Toshoh Biosciences, Montgomeryville, PA, USA) med eluering med en gradient av metanol i vann. Fortrinnsvis blir reaksjonsblandingen dialysert mot flere forskjellige surgjorte og nøytrale vann for å fjerne lavmolekylære startmaterialer og reaksjonsbiprodukter.

Reaksjonsblandingen kan også bli ekstrahert med butanon, isopropanol, butanol eller andre polare løsningsmidler for å fjerne organiske forurensninger, men vesentlige mengder av den amfifile polymer går tapt til ekstraksjonsløsningsmidlet. Fortrinnsvis blir reaksjonsblandingen underkastet ultrafiltrering ved å anvende egnede membraner for å fraksjonere produktet i molekylvektkvaliteter, så som 5kDa til 10kDa, 10kDa til 30kDa, 30kDa til 50kDa, etc., avhengig av avkuttingen med den benyttede filtreringsmembran. En vannløsning av polymeren kan bli underkastet en sluttende-filtrering for å produsere en steril eller virusfri oppløsning, avhengig av valget av filtreringsmembran eller medium.

10

2. Syntetisering av π -polymerer

Eksempel 1: PEG-di(alkylamidoksuksinidyl)ditioeter, polymer (C16- π -polymer A) med middels molekylvekt

Polyetylenglykol (PEG-1500, Sigma Chemical Co.) ble tørket i vakuum ved 80 °C inntil det ikke lenger ble dannet bobler (8-12 timer, avhengig av PEG-kvaliteten). Den tørkede PEG kan bli lagret tørt under argon uendelig.

Den tørkede PEG ble smeltet under argon i et oljebad, og maleinsyreanhydrid (2 mol pr. mol PEG, korrigert for forurensninger) ble gradvis tilsatt under omrøring. Blandingen ble omrørt under argon ved 90 °C. Fordi maleinsyre har en tendens til å sublimere ble topprommet minimert og hele reaksjonskaret ble holdt ved reaksjonstemperaturen. Mulig kondensert maleinsyreanhydrid på karveggene ble skrapet tilbake inn i reaksjonsblandingen. Reaksjonsforløpet ble overvåket med TLC på silikagelplater, ved å anvende etanol og heksan som løsningsmidler hver for seg, med UV-visualisering og jodfarging. Reaksjonen fortsatte i 1 time etter at maleinsyreanhydrid hadde forsvunnet.

Det urene PEG-dimaleat ble fortynnet med to volumdeler vann. En oppløsning av ditiotreitol (DTT, 1,01 ekvivalenter pr. ekvivalent PEG) og N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED, 1,02 ekvivalenter) i vann (2 volumdeler vann pr. volumdel TEMED) ble deretter tilsatt til reaksjonsblandingen under omrøring. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 70 °C under argon i 2,5 timer, og fikk så hvile ved romtemperatur over natten og ble igjen omrørt ved 70 °C i to timer. Reaksjonen ble overvåket med TLC og ble bedømt å være fullstendig da DTT hadde forsvunnet fullstendig.

Vann ble tilsatt til den ovennevnte reaksjonsblanding for å redusere viskositeten, inntil blandingen kunne bli omrørt (med ca. 25 % faststoff), blandingen ble omrørt ved 65 °C under argon, og N-hydroksysuksinimid (0,1 mol pr. mol karboksylsyregrupper i PEG-dimaleat-DTT-polymer) ble tilsatt, fulgt av heksadecylamin (1,05 mol pr. mol karboksylsyregrupper i polymeren) og N-(3-dimetylamin-

35

propyl)-N'-etylkarbodiimid (EDC, 0,56 mol pr. mol karboksylsyregrupper i polymeren). Blandingen ble omrørt under argon i 1 time og en andre porsjon av EDC (0,56 mol pr. mol karboksylsyregrupper i polymeren) ble tilsatt. Etter ytterligere 1 time ble videre en tredje porsjon med EDC (0,28 mol pr. mol karboksylsyregrupper i polymeren, med en total mengde 1,4 mol EDC pr. mol karboksylsyre) tilsatt for å kompensere for tap av EDC ved hydrolyse. Ytterligere vann ble tilsatt etter behov for å opprettholde fluiditet, fordi de tilsatte faste stoffer gjorde suspensjonen vanskelig å omrøre, og pH ble holdt mellom 8 og 10 ved å tilsette 1 N NaOH etter behov.

Blandingen ble omrørt ved 65 °C under argon over natten, overvåket med TLC (silika med etanol) inntil alkylaminet syntes å ha nådd en konstant konsentrasjon, og ble deretter omrørt i ytterligere 4 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter surgjort med 1 N HCl til pH på ca. 4,5, omrørt i 24 timer for å ødelegge uomsatt EDC, og justert til pH 7,0 ved dråpevis tilsetning av 1 N NaOH. Med dodecylamin ble denne reaksjon utført ved ca. 40-45 °C, mens med oktadecylamin var temperaturen fortrinnsvis 55-57 °C.

Blandingen ble overført til sentrifugeringsflasker og rotert i en sentrifuge av benkemodell ved ca. 800 xg i 2 timer for å skille fra gjenværende faste stoffer. Etter sentrifugeringen ble reaksjonsblandingen ekstrahert med isopropanol for å fjerne organiske forurensninger. Ultrafiltrering er foretrukket som et alternativ til isopropanolekstrahering.

Med denne fremgangsmåte ble følgende aminoforbindelser konjugert til polymeren:

Eksempel 1 a: undecylamin

Eksempel 1 b: oktadecylamin

Eksempel 1 c: 4-nonylbenzylamin

Eksempel 1 d: 3-[(4-fenoksy)fenyl]propylamin

Eksempel 2: PEG-di(alkylamidsuksinyl)dithioeter-polymer med høy molekylvekt

Fremgangsmåten skissert i eksempel 1 ble fulgt, med unntak av at det ble anvendt 0,55 mol DTT og 0,55 mol TEMED pr. mol maleinsyreanhydrid. Kraftig omrøring var nødvendig fordi viskositeten bygde seg opp hurtig. Det viste seg at det meste av reaksjonen var ferdig i løpet av 5-10 minutter, fulgt av sakte fullførelse i løpet av de neste 4 timer, da temperaturen ble hevet fra 55 °C til 80 °C.

Eksempel 3: PEG-di(alkylamidsuksinyl)dithioeter-polymer

Fremgangsmåten skissert i eksempel 1 ble fulgt, med unntak av at det ble brukt 1,5 mol dodecylamin pr. mol karboksylsyregrupper i polymeren. Det ble tilsatt N-hydroksysuksinimid (NHS, 1,0 mol pr. mol karboksylsyregrupper) og 1,1'-karbonyl-

diimidiazol (CDI, 3,0 mol pr. mol karboksylsyregrupper), og reaksjonsblandingen ble omrørt ved 80 °C i 4 timer, og så opparbeidet som ovenfor.

Med denne fremgangsmåte ble følgende aminoforbindelser konjugert til polymeren:

- 5 Eksempel 3a: undecylamin
- Eksempel 3b: tetradecylamin
- Eksempel 3c: oktadecylamin
- Eksempel 3d: dehydroabietylamin
- Eksempel 3e: kolesterol-2-aminoetyleter
- 10 Eksempel 3f: 10-fenoksydecylamin
- Eksempel 3g: sebasinsyrehydrazid
- Eksempel 3h: oljesyrehydrazid
- Eksempel 3i: dehydroabietinsyrehydrazid
- Eksempel 3j: kolsyrehydrazid
- 15 Eksempel 3k: palmitinsyrehydrazid

Eksempel 4: PEG-ko-(alkylamidsuksinat)-polymer

En oppløsning av PEG (6,66 mmol) og trietylamin (2,32 ml, 16,65 mmol) i tørr dietyleter (10 ml) ble avkjølt til 0 °C under argon og behandlet dråpevis med metan-

20 sulfonylchlorid (1,03 ml, 13,32 mmol). Omrøringen fortsatte i 1 time ved 0 °C og deretter ved romtemperatur i 2 timer. Eteren ble dampet av og tørr aceton (15 ml) ble tilsatt til residuet for å presipitere trietylaminhydrogenkloridet, som ble filtrert fra oppløsningen. Filtratet ble behandlet med litiumbromid (2,31 g, 26,64 mmol) og varmet under reflux i 20 timer. Deretter ble blandingen fortynnet med heksan og

25 filtrert gjennom en kort kolonne av silika (3 cm) dekket med celite (0,5 cm), og eluert med heksan. Filtratet ble tørket, filtrert og dampet inn, hvilket etterlot α,ω -dibrom-PEG som en olje.

α,ω -dibrom-PEG ble omsatt med én ekvivalent 2,2-dibutyl-4,5-bis(metoksykarbonyl)-1,3,2-dioksastannolan ved metoden til Godjoian et al., Tetrahedron Letters,

30 37:433-6 (1996). Den resulterende dimetyltartrat-PEG-polyeter ble forsåpet med KOH i metanol, og så amidert med dodecylamin eller heksadecylamin som i eksempler 1 og 3 ovenfor, eller med aminene i eksempler 3a-3k.

Eksempel 5: PEG-kopolymerisering med EDTA-dianhydrid

35 Tørr PEG ble omsatt med etylendiamin-tetraeddiksyredianhydrid med fremgangsmåten beskrevet i eksempel 1, og ble deretter amidert med dodecylamin som i eksempel 1 eller med heksadecylamin som i eksempel 3, eller med aminene i eksempler 3a-3k.

På samme måte ble følgende dianhydrider kopolymerisert med PEG og deretter amidert:

Eksempel 5a: naftalen-tetrakarboksylysyredianhydrid

Eksempel 5b: perylen-tetrakarboksylysyredianhydrid

5 Eksempel 5c: benzofenontetrakarboksylysyredianhydrid

Eksempel 5d: 4,4'-(heksafluorisopropyliden)diftalsyreanhydrid

Eksempel 5e: butantetrakarboksylysyredianhydrid

Eksempel 5f: bisyklo(2,2,2)okt-7-en-2,3,5,6-tetrakarboksylysyredianhydrid

Eksempel 5g: dietylen-tetramin-pentaeddiksyredianhydrid

10 Eksempel 5h: 3,4,3',4'-difenylsulfon-tetrakarboksylysyredianhydrid

Eksempel 5i: 3,4,3',4'-difenyleter-tetrakarboksylysyredianhydrid

Eksempel 5j: pyromellitinsyredianhydrid

Eksempel 6A: PEG-diamin-ko-polymer med sidekjeder av tioetere

15 PEG-dimaleat, fremstilt som i eksempel 1, ble omsatt med dodekantiol (to ekvivalenter pr. ekvivalent PEG-dimaleat) ved å benytte samme fremgangsmåte som anvendt for DTT i eksempel 1. Ingen fortynning var nødvendig, fordi ingen polymerisasjon fant sted og reaksjonen ble utført i smeltet PEG-dimaleat. TEMED-katalysatoren ble tilsatt og deretter ble tiolen tilsatt. Reaksjonsforløpet ble fulgt via
20 forsvinningen av startmaterialer, ved å anvende TLC. Det kan benyttes temperaturer opp til det punkt hvor tapet av alkyltiol ved fordampning blir vesentlig (opp til 100 °C). Et svakt overskudd av alkyltiol kan bli anvendt for å mette maleinsyregruppene fullstendig. Overskuddet av alkyltiol drives av ved slutten av reaksjonsforløpet ved spyling med nitrogen eller argon, og/eller oppvarming i vakuum, inntil ikke noe blir detektert
25 med lukt eller med TLC.

Med denne fremgangsmåte kan tioler bli konjugert til PEG-dimaleat:

Eksempel 6Aa: merkaptoravsyre-di-t-butylester

Eksempel 6Ab: tetradekantiol

Eksempel 6Ac: heksadekantiol

30 Eksempel 6Ad: 2-merkaptotansulfonsyre

Eksempel 6Ae: 3-merkaptopropansulfonsyre

Eksempel 6Af: 6-merkaptotansulfonsyre-t-butylester

Eksempel 6Ag: 4-merkaptobenzosyre-t-butylester

Eksempel 6Ah: merkaptotansulfonsyre-t-butylester

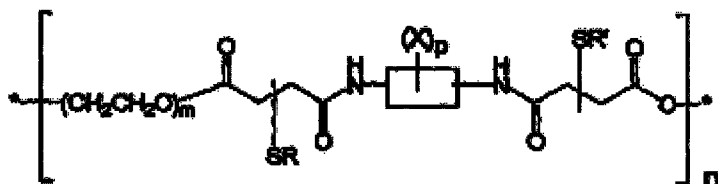
35 Eksempel 6Ai: 4-(t-butoksykarbonylamino)butantiol

Eksempel 6Aj: 3-(t-butoksykarbonylamino)benzylmerkaptan

Eksempel 6Ak: 4-decylbenzylmerkaptan

Tioler som har reaktive funksjonelle grupper er egnet for tilknytning til C-kjeder og/eller de reaktive funksjonelle grupper kan tjene som tilknytningspunkter (X) for målrettende grupper.

5 *Eksempel 6B: PEG-diamin-kopolymer med sidekjeder av tioetere*



Tioladduktet fremstilt i eksempel 6A ble amidert med 1,4-diaminobutan (én ekvivalent diamin pr. to grupper COOH), ved å anvende den samme fremgangsmåte som anvendt for dodecylamin i eksempel 1, med fortykning med vann etter behov for å opprettholde fluiditeten i reaksjonsblandingen. Ytterligere alikvoter av EDC ble ved behov tilsatt for å sikre fullstendig polymerisering. Med denne fremgangsmåte ble tioladduktene i eksempel 6A og 6Aa til og med 6Ak konvertert til et PEG-diaminobutan-polyamid.

Med denne fremgangsmåte ble følgende diaminer konvertert til et PEG-polyamid (BOC = t-butoksykarbonyl):

Eksempel 6Ba: 2-(O-BOC)-1,3-diamino-2-propanol

Eksempel 6Bb: N',N''-di(BOC)-heksaetylentetraamin

Eksempel 6Bc: N',N''-di(BOC)-spermin

Eksempel 6Bd: N'-BOC-spermidin

Eksempel 6Be: N',N'',N'''-tri(BOC)-pentaetylenheksamin

Eksempel 6Bf: agmatin

Eksempel 6Bg: lysin-t-butylester

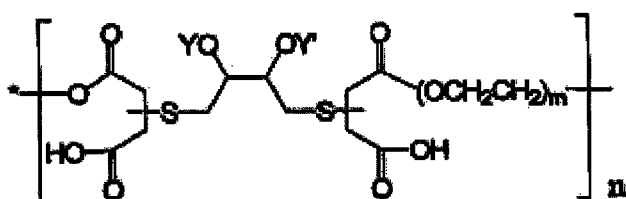
Eksempel 6Bh: 1,6-diaminoheksan

Eksempel 6Bi: 1,4-fenylendiamin

Eksempel 6Bj: 1,3-fenylendiamin

Eksempel 6Bk: 1,4-diaminobutan-2,3-diol-acetonid

Eksempel 7: PEG-di(alkylsuksinat)dithioeter



2,3-bis-O-heksadecyleteren av DTT (meso-2,3-bis(heksadecyloksy)butan-1,4-ditiol) ble fremstilt ved en modifisering av fremgangsmåten til S. Sasaki et al., Chem. Pharm. Bull. 33(10):4247-4266 (1985). Dette ble tilsatt til PEG-dimaleat med fremgangsmåten i eksempel 1.

5 Med denne fremgangsmåte ble følgende eterditioler koblet til PEG-polymeren:

Eksempel 7a: meso-2,3-bis(n-butoksy)butan-1,4-ditiol

Eksempel 7b: meso-2,3-bis(4-nonylfenylmetoksy)butan-1,4-ditiol

Eksempel 7c: meso-2,3-bis(bifenyl-4-metoksy)butan-1,4-ditiol

Eksempel 7d: 4,6-bis(decyloksy)benzen-1,3-dimetantiol

10 Eksempel 7e: 4,5-bis(decyloksy)benzen-1,2-dimetantiol

Eksempel 7f: 3,4-bis(decyloksy)tiopen-2,5-dimetantiol

Eksempel 8A: substituerte PEG-suksinater

15 Fremgangsmåten i eksempel 1 ble fulgt, med unntak av at 2-dodecen-1-ylravsyreanhydrid ble anvendt i stedet for maleinsyreanhydrid. Dodeceny substituenten ga C-sidekjedene i den ferdige polymeren.

Med denne fremgangsmåte ble følgende substituerte ravsyreanhydrider forestret med PEG:

Eksempel 8Aa: isobutenylravsyreanhydrid

20 Eksempel 8Ab: 2-okten-1-ylravsyreanhydrid

Eksempel 8Ac: oktadecenylravsyreanhydrid

Eksempel 8Ad: 3-oksabisykloheksan-2,4-dion

Eksempel 8Ae: sykloheksandikarboksylysyreanhydrid

Eksempel 8Af: ftalsyreanhydrid

25 Eksempel 8Ag: 4-decyl-ftalsyreanhydrid

Eksempel 8Ah: heksahydrometylftalsyreanhydrid

Eksempel 8Ai: tetrahydroftalsyreanhydrid

Eksempel 8Aj: norbornendikarboksylysyreanhydrid

Eksempel 8Ak: cantaridin

30 Eksempel 8Al: bisyklooktendikarboksylysyreanhydrid

Eksempel 8Am: ekso-3,6-epoksy-1,2,3,6-tetrahydroftalsyreanhydrid

Eksempel 8An: S-acetyl-merkaptoravsyreanhydrid

Eksempel 8B: PEG-di(alkylamidsuksinyl)ditiometer med alkylgruppe-sidekjer

35 Med fremgangsmåten i eksempel 1 ble de substituerte PEG-suksinater, fremstilt som beskrevet i eksempler 8A og 8Aa til og med 8An, omsatt med DTT:

Med denne fremgangsmåte ble følgende ditioler omsatt med hvilke som helst av de substituerte PEG-suksinater, oppnådd som beskrevet i eksempler 8A og 8Aa til og med 8An:

Eksempel 8Ba: etan-1,2-ditiol

5 Eksempel 8Bb: propan-1,3-ditiol

Eksempel 8Bc: butan-1,4-ditiol

Eksempel 8Bd: pentan-1,5-ditiol

Eksempel 8Be: heksan-1,6-ditiol

Eksempel 8Bf: 1,4-benzenditiol

10 Eksempel 8Bg: 1,3-benzenditiol

Eksempel 8Bh: 1,4-benzendimetantiol

Eksempel 8Bi: 1,3-benzendimetantiol

Eksempel 8Bj: 1,2-benzendimetantiol

15 *Eksempel 8C: PEG-diamin-kopolymer med alkylgruppe-sidekjeder*

Med fremgangsmåten i eksempel 6B ble det substituerte PEG-suksinat oppnådd som beskrevet i eksempel 8A, kopolymerisert med 1,4-diaminobutan.

Med denne fremgangsmåte ble følgende diaminer kopolymerisert med hvilke som helst av de substituerte PEG-suksinater i eksempler 8A og 8Aa til og med 8An:

20 Eksempel 8Ca: 2O-BOC-1,3-diamino-2-propanol

Eksempel 8Cb: N'-N''-di(BOC)-heksaetylentetraamin

Eksempel 8Cc: N'-N''-di(BOC)-spermin

Eksempel 8Cd: N'-BOC-spermidin

Eksempel 8Ce: N'-N'',N'''-tri(BOC)-pentaetylenheksamin

25 Eksempel 8Cf: agmatin

Eksempel 8Cg: lysin-t-butylester

Eksempel 8Bh: 1,6-diaminoheksan

Eksempel 8Bi: 1,4-fenylendiamin

Eksempel 8Bj: 1,3-fenylendiamin

30 Eksempel 8Bk: 1,4-diaminobutan-2,3-diol-acetonid

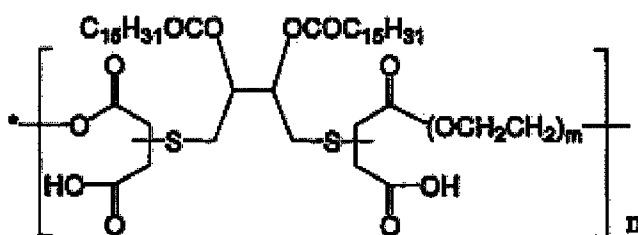
Eksempel 9: PEG-transforestring ved anvendelse av substituerte syrer

PEG-ditosylat: Til 1 mol PEG (oppløst i DMF eller smeltet slik det var) ble det tilsatt 2,1 mol tosyklorid (5 % molart overskudd) med omrøring under argon. Til
35 denne reaksjonsblanding ble det tilsatt 2,2 mol tetrametyletylendiamin (TEMED). Reaksjonsblandingen ble deretter inkubert med 45 °C i 2 timer. Produktene ble atskilt ved å anvende TLC med etylacetat, toluen eller etanol som TLC-løsningsmidler. PEG-ditosylatet kan bli ekstrahert fra reaksjonsblandingen med toluen. I stedet for toluen-

sulfonylchlorid kan det også bli anvendt andre sulfonyleringsmidler, så som mesylchlorid (se eksempel 4), triflinsyreanhydrid eller tresylchlorid (se US patentsøknad 10/397332, publikasjon nr. 20040006051).

Polyforestring av PEG-ditosylat: til 1 mol smeltet PEG-ditosylat ble det med omrøring under argon tilsatt 1 mol S,S'-didecyl-meso-2,3-dimerkaptoravsyre og 2 mol TEMED. DMF ble tilsatt etter behov for å opprettholde fluiditet. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 80 °C, og omrørt i 24 timer eller inntil fullstendig omsetning bestemt med TLC:

Eksempel 10: PEG-di(suksinyl)-di-(O-acylert)tioeter-polymer med middels molekylvekt (C16π-polymer B)



PEG-dimaleat (10,24 g, 6,1 mmol) fremstilt som i eksempel 1, ble anbrakt i en tørr 125 ml kolbe og oppvarmet til 70 °C under argon slik at PEG-dimaleatet smeltet. Til dette smeltede materialet ble det med omrøring tilsatt vann (10 ml) og en oppløsning av DTT (0,961 g, 6,168 mmol) og TEMED (0,723 g, 6,166 mmol) i vann (3 ml). Oppløsningen ble omrørt ved 70 °C i ca. 4 timer. Fjerning av vann i vakuum ga den faste polymeren med ca. 90 % utbytte.

Den tørkede polymeren (5 g, 2,7 mmol) ble oppvarmet til 70-90 °C under argon slik at den smeltet, og TEMED (0,635 g, 5,5 mmol) ble tilsatt. Palmitoylchlorid (1,689 g, 5,5 mmol) ble tilsatt med omrøring, og blandingen ble omrørt under argon over natten. (Forholdet mellom polymer og acylchlorid kan bli variert for å oppnå substitusjonsgrader fra 0 til 100 % støkiometri.) Vann ble tilsatt til reaksjonsblandingen for å isolere "C16-π-polymer B".

Med denne fremgangsmåte ble følgende syrer forestret med hydroksylgruppene i di(suksinyl)PEG-DTT-kopolymeren:

Eksempel 10a: oljesyre

Eksempel 10b: kolesteryl-suksinat

Eksempel 10c: bifenyl-4-karboksylysyre

Eksempel 10d: 4-oktylfenyleddisyre

Eksempel 10e: heksadek-6-ynsyre

Som et alternativ til å anvende syrehalogenider, kan DTT-avledede hydroksylgrupper i π-polymerer også bli aktivert med 1,3-bis(2,2-dimetyl-1,3-dioksolan-4-

ylmetyl)karbodiimid (BDDC) og koblet direkte til karboksylsyrer, (se *Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Reagents for Glycoside, Nucleotide, and Peptide synthesis*, red. David Crich, Wiley, 2005, s. 107-108 og referanser der).

5 *Eksempel 11: Dimaleat av C16- π -polymer A*

Polymer A-dimaleater ble fremstilt ved å omsette maleinsyreanhydrid med hydroksylgrupper i polymer A. Den aktiverte dobbeltbinding som innføres kan bli anvendt til å addere tiolholdige ligander til polymeren. Forholdet mellom polymer A og maleinsyreanhydrid kan bli variert for å oppnå substitusjoner som varierer fra 0 til 100
10 % av fullstendig støkiometrisk forestring.

C16- π -polymer A (2 g) og maleinsyreanhydrid (0,85 g) ble oppmalt i en tørr morter og overført til en 50 ml rundkolbe. Kolben ble varmet ved 90 °C under argon i 2-3 timer med omrøring. Den faste reaksjonsblanding ble deretter overført ved hjelp av vann til en dialysepose (kuttet ved 3,5 kDa) og dialysert mot vann for å fjerne over-
15 skudd av maleinsyre og lavmolekylære biprodukter. Retentatet ble deretter fjernet fra posen og tørket ved 60 °C til konstant vekt, hvilket ga C16- π -polymer A-dimaleat (1,79 g).

Eksempel 12: Cysteinaddukt av C16- π -polymer A-dimaleat

20 Pulverisert C16- π -polymer A-dimaleat (eksempel 11) (253 mg) ble tilsatt til vann (5 ml) og blandingen ble omrørt kraftig. Cystein (24 mg) og TEMED (30,5 μ l) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og denne ble omrørt ved romtemperatur under argon-atmosfære. Reaksjonsforløpet ble overvåket med TLC (silikagelplater, n-butanol-eddiksyre-vann 3:1:1) med deteksjon med ninhydrin. Reaksjonen viste en ninhydrin-
25 positiv flekk som migrerte sammen med polymeren. Cystein ga også en ninhydrin-positiv flekk, mens startpolymeren ikke ga noen farge med ninhydrin.

3. Anvendelse av π -polymerer til å solubilisere uløselige eller svakt løselige substanser

30 *Eksempel 1: Solubilisering av fargestoffer*

Til 1,0 ml alikvoter av en 50 mg/ml vannløsning av PEG1500-ko-suksinyl-DTT-bis-C16-amid-polymer (C16-polymer A, eksempel 1), sentrifugert for å fjerne uløselige materialer, men for øvrig ikke renses, ble det tilsatt overskuddsmengder av fargestoffene Eosin Y, diklorfluorescein og Sudan IV, i separate beholdere (FlexExcel
35 klare veieskip av polypropylen, størrelse WB 2,5, produkt fra AllExcel, Inc., West Haven, CT, USA), og komponentene ble omrørt sammen slik at det ble dannet en pasta. Bunnen av beholderne ble deretter festet til bunnen av et lite ultralydrensebad for smykker, ved å anvende en vannbestandig dobbeltsidig teip. Det ble tilsatt akkurat nok

vann i badet til at veieskipene var neddykket til ca. 1/3 høyde. Ultralydbehandling ble utført i 15 minutter i trinn på 5 minutter. Væskene ble overført til sentrifugeringsrør og sentrifugert to ganger i 30 minutter i en sentrifuge av benkmodell, for at uoppløst fargestoff skulle falle ut som pellet. De overliggende væsker ble overført til rene reagensrør og igjen sentrifugert for å fjerne medrevne faste stoffer. Som kontrollprøver ble suspensjoner av de samme mengder fargestoffer i den sammen mengde destillert vann som mengden polymerløsning, behandlet på samme måte. De resulterende oppløsninger ble flekket (25 µl) på TLC-plater, hvorved det ble dannet sirkler ut fra dråpene. Flekkenes intensiteter ble sammenlignet med flekker dannet av standard fargeoppløsninger fremstilt i etanol eller etanol/vann, for å bestemme omtrentlige konsentrasjoner. Flekkene er vist på figur 1. Fargestoffenes løselighet i vann ble bestemt ved å oppløse en hensiktsmessig mengde fargestoff i 1 l eller mer avionisert vann (ubufret) ved romtemperatur, og så tilsette (dvs. titrere med) ytterligere vann etter behov for å oppnå mettede oppløsninger.

Konsentrasjonen av Sudan IV i 50 mg/ml polymer var ca. 0,2 mg/ml, i motsetning til 0,000 mg/ml i H₂O (Sudan IV er uløselig ved nøytral pH). Konsentrasjonen av diklorfluorescein var ca. 5 mg/ml i 50 mg/ml polymer, i motsetning til 0,010 mg/ml i H₂O. Konsentrasjonen av Eosin Y i 50 mg/ml polymer var ca. 5 mg/ml, i motsetning til 0,007 mg/ml i H₂O. Fyllingsforholdene (mengden stoff pr. mengdeenhet polymer, g/g) ble beregnet til å være ca. 1:250 for Sudan IV, 1:10 for diklorfluorescein og 1:10 for Eosin Y.

Fyllingsforholdet på 1:10 for polare forbindelser som ligner farmasøytisk aktive substanser når det gjelder fysisk-kjemiske egenskaper, er høyere enn det som generelt kan oppnås med liposomer, syklodekstriner, Cremophor, eller detergent eller andre solubilisierende systemer. Eosin Y er en fotoaktiverbar generator for singlet-oksygen med svært høy effektivitet, og slike konsentrerte oppløsninger av Eosin Y fremstilt sammen med polymeren i eksempel 1, kan forventes å være farmakologisk aktive som fotoaktiverbare cytotoxiske midler.

Endringen i fluorescens-spektrum for diklorfluorescein i polymerløsningen (rødgul/oransje) i forhold til vann (grønnaktig gul) var visuelt merkbar og gir en indikasjon på at fargestoffet ikke er i et vandig miljø, men er innkapslet i det organiske miljø av selvsamlede polymerpartikkelkjerner. Endringer i fluorescens-spektra er faktisk blitt anvendt som en metode for å bestemme endringer i mikromiljøets polaritet (f.eks. "lipidsonder"). Fargen på oppløsningen av Sudan IV i polymeren var rødbrun, i motsetning til rød i etanolløsning og brunt pulver når det er suspendert i vann. Eosin Y viste ingen signifikant visuell endring (rosa i vann til rødrosa i polymerløsningen).

Eksempel 2: Solubilisering av medisinsk relevante substanser

Purpurin, Amphotericin B, Camptothecin og Doxorubicin ble valgt som representative, dårlig løselige, aktive farmasøytiske ingredienser (API). Amphotericin B ble anvendt i en liposomformulering som et injiserbart antifungalt stoff, mens
 5 Camptothecin og Doxorubicin er anticancermidler. Purpurin er et DNA-interkalerende fargestoff med potensiell farmasøytisk anvendelighet, og Eosin Y er et fotosensitivt reagens for singlet-oksygen med potensiell anvendelse i fotodynamisk terapi. Hvert API ble oppløst i vann med C16- π -polymer A, C18- π -polymer B og/eller C16- π -polymer A-folsyrekonjugat (se nedenfor). Solubilisering ble demonstrert ved å avsette
 10 flekker av det solubiliserte API og av ikke-solubiliserte kontrollprøver på TLC-plater, som beskrevet ovenfor for fargestoffene.

Tørkede polymerer ble rekonstituert med vann, med oppvarming, omrøring og om nødvendig ultralydbehandling. Når oppløsningen var for viskøs, ble den fortynnet. C16- π -polymer A ble anvendt i en mengde på 10 % (vekt/volum), C16- π -polymer A-folat ble anvendt i en mengde på 5 % (vekt/volum) og C18- π -polymer B ble anvendt i en mengde på 2 % (vekt/volum).
 15

Legemiddelsubstans (20 mg) tilsatt direkte til 1 ml polymerløsning, hvilket resulterte i et masseforhold polymer:API på 5:1 for C16- π -polymer A, 2,5:1 for C16- π -polymer A-folat og 1:1 for C18- π -polymer B, med unntak for doksorubicin (se nedenfor). Blandingene ble ultralydbehandlet i 1 time med lav effekt, og deretter sentrifugert to ganger ved 2000 xg for å fjerne uoppløste faste stoffer. Mengden pelleterte faste stoffer var ikke signifikant. Avsetning av flekker av oppløsningene på en silikagel-TLC-plate viste at legemidlene var solubilisert, med migrering retardert fra løsningsmiddelfronten (figur 2).
 20

Doksorubicinhydrogenklorid ble kombinert med polymerene slik som ovenfor med et masseforhold mellom C16- π -polymer A og doksorubicin på 10:1, eller med et masseforhold mellom C16- π -polymer A-folat og doksorubicin på 5:1, fulgt av tilsetning av tilstrekkelig med 3 M natriumacetat til å nøytralisere doksorubicinhydrogenkloridet. Blandingene ble rystet kraftig i 24 timer og deretter sentrifugert to ganger ved
 30 2000 xg for å fjerne uoppløste faste stoffer. Mengden faste pelletter var ikke signifikant.

Masseforholdene mellom solubilisert API og polymer er vist i tabell 1. Ikke noe forsøk ble gjort på å maksimere fyllingsgraden i polymeren, derfor representerer disse forhold de nedre grenser for mengden API som polymerene er i stand til å bære i oppløsning.

35 En 50 μ l prøve av hver oppløsning ble avsatt som flekker på en "Bakerflex" silikagel-TLC-plate og fikk spre seg. Vannløsningen dannet sirkelens ytre grense og en indre sirkel ble dannet av migreringen av polymeren med innkapslet materiale (figur

2). I alle tilfeller var det svært lite API i periferikanten for sonen med bare vann, hvilket viste vellykket solubilisering og minimal lekkasje av det innkapslede materiale.

Tabell 1: Solubilisering av API

5

	Masseforhold polymer:substrat		
	C16- π -polymer A 10 % (vekt/volum)	C16- π -polymer A-folat 5 % (vekt/volum)	C18- π -polymer B 2 % (vekt/volum)
Purpurin	5:1	2,5:1	ikke utført
Camptothecin	5:1	2,5:1	ikke utført
Amphotericin B	5:1	2,5:1	ikke utført
Doxorubicin	10:1	5:1	ikke utført
Eosin Y	ikke utført	ikke utført	1:1

4. Biokompatibilitet av π -polymerer

Eksempel 1: Egnethet for topiske emollienser, kremer eller pastaer

10 En konsentrert oljeaktig voks av polymeren i eksempel 1 ble av oppfinneren gnidd inn i huden på innsiden av håndleddet og observert for opptak. Materialet viste seg å bli absorbert på samme måte som farmakologisk voksaktige kremer, med svak mykgjøring av området. Ingen umiddelbare eller forsinkede allergiske responser, så som rødming, utslett eller kløe ble observert ved denne enkeltstående topiske påføring.

15 Mange av disse polymerer er hygroskopiske vokser ved romtemperatur, med et antatt smeltepunkt på ca. 45 °C til 60 °C eller høyere, avhengig av sammensetningen. Polymerer fremstilt med lavmolekylære PEG kan til og med være flytende ved romtemperatur. Noen polymerer kan være faste ved romtemperatur og smelte ved kroppstemperatur. Disse π -polymerenes egenskaper gjør dem således til utmerkede substrater for fremstilling av lotioner, kremer, salver, emollienser og andre avleverings-
20 former, enten alene eller i blanding med forskjellige substanser, innbefattende aktive farmasøytiske midler.

Eksempel 2: Egnethet for parenteral administrasjon

25 En vannløsning av polymeren i eksempel 1 ble fremstilt i fosfatbufret saltvann og deretter filtrert inn i sterile tuber gjennom 0,22 μ m filtere.

En protokoll for største tolererbar dose ble benyttet, hvor CD-1-mus ble gitt en dose på 10 ml pr. kg kroppsvekt ved injeksjon i halevene med opp til 5 % (vekt/volum) vannløsning av polymeren. Musene ble observert i 12 timer kontinuerlig og deretter hver andre time inntil 48-72 timer, avhengig av gruppen. Blodprøver ble tatt og

analysert. Noen mus ble avlivet og først undersøkt for generell histologi. Mikroskopisk histologi ble deretter utført på utvalgte seksjoner.

Ingen observerbare forskjeller ble funnet mellom kontrollmus og behandlede mus når det gjelder kjemisk sammensetning av blodet. Ingen observerbare forskjeller eller lesjoner ble funnet i forhold til kontrolldyr når det gjelder generell histologi for forskjellige organer innbefattende hjerte, lunger, nyrer, milt, lever, tarmer, magesekk, blære, hud, muskler, skjelett, hjerne og lymfeknuter. Flere prøver fra forskjellige grupper dyr ble undersøkt med de samme observerte resultater. Ingen observerbare forskjeller ble funnet i cellevevsstrukturen i undersøkte vev. Noen av nyrene viste noe vridning som avtok med eksponeringstiden for polymeren. Dette innebærer at vridningen er en temporær fase og at det med tiden vil bli normalt.

Konklusjonen er at polymeren er sikker for medisinsk anvendelse som et farmasøytisk middel i injiserbare preparater og andre parenterale formuleringer. Det er rimelig å anta at polymeren er sikker i orale oppløsninger, kapsler og tabletter, og ved administrasjon som neseppray, orale/bronkiale aerosoler, sublinguallt, hudkrem/lotion/plaster, øyedråper, andre topiske ruter og andre administrasjonsruter.

5. Binding av målrettende grupper til π -polymerer

Eksempel 1: Binding av galaktosamin til C16- π -polymer B via dannelse av amidbinding

Galaktosamin (GA) er målrettet på den hepatiske asialoglykoproteinreseptor (ASGPR), og polymerer som bærer kovalent bundet galaktosamin blir avlevert til leveren, se L. Seymour et al., "Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin", J. Clin. Oncology, 20(6): 1668-1676 (2002) og referansene angitt der.

C16- π -polymer B (eksempel 10 i kapittelet foran angående syntesemetoder) (461 mg, 0,2 mmol ekvivalent COOH pr. repeterende enhet) ble dispergert i 14 ml vann, og til denne dispersjon ble det tilsatt EDC HCl (0,485 mmol) og N-hydroksysuksinimid (0,464 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 15 minutter og det ble tilsatt en oppløsning av galaktosamin HCl (0,386 mmol) og TEMED (0,387 mmol) i 1 ml vann. Oppløsningen ble omrørt og reaksjonsforløpet ble fulgt med TLC på silikagel og utvikling i 1-butanol-eddiksyre-vann (3:1:1). En ytterligere mengde med TEMED (0,079 mmol), NHS (0,078 mmol) og EDC HCl (0,193 mmol) ble tilsatt for å tvinge frem fullstendig omsetning. Da TLC viste stabil tilstand med hensyn til forbruk av GA, ble reaksjonsblandingen dialysert (membran som kuttet av ved 3500 Da) mot 3 x 1000 ml avionisert vann for å fjerne lavmolekylære reaktanter og biprodukter. Retentatet ble fjernet og tørket ved 60 °C til konstant vekt (348 mg).

TLC for produktet viste ikke noe fritt GA (ninhydrin-negativ). En prøve av produktet ble hydrolysert med 6 N HCl ved 100 °C for å hydrolysere bundet GA. TLC-

analyse viste tilstedeværelse av GA (ninhydrin-positiv) ved samme Rf som referansen GA.

Eksempel 2: Binding av folsyre til C16- π -polymer A

5 BDDC (2,44 g, 8,56 mmol) ble veid ut i en 125 ml rundkolbe som var spylt med argon (BDDC er svært viskøs med honninglignende konsistens og vanskelig å håndtere). C18- π -polymer A (10 g, 4,28 mmol) ble fylt i kolben, blandingen ble oppvarmet til 70 °C og reaktantene ble rørt samme i ca. 30 minutter. Folsyre (3 g) ble tilsatt, fulgt av tilstrekkelig THF til å gjøre omrøring mulig. Reaktantene ble omrørt
10 ved 40-70 °C over natten, beskyttet mot fuktighet. THF fikk deretter dampe av og vann (80 ml) ble tilsatt, og blandingen ble omrørt ved 50 °C i ytterligere 2 timer. Etter avkjøling til romtemperatur ble blandingen overført til en seksjon av en dialyseslange med 3500 dalton avkutting, og dialysert mot 0,1 N HCl (2 x 2000 ml), vann (2000 ml), 5 % natriumkarbonat (2 x 2000 ml) og vann (4 x 2000 ml) for å fjerne uomsatte
15 reagenser og biprodukter. Det klart guloransje retentat ble fjernet. En del ble dampet inn til konstant vekt for å bestemme faststoffkonsentrasjonen, og ble anvendt for solubiliseringseksperimentene beskrevet over.

Eksempel 3: Binding av N-acetylneuraminsyre (NANA) til C16- π -polymer B

20 Neuraminsyrederivater er antatt å være grupper målrettet på influensaviruser fordi hemagglutinin og neuraminidase danner belegg på proteiner, og begge disse er kjent å binde til sialinsyre.

BDDC (2,44 g, 8,56 mmol) og C18- π -polymer A (10 g, 4,28 mmol) ble kombinert og oppvarmet til 70 °C, og omrørt sammen under argon i ca. 30 minutter. N-acetylneuraminsyre (3 g) ble tilsatt, fulgt av THF etter behov for å opprettholde
25 fluiditet. Reaktantene ble omrørt ved 40-70 °C over natten, beskyttet mot fuktighet. Vann (80 ml) ble tilsatt, og blandingen ble omrørt ved 50 °C i ytterligere 2 timer. Etter avkjøling til romtemperatur ble blandingen dialysert mot 0,1 N HCl, 5 % NaHCO₃ og vann (2 x 2000 ml hver) med en membran som kuttet av ved 3,5 kDa.

30

Eksempel 4: Binding av β -O-metylneuraminsyre (MNA) til C16- π -polymer B

C16- π -polymer B, 43 μ mol på COOH-basis, i 1 ml vann, og neuraminsyre- β -metylglykosid (Toronto Research Chemicals), 40 μ mol, ble blandet sammen og det ble tilsatt 40 μ mol NHS i 0,1 ml vann, fulgt av 40 μ mol EDC-hydrogenklorid i 0,1 ml
35 vann. Reaksjonsblandingen ble rystet ved romtemperatur i 48 timer og så analysert med TLC på silikagel med isopropanol-etylacetat-vann (4:3:2). Deteksjon med 0,2 % orcinol i 70 % svovelsyre ved 130 °C genererte ingen fargereaksjon med start-

polymeren, men TLC for reaksjonsblandingen ga en purpurfarget flekk som komigrerte med polymeren.

Eksempel 5: Binding av zanamivir til C16- π -polymer B

5 Zanamivir (GG167) er en potent inhibitor av viral neuraminidase, og polymerer som bærer dette molekyl som en flerverdig ligand, er inhibitorer av influensavirusreplikasjon.

C16- π -polymer B (920 ml) ble dispergert i 30 ml vann, og til dette ble det tilsatt EDC HCl (1,2 mmol) og N-hydroksysuksinimid (1,1 mmol). Denne blanding ble
10 omrørt ved romtemperatur i 20 minutter, og det ble tilsatt en oppløsning av trifluor-eddiksyresaltet av 5-acetamido-7-(6'-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (US 6242582 og US 6680054) (0,39 g, 0,67 mmol) og TEMED (0,67 mmol) i 1 ml vann. Oppløsningen ble omrørt ved romtemperatur og reaksjonsforløpet ble fulgt med TLC. Reaksjons-
15 blandingen ble dialysert (membran som kuttet av ved 3500 kDa) mot 3 x 1000 ml avionisert vann for å fjerne lavmolekylære reaktanter og biprodukter. Retentatet ble fjernet og tørket ved 60 °C til konstant vekt. Konsentrasjonen av inkorporert sukker kan bli bestemt med en kolorimetrisk analyse for guanidingruppen (Can. J. Chem., 36:1541 (1958)). En neuraminidaseanalyse kan bli utført ved å følge fremgangsmåten
20 til Potier et al., Anal. Biochem., 29:287 (1979).

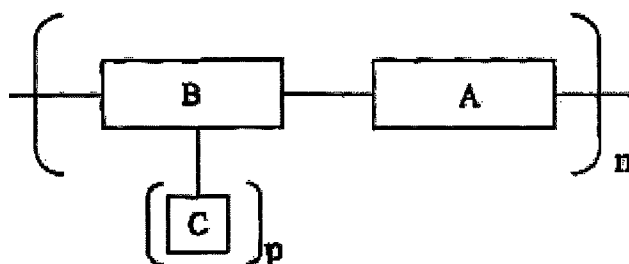
Eksempel 6: Binding av Fab-fragment til C16- π -polymer A-dimaleat

Et enkeltkjedet variabelt antistofffragment (scFv) rettet mot overflaten på glykoprotein-høymolekylært melanom-assosiert antigen (HMW-MAA) er målrettet
25 mot melanomceller, se F. Martin et al., J. Virology, 73:6923-6929 (1999).

Disulfidbindinger i dette antistofffragment blir redusert med immobilisert TCEP-disulfidreduserende gel (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) i henhold til produsentens protokoll, og omsatt med C16- π -polymer A-dimaleat ved fremgangsmåten i eksempel 12 i kapitlet Syntesemetoder.

P a t e n t k r a v

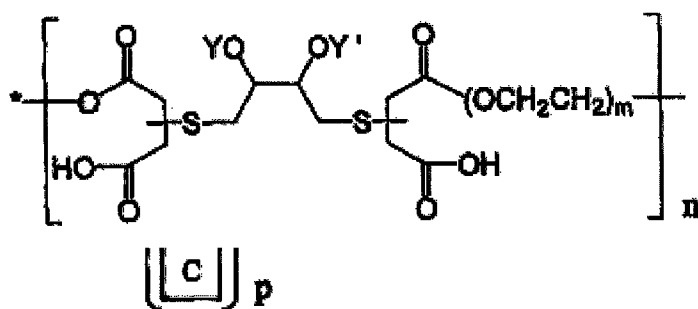
1. Kampolymer,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n h a r h o v e d s a k e l i g f ø l g e n d e s t r u k t u r:



som omfatter en ryggrad dannet av alternerende forgreningsdeler B og hydrofile, vannløselige polymerblokker A, og som har hydrofobe sidekjedder C bundet til forgreningsdelene, hvor A er valgt fra gruppen bestående av polyetylenglykol, polypropylenglykol, polyetylenimin, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon og polysakkarider, og kopolymerer derav; hvor forgreningsdelene B er er konjugatene av ditiotreitol (DTT), ditioerytritol (DTE) eller 2,3-diaminobutan-1,4-ditiol med to molekylere maleinsyre; og hvor hver sidekjede C er uavhengig valgt fra gruppen bestående av alifatiske C₈-C₂₀-kjeder, polyglykolsyre, poly-DL-melkesyre, poly-L-melkesyre og kopolymerer av polyglykolsyre og polymelkesyre-hydroksoxyrer, polyaminosyrer, polyanhydrider, polyortoestere, polyfosfoestere, poly-ε-kaprolakton, poly-δ-valerolakton, poly-γ-butyrolakton, poly-β-hydroksoxybutyrat, kolesterol, kolsyre, og litokolsyre, hvor molekylvekten av hver C enhet er mellom 50 og 1000, hvor n er i området fra 3 til 100, og hvor i gjennomsnitt 1 < p < 4.

20

2. Polymer ifølge krav 1, hvor p i gjennomsnitt er i området fra ca. 2 opp til 4.
3. Polymer ifølge krav 1, hvor i gjennomsnitt 1,5 < p < 2.
- 25 4. Polymer ifølge krav 1, hvor den videre omfatter én eller flere reaktive funksjonelle grupper X bundet til hver forgreningsdel, og består hovedsakelig av følgende struktur:



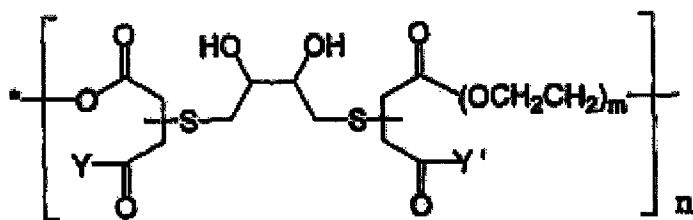
hvor X er valgt fra gruppen bestående av -OH, -NH₂, -SH, -CHO, -NHNH₂, -COOH, -CONHNH₂, halogenacyl, acetoacetyl, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS, vinyl-, akryl-, allyl-, malein-, kanel-, acetylenkarboksy- og acetylenkarboksamid-grupper, og hvor r i gjennomsnitt er i området fra ca. 1 til ca. 4.

5. Polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvor polymerblokk A er valgt blant polyetylglykol og polypropylenglykol, og kopolymerer derav.

10 6. Polymer ifølge krav 5, hvor polymerblokk A er polyetylglykol.

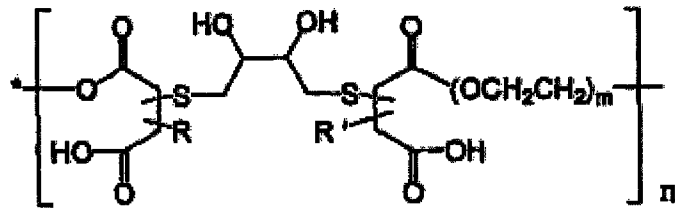
7. Polymer ifølge krav 6, hvor polymerblokk A har en midlere lengde på mellom 4 og 700 monomerenheter.

15 8. Polymer ifølge krav 6, hvor den har strukturen



hvor m er 4-700, og Y og Y' er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av R, OR, COOR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH₂, NHNHR, NRNHR' og NHNRR', hvor R og R' uavhengig av hverandre er valgt fra gruppen bestående av lineære hydrokarboner som eventuelt er substituert med én eller flere hydrofile substituent, polysykliske hydrokarboner som eventuelt er substituert med én eller flere hydrofile substituent, hydrofobe aminosyrer, peptider og polymerer.

9. Polymer ifølge krav 6, hvor den har strukturen



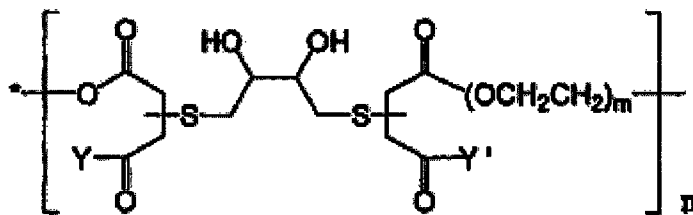
hvor m er 4-700, og Y og Y' er uafhængig af hverandre valgt fra gruppen bestående af R, COR, COOR, CONHR, CONRR', CONHOR, CONRNH₂, CONHNHR, 5 CONRNHR' og CONHNRR', hvor R og R' uafhængig af hverandre er valgt fra gruppen bestående af lineære hydrokarboner som eventuelt er substitueret med én eller flere hydrofile substituent, polysykliske hydrokarboner som eventuelt er substitueret med én eller flere hydrofile substituent, hydrofobe aminosyrer, peptider og polymerer.

10

10. Polymer ifølge krav 6, hvor den har strukturen

hvor m er 4-700, og R og R' uafhængig af hverandre er valgt fra gruppen bestående af lineære hydrokarboner som eventuelt er substitueret med én eller flere hydrofile 15 substituent, polysykliske hydrokarboner som eventuelt er substitueret med én eller flere hydrofile substituent, hydrofobe aminosyrer, peptider og polymerer.

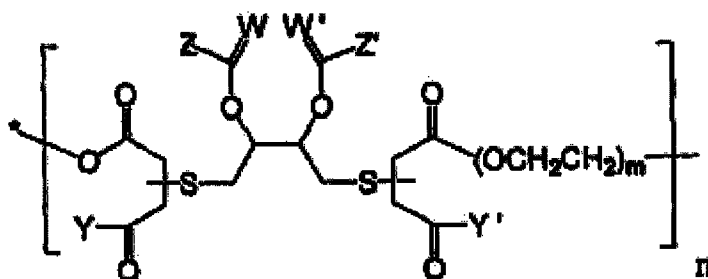
11. Polymer ifølge krav 6, hvor den har strukturen



20

hvor m er fra 4 til ca. 700 og n er fra 3 til ca. 100, og hvor hver gang monomerenheten med den viste strukturen forekommer, er Y og Y' er uafhængig af hverandre valgt fra gruppen bestående af OH, COOH, SH, NH₂, NHR, ONH₂, NHOH, NHNH₂ og NRNH₂, hvor R er valgt fra gruppen bestående af C₁-C₅-alkyl og (CH₂)_kY, hvor k er 25 fra 2 til 5.

12. Polymer ifølge krav 6, hvor den har strukturen



hvor m er fra 4 til ca. 700 og n er fra 3 til ca. 100, og hvor hver gang monomerenheten med den viste strukturen forekommer, er Y og Y' er uafhængig af hverandre valgt fra gruppen bestående af OH, COOH, SH, NH₂, NHR, ONH₂, NHOH, NHNH₂ og NRNH₂, hvor R er valgt fra gruppen bestående af C₁-C₅-alkyl og (CH₂)_kY, hvor k er

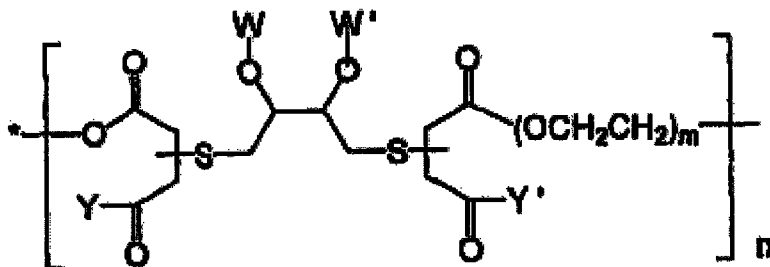
5

fra 2 til 5, W og W' er uafhængig af hverandre O eller H₂, og hvor hver gang monomerenheten forekommer, er Z og Z' uafhængig af hverandre valgt fra gruppen bestående af lineære hydrokarboner som eventuelt er substitueret med én eller flere hydrofile substituer, polysykliske hydrokarboner som eventuelt er substitueret med

10

én eller flere hydrofile substituer, hydrofobe aminosyrer, peptider og polymerer.

13. Polymer ifølge krav 6, hvor den har strukturen



hvor m er 4-700, og Y og Y' er uafhængig af hverandre valgt fra gruppen bestående af R, OR, COOR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH₂, NHNHR, NRNHR' og NHNRR', hvor R og R' uafhængig af hverandre er valgt fra gruppen bestående af lineære hydrokarboner som eventuelt er substitueret med én eller flere hydrofile substituer, polysykliske hydrokarboner som eventuelt er substitueret med én eller flere hydrofile substituer, hydrofobe aminosyrer, peptider og polymerer, og hvor

15

hver gang monomerenheten forekommer, er W og W' uafhængig af hverandre valgt fra gruppen bestående af H, -COCH=CH₂, -COC(CH₃)=CH₂, COCH=CHCO₂H og -COC(CH₃)=CHCO₂H.

20

14. Polymer ifølge krav 4, hvor den ytterligere omfatter en målrettende gruppe bundet til én eller flere av de reaktive funksjonelle grupper X som er til stede i polymeren.

5 15. Polymer ifølge krav 4, hvor den målrettende gruppe er valgt fra gruppen bestående av reseptorspesifikke ligander, antistoffer, i særdeleshet monoklonale antistoffer, antistoffragmenter, peptider omfattende en RGD-aminosyresekvens, peptider omfattende et YISRG-motiv, vekstfaktorer som sialinsyrederivater, N-acetylneuraminsyrederivater, folat, metotreksat, pteroinsyre, østradiol, østratriol
10 testosternon, mannose-6-fosfat, sukkerer, vitaminer, tryptofan, aminoalkyladamantaner, Fuzeon (enfuvritid), PRO-542 (CD4-IgG2), BMS-488043 (1-(4-benzoylpiperazin-1-yl)-2-(4,7-dimetoksy-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)etan-1,2-dion), sialinsyre, 2-deoksy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminsyre, 4-guanidino-Neu5Ac2en (zanamivir), oseltamivir og RWJ-270201 (peramivir).

15

16. Farmasøytisk preparat, karakterisert ved at det omfatter en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1-15, og hvor det ytterligere omfatter en effektiv mengde av et farmakologisk aktivt middel.

20

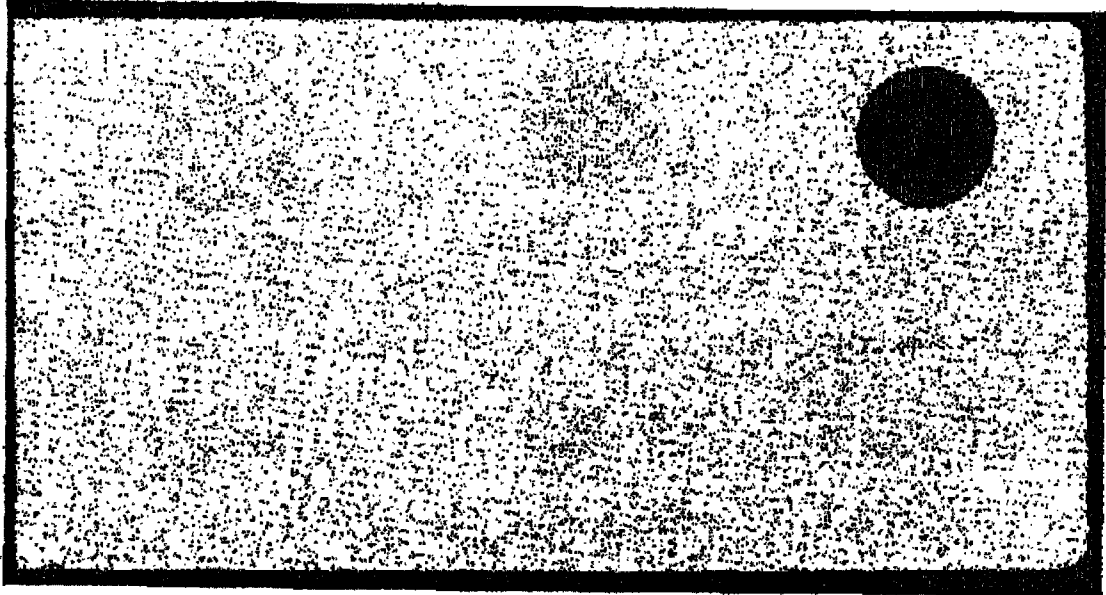
17. Fremgangsmåte for å øke løseligheten av en substans i et vandig løsningsmiddel,

karakterisert ved at den omfatter å bringe substansen i kontakt med en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1-15, slik at det dannes et vannløselig
25 kompleks av substansen og polymeren.

18. Fremgangsmåte ifølge krav 17, hvor substansen er valgt fra gruppen bestående av vitaminer, næringsstoffer, legemidler, fargestoffer, nukleinsyrekomplekser og bildegivende midler.

30

1/2



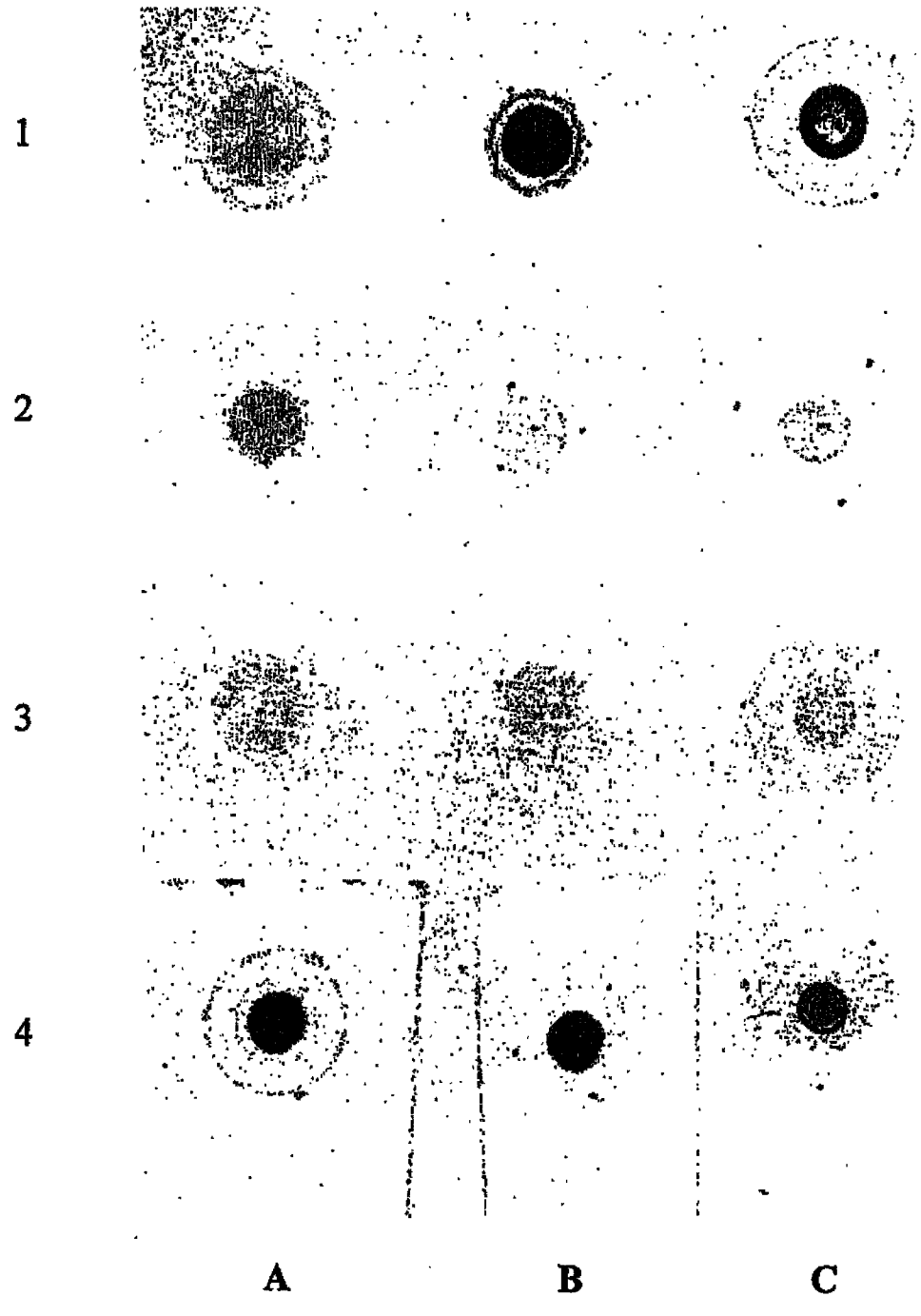
A

B

C

Figur 1

2/2



Figur 2