



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **176520**

(13) **B**

(51) Int Cl⁶ C 08 G 69/10, A 61 L 15/22

Styret for det industrielle rettsvern

| | | | |
|---------------------|----------|--------------------------------------|-----------------------|
| (21) Søknadsnr | 890044 | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | |
| (22) Inng. dag | 05.01.89 | (85) Videreføringsdag | |
| (24) Løpedag | 05.01.89 | (30) Prioritet | 06.01.88, FR, 8800064 |
| (41) Alm. tilgj. | 07.07.89 | | |
| (44) Utlegningsdato | 09.01.95 | | |

| | |
|------------------|--|
| (71) Patentsøker | Delalande SA, 32, rue Henri Regnault, F-92400 Courbevoie, FR |
| (72) Oppfinner | André Brack, Ardon, Olivet, FR |
| (74) Fullmektig | Lars Brevig, Bryns Patentkontor AS, Oslo |

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for syntese av en kopolymer av to α -aminosyrer samt middel for tildekning av hudsår

(56) **Anførte publikasjoner** US 4125519
Die Angewandte Makromolekulare Chemie, vol. 40/41 (1974) side 493-506

(57) **Sammendrag** Fremgangsmåte for syntetisering av en kopolymer av to α -aminosyrer innbefattende fremstillingen av et N-karboksydehydrid av en første α -aminosyre og N-karboksydehydridet av en annen α -aminosyre, fulgt av kopolymerisasjon av denne blandingen. Blanding oppnås ved innvirkningen av fosgen på en blanding av en første og en annen α -aminosyre som har reaksjonshastigheter som ligger nær den til fosgen. Det er også beskrevet en kopolymer som oppnås ved hjelp av denne fremgangsmåten, og et middel for belegging av hudsår omfattende kopolymeren.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en ny fremgangsmåte for syntetisering av en kopolymer av to α -aminosyrer, som omfatter fremstilling av en blanding av N-karboksydehydrid av en første α -aminosyre og N-karboksydehydridet av en annen α -aminosyre, fulgt av kopolymerisasjon av denne blanding. Oppfinnelsen angår også et middel i form av nevnte kopolymer for tildekning av hudsår og lignende. Dette middelet som er beregnet for slik tildekning er ikke et terapeutisk middel, men fremmer arddannelse i kraft av adhesjonsegenskaper og fuktighetsretensjonsegenskaper.

I kjente metoder av ovenstående type oppnås blandingen av N-karboksydehydrid av den første og den andre α -aminosyren ved (i) fremstilling separat av N-karboksydehydridet av den første α -aminosyren og N-karboksydehydridet av den andre α -aminosyren ved separat reaksjon av fosgenet på den første aminosyren og på den andre aminerte syren, og deretter ved (ii) blanding, eventuelt etter rensing, av de to således oppnådde N-karboksydehydridene. P.g.a. den separate fremstilling av de to N-karboksydehydridene krever disse kjente metoder anvendelse av to parallelle produksjonslinjer som hver omfatter en reaktor med forskjellig utstyr (røreverk, temperaturmåleanordninger, tilbakeløpsanordning, inntak for reagensene, anordninger for justering av fosgenstrømnings-hastigheten, anordninger for utføring av reaksjonsblandingen) anordninger for rensing av N-karboksydehydridet og anordninger for overføring av nevnte N-karboksydehydrid til kopolymerisasjonsreaktoren. Anvendelsen av disse metoder krever således nødvendigvis komplekst og derfor kostbart utstyr. Videre er det ofte vanskelig å programmere alle operasjonene som utføres med dette utstyret, for at det skal bli synkrone forhold mellom de to parallelle produksjonslinjene. Nevnte vanskelighet er et resultat av det komplekse utstyret som benyttes, men også det faktum at reaksjonen av en av α -aminosyrene med fosgenet kan nødvendiggjøre lengre tid enn den andre α -aminosyren. Det hender således ofte med de ovenfor omtalte kjente metoder at operasjonene hva angår

det ene av N-karboksyanyhydridene er ferdige før de som angår det andre N-karboksyanyhydridet slik at det N-karboksyanyhydridet som oppnås først, må oppbevares i et mer eller mindre langt tidsrom før det anvendes for kopolymerisasjon. Det har nå blitt observert at disse N-karboksyanyhydridene ikke holder seg godt, og er følsomme overfor forskjellige innvirkninger, spesielt fuktighet, hvilket betyr at det må tas forholdsregler, hvilket ytterligere kompliserer utstyret og syntesen av N-karboksyanyhydridene.

Formålet med foreliggende oppfinnelse er å overvinne de ovenfor omtalte ulemper og ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringes det derfor en fremgangsmåte for syntese av en kopolymer av to α -aminosyrer, omfattende polymerisasjon av en blanding av N-karboksyanyhydrider av nevnte aminosyrer, hvor N-karboksyanyhydridene er fremstilt ved omsetning av de respektive α -aminosyrer med fosgen, og denne fremgangsmåten er kjennetegnet ved at de to α -aminosyrene har vesentlig samme reaksjonshastighet med fosgen og at de blandes før tilsetning av fosgenet.

Det skal forstås at ved hensiktsmessig valg av α -aminosyre-utgangsmaterialene, nemlig de som har sammenlignbare reaksjonshastigheter med fosgen, blir det mulig å reagere dem samtidig med fosgenet i en enkelt reaktor, og en enkelt produksjonslinje blir da tilstrekkelig for oppnåelse av de ønskede N-karboksyanyhydridene, hvilket ikke bare sterkt forenkler utstyret som tilveiebringes for syntesen av den ønskede kopolymeren, men ytterligere unngår enhver risiko for nedbrytning av N-karboksyanyhydridene fordi de oppnås samtidig, og den midlertidige oppbevaring eller lagring av det ene eller det andre av disse stoffene er ikke lenger nødvendig.

De to α -aminosyrene dannes fordelaktig av α -aminosyrer hvis karbonatom i stilling β er i form av CH_2 og hvis α -aminogruppe er i form av NH_2 . Det er spesielt foretrukket at en

av syrene utgjøres av leucin, spesielt L-leucin, og den andre syren utgjøres av glutaminsyre eller glutaminsyre hvis karboksylfunksjon som ligger lengst vekk fra aminfunksjonen er forestret med en metyl- eller benzylgruppe, spesielt L-glutaminsyre eller metyl- eller benzylesteren av L-glutaminsyre.

Blandingen av nevnte første og andre α -aminosyrer som skal reageres med fosgen, innbefatter fordelaktig 40-60 mol-% av en av disse aminosyrene, og 60-40 mol-% av den andre.

Reaksjonen av α -aminosyrene kan utføres i et organisk oppløsningsmiddel og dioksan eller tetrahydroferan kan nevnes som eksempler.

Før kopolymerisasjon av de resulterende N-karboksydehydridene er det ønskelig å utsette dem for en passende behandling for reduisering av deres innhold av klorert derivat, fortrinnsvis til en verdi mindre enn 0,1 %, idet disse derivatene dannes under reaksjonen av fosgenet med α -aminosyrene. En slik behandling er i det følgende beskrevet i fremstillinger som er gitt som illustrasjon på oppfinnelsen.

Blandingen av N-karboksydehydridene underkastes deretter kopolymerisasjonsreaksjonen, fordelaktig ved moderate temperaturer, i et passende oppløsningsmiddel slik som dioksan og i nærvær av en kopolymerisasjonsinitiator slik som et tertiært amin (trietylamin, tributylamin, trietanpolamin, osv.), eventuelt i nærvær av et litiumsalt (f.eks. klorid eller nitrat) eller en sterk base slik som et alkali-metallalkoholat (f.eks. natriummetoksyd). Forholdet for summen av antall mol av N-karboksydehydridene til antall mol av kopolymerisasjonskatalysatoren avhenger av initiatoren som benyttes, og den viskositet som er ønsket for kopolymeren. Således, i det tilfelle initiatoren utgjøres av tributylamin, så leder forholdet i området 25-200 til en kopolymer som har en egenviskositet som er hensiktsmessig for de anvendelser

som er beskrevet i det følgende, og for hvilke kopolymeren er tilsiktet. Likeledes, når initiatoren utgjøres av natriummetoksyd, leder et forhold i området 100-1000 til en hensiktsmessig kopolymer.

5

Kopolymeren som oppnås ved hjelp av den ovenfor angitte fremgangsmåte, isoleres ved å føre reaksjonsblandingen inn i et stort overskudd vann. På denne måten utføres kopolymeren i form av et meget hydrofobt og meget voluminøst, fibrøst produkt.

10

Denne kopolymeren kan anvendes som et middel for belegging av hudsår, hudsoner som blir reparert, brannsår og soner hvorfra transplantater har blitt tatt, hvilke belegningsmidler fremmer arrdannelse samtidig som de inntil heling eller arrdannelse har funnet sted, sikrer beskyttelse av disse sårene og sonene mot utvendig angrep, enten av mekanisk eller mikrobiell art.

15

20

Ifølge oppfinnelsen er det således også tilveiebragt et middel for tildekning av hudsår, hudsoner som er reparert, brannsår og soner hvorfra transplantater har blitt tatt, og dette middelet er kjennetegnet ved at det utgjøres av kopolymeren oppnådd ved fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av de medfølgende krav 1-7. Det er foretrukket at middelet er i form av en tynn film, pulver eller gel.

25

30

Kliniske studier av forbindinger fremstilt av nevnte kopolymer har vist at befordringen av arrdannelsen ikke skyldes en arrdannelseseffekt hos kopolymeren, dvs den skyldes ikke en farmasøytisk effekt hos kopolymeren, men den skyldes en ikke-farmasøytisk effekt som resulterer fra kopolymerens spesifikke egenskaper, dvs:

35

- utmerket adhesjon av kopolymeren til såroverflatene; dette gir retensjon av fuktigheten og fremmer således gjenoppbygging av celler og vev,

- ingen nødvendighet for å fornye forbindingen under arrdannelsesprosessen, hvilket unngår at epidermiseringsprosessen forsinkes.

5 I forbindelse med anvendelse av foreliggende middel påføres således kopolymeren i en form som er hensiktsmessig for dens anbringelse i et tynt lag på den delen som skal beskyttes. Denne kopolymeren kan således som nevnt ovenfor påføres i form av en tynn film eller et pulver, eller inkorporeres i en
10 gel. Fra denne kopolymeren kan det mer spesielt dannes en film under anvendelse av den velkjente teknikk med faseinversjon, hvilket vil bli beskrevet mer detaljert i det nedenstående. En slik film er vanligvis gjennomskinnelig, fleksibel og ikke-porøs, den har en tykkelse fortrinnsvis
15 mellom 300 og 750 μm , og den er permeabel overfor oksygen, vanndamp, og overfor visse desinfiserende oppløsninger som det eventuelt kan være ønskelig å påføre gjennom nevnte film. For oppnåelse av en film med disse egenskapene, er det
20 ønskelig at kopolymeren har en egenviskositet ved 30°C i dikloreddisyre på mellom 0,5 og 3 dl/g. Etter heling eller arrdannelse blir filmen, pulveret eller gelen fjernet, eller blir spontant eliminert fra sonen på hvilken den ble påført.

Følgende fremstillinger illustrerer oppfinnelsen.

25

Fremstilling av metyl-L-glutamat (L-Glu(OMe))

1,25 liter metanol anbringes i en 2 liters reaktor. 100 ml acetylklorid helles deretter i ved en temperatur under 220°C.
30 Når hellingen er ferdig, blir 148 g L-glutaminsyre tilsatt på en gang under de samme temperaturbetingelsene, og omrøring foretas ved omgivelsestemperatur i 24 timer. Deretter helles 125 ml pyridin i blandingen oppnådd ved en temperatur under 20°C. Et bunnfall dannes, og omrøring foretas igjen i 48
35 timer ved omgivelsestemperatur. Bunnfallet separeres ved filtrering, vaskes to ganger med etanol og en gang med eter, hvorefter det tørkes i et vakuum, hvilket leder til 174 g

(utbytte: 86,56 %) av den forventede ester, som er i form av et hvitt pulver.

Elementanalyse:

| 5 | Funnet (%) | Beregnet (%) |
|---|------------------|--------------|
| | C: 45,22 - 45,23 | 44,72 |
| | H: 7,14 - 7,16 | 6,88 |
| | N: 8,46 - 8,46 | 8,69 |

10

TLC: elueringsmiddel : BuOH/CH₃ COOH/H₂O: 4/1/1

Fremstilling av blandingen av N-karboksyanhydridene av L-leucin og metyl-L-glutamat

15

65,5 g L-leucin (0,5 mol) 80,5 g metyl-L-glutamat (0,5 mol) og 1600 ml vannfri dioksan som på forhånd er ført over aluminiumoksyd for å frigjøre den for peroksydene som den kan inneholde, anbringes i en 2 liters reaktor som har et 2
20 liters ikke-retursystem, et gassintak som tillater en stor strøm av fosgen og argon, et kulekjølemiddel, en NaOH-mottager og en kolonne med aktivt karbon.

25

Den oppnådde suspensjon spyles med argon i 30 min. Deretter innføres en hurtig strøm av fosgen under sterk omrøring av blandingen. Temperaturen inne i reaktoren bringes til 40°C. Etter 6 timer blir reaksjonsblandingen homogen. Oppløsningen utsettes deretter for en argonstrøm i minst 48 timer ved 40°C for derved å eliminere et maksimum av de klorerte derivatene
30 som er oppløst i oppløsningen. Deretter inndampes oppløsningen i et vakuum, og resten behandles på uttømmende måte med 20 liter vannfri dioksan pr. 2 liter porsjoner. Det verifiseres at mengden av klorerte derivater i destillatet minsker progressivt.

35

Oppløsningen i dioksanen inndampes i et vakuum, og resten opptas i 800 ml tørr heksan. Det oppstår krystallisering av

et produkt som etter vakuumbørking utsettes for en potensio-
metrisk mengde bestemmelse av kloridionene. I det tilfellet
hvor kloridioninnholdet er større enn 0,4 % bør den uttøm-
mende dioksanbehandling foretas på nytt. I motsatt fall
5 skulle en sluttbehandling med den teoretiske mengde Ag_2O i
oppløsning i dioksanen senke kloridioninnholdet til under
0,1 %. Dette er den betingelse som kreves for oppnåelse, i
følgende trinn, av en kopolymer som er egnet for dannelsen av
en tynn film. Omkring 140 g (utbytte 81,39 %) av den
10 forventede blanding klar for kopolymerisasjon blir til slutt
oppnådd.

Fremstilling av L-leucin- og metyl-L-glutamat-kopolymeren

15 137 g av blandingen fremstilt som beskrevet ovenfor og 2000
ml vannfri dioksan innføres i en 2 liters reaktor som har et
kraftig røreverk. Den oppnådde oppløsning bringes, i en
argonatmosfære, til en temperatur på 40°C . 16 ml av en 0,1 M
oppløsning av natriummetoksyd i dioksan eller 8 ml av en 1 M
20 oppløsning av tributylamin i dioksan innføres deretter på en
gang. Etter 4 timers omrøring starter polymerisasjons-
reaksjonen, og oppløsningen blir mer og mer viskøs. Den
hensettes under omrøring i 3 dager mens det foretas kontroll
av forsvinningen av det karakteristiske båndet til N-
25 karboksyanhydridene ved 1785 cm^{-1} ved IR. Polymerisasjons-
tiden avhenger av mengden av klorerte derivater som er til
stede i mediet og mengden av benyttet polymerisasjons-
initiator. For et innhold av klorert derivat på mindre enn
0,1 % er et molforhold for N-karboksyanhydridblandingen til
30 initiatoren på 100 i tilfelle for bruk av tributylamin eller
500 i tilfellet for bruk av natriummetoksyd særlig egnet for
oppnåelse av en kopolymer som kan dannes til en film.

Den viskøse oppløsningen av kopolymeren i dioksanen helles
35 deretter langsomt i en beholder inneholdende 10 liter vann.
Kopolymeren utfelles i kontakt med vannet, utfellingen
separeres ved filtrering, den tørkes i luft på papir, og tør-

kingen avsluttes i et vakuum. Således oppnås 85 g av et hvitt produkt som har følgende egenskaper:

Egenviskositet ved 30°C i dikloreddiksyre: 1,79 dl/g

5 Elementanalyse:

| Funnet (%) | Beregnet (%) |
|----------------|--------------|
| C: 56,04-56,17 | 56,23 |
| N: 7,99-7,96 | 7,83 |
| N: 10,48-10,42 | 10,93 |

10 (De beregnede prosentverdiene er bestemt for en ekvimolar mengde av L-leucin og metyl-L-glutamat.)

Dreiningsevne: $\alpha = -44^{\circ}\text{C}$ (c = 1 % i dikloreddiksyre) ved 20°C
15 for D-spektralstrålen til natrium.

Høytrykksvæskekromatografi: Mengde av L-leucin og L-glutaminsyre etter 48 timers hydrolyse i konsentrert HCl ved 100°C:

| | |
|-----------------|------|
| L-leucin: | 44 % |
| L-glutaminsyre: | 56 % |

Fremstilling av en tynn film fra kopolymeren av L-leucin og metyl-L-glutamat

25 Et kolloidium av kopolymeren dannes først i et meget polart organisk oppløsningsmiddel slik som N-metylpyrrolidon, N-dimetylacetamid, N-dimetylformamid, dimetylsulfoksyd eller difluor- eller trifluoreddiksyre. Etter helling av det oppnådde kolloidium til den ønskede tykkelse (f.eks. 500 μm) på en glassplate, neddykkes platen som understøtter kopolymeren i fler suksessive vannbad for å koagulere kolloidiumet og vaske den resulterende filmen. Denne filmen fjernes fra glassplaten og nedsenkes i et bad inneholdende 75 % PEG 600
30 og 25 % fysiologisk serum for derved å impregnere filmen med dette for dens konservering. Etter å ha blitt anbragt i en impermeabel pose steriliseres det hele ved γ -bestråling.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for syntese av en kopolymer av to α -amino-syrer, omfattende polymerisasjon av en blanding av N-karboksy-anhydrider av nevnte aminosyrer, hvor N-karboksy-anhydridene er fremstilt ved omsetning av de respektive α -amino-syrer med fosgen, k a r a k t e r i s e r t v e d at de to α -amino-syrene har vesentlig samme reaksjonshastighet med fosgen og at de blandes før tilsetning av fosgenet.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte blanding, før trinnet med polymerisering av blandingen av N-karboksy-anhydrider av de to α -amino-syrene, behandles slik at den har et kloridderivatinnhold på mindre enn 0,1 %.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at behandlingen omfatter reaksjon av blandingen med Ag_2O .

4.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 - 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at karbonatomet i β -stillingen i begge α -amino-syrene er i CH_2 -formen og at amino-gruppen i α -stillingen er i NH_2 -formen.

5.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 - 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at en av α -amino-syrene er leucin.

6.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at en av α -amino-syrene er

glutaminsyre eller glutaminsyre hvis karboksylfunksjon som ligger lengst vekk fra aminfunksjonen, er forestret med en metyl- eller benzylgruppe.

5 7.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t blandingen av de to α -aminosyrene omfatter 40-60 mol-% av en av dem og 60-40 mol-% av den andre.

10

8.

Middel for tildekning av hudsår, hudsoner som er reparert, brannsår og soner hvorfra transplantater har blitt tatt, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det utgjøres av
15 kopolymeren oppnådd ved fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 1-7.

9.

Middel ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
20 det er i form av en tynn film, pulver eller gel.

25

30

35