

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie



SYNTÉZA MODIFIKOVANÝCH
POLY(ETHYLENGLYKOLŮ) JAKO NOSIČŮ LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2007

Michal Bitman

Za všestrannou a obětavou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracování diplomové práce děkuji především PharmDr. Lence Kubicové, CSc., doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi, CSc., Mgr. Martinu Pravdovi a Ing. Pavlu Skálovi. Za měření IČ spekter děkuji paní Ivě Vencovské. Za měření a interpretaci NMR spekter vděčím doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc.

Obsah:

Seznam použitých zkratk

1.	ÚVOD	1
2.	OBECNÁ ČÁST	3
2.1	Poly(ethylenglykol)	3
2.2	Konjugáty poly(ethylenglykolu) a biologicky aktivních látek	5
2.2.1	Konjugáty s biomakromolekulami	5
2.2.2	Konjugáty s léčivý charakteru nízkomolekulárních organických látek	6
2.3	Blokové kopolymery poly(ethylenglykolu) s poly(L- α -aminokyselinami).....	6
3.	CÍL PRÁCE	8
4.	METODIKA PŘÍPRAVY MODIFIKOVANÝCH POLY(ETHYLENGLYKOLŮ).....	9
4.1	Zavedení terminální karboxylové skupiny.....	9
4.2	Zavedení koncové primární aminoskupiny	10
4.3	Zavedení aromatické skupiny s aldehydickou funkční skupinou	12
4.4	Syntéza blokového kopolymeru poly(ethylenglykolu) s poly(L- α -aminokyselinami)..	13
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	15
6.	DISKUZE	35
7.	ZÁVĚR.....	40
8.	LITERATURA	41

Seznam použitých zkratek

DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylfuran
IČ	infračervená spektroskopie
mesylát	sůl methansulfonové kyseliny
mPEG	methoxypoly(ethylenglykol), α -hydro- ω -methoxypoly(oxyethylen)
NCA	<i>N</i> -karboxyanhydrid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PEG	poly(ethylenglykol), α -hydro- ω -hydroxypoly(oxyethylen)
Py	pyridin
TEA	triethylamin
tBuOK	kalium- <i>terc</i> -butanolát
tosylát	sůl <i>p</i> -toluensulfonové kyseliny
THF	tetrahydrofuran

1. ÚVOD

Konjugáty polymerů s biologicky aktivními látkami a jejich využití v tzv. *drug delivery systems* je jedním z progresivních směrů farmaceutické chemie.¹ Mnohonásobné snížení toxicity a specifická aktivace vlastní účinné látky v požadovaném místě působení jsou důvody pro tvorbu biokonjugátů řady léčiv.² Široké uplatnění našly zejména při terapii nádorových onemocnění, kde jsou využívány pro cílenou distribuci cytostatik.^{3,4}

Polymerní nosiče léčiv musí splňovat obecné požadavky: musí být netoxické, neimunogenní a musí být schopny eliminace z organismu. Vazba léčivo-polymer musí být enzymaticky nebo hydrolyticky degradabilní.^{1,3} Jedním z vhodných polymerů pro biokonjugaci je *poly(ethylenglykol)* (PEG) pro jeho snadnou dostupnost, nízkou toxicitu, vysokou biokompatibilitu, rozpustnost ve vodě a ve většině organických rozpouštědel. Kovalentně vázaný PEG solubilizuje obtížně rozpustné molekuly, přenáší je přes buněčné membrány (mechanismem endocytózy), pozitivně ovlivňuje jejich farmakokinetiku a eliminaci z organismu.^{2,5,6,7}

Etherové vazby poly(ethylenglykolového) řetězce nepodléhají metabolickým procesům v organismu, ale koncové skupiny mohou být modifikovány takovým způsobem, aby molekula léčiva byla navázána pomocí biodegradabilní vazby nebo prostřednictvím štěpitelné spojky, tzv. *spaceru*, který určuje kinetiku uvolňování dané aktivní látky.^{2,7} V současné době se používají takové systémy, kdy je léčivo postupně uvolňováno z nosiče v několika fázích tak, jak se rozpadají jednotlivé typy vazeb.⁵ Štěpení vazby léčivo-spojka-nosič se řídí kinetikou, kdy v pomalé (rychlost určující) fázi dochází k rozštěpení vazby mezi nosičem a spojkou krevními hydrolázami za vzniku proléčiva (léčivo-spojka).² Závěrečný krok je velmi rychlý a proléčivo se rozpadá na vlastní účinnou látku a netoxickou spojku. Takto se dosáhne relativně stálé hladiny léčiva v organismu a prodloužení poločasu jeho eliminace z organismu.^{1,5,8}

Konjugace biologicky aktivní látky s poly(ethylenglykolem) je proces nazývaný PEGylace.¹ Bylo popsáno mnoho systémů léčivo-poly(ethylenglykol) včetně modifikace již používaných forem nosičů léčiv, jako jsou např. liposomy, nanočástice apod.² Vzhledem k tomu, že poly(ethylenglykol) nevyvolává

interakci se složkami imunitního systému, jeho vazba na proteiny, popř. oligonukleotidy snižuje imunogenní potenciál těchto látek.⁹ Toho se využívá k tzv. *maskování* biologicky aktivních substancí.

Naše pracovní skupina se zaměřila na konjugaci poly(ethylenglykolu) s látkami, které vykazují antimykotickou aktivitu. Farmakoterapie systémových mykóz představuje závažný, dosud nevyřešený problém.¹⁰ Současná paleta použitelných léčiv je poměrně chudá (některé z azolových derivátů, amfotericin B, kaspofungin a některé další látky s menším významem jako flucytosin nebo terbinafin).¹¹ Žádné z těchto léčiv však nespĺňuje představy o ideálním antimykotiku. Mezi hlavní problémy patří nedostatečně široké spektrum antimykotické aktivity, dále se jedná o látky relativně toxické, s mnoha závažnými vedlejšími účinky. Vedle hledání nových strukturních typů antimykotik je významným směrem výzkumu v oblasti systémových antimykotik i snaha o snížení toxicity a zlepšení farmakokinetického profilu již známých a používaných léčiv.^{10,11,12}

Důležitou skupinu léčiv používaných v terapii těžkých mykóz představují polyenová antimykotika a z nich zejména amfotericin B, dosud nejúčinnější antimykotikum s nejširším spektrem účinku a nejmenším výskytem rezistencí. Vzhledem k minimální rozpustnosti amfotericinu B ve vodě a jeho značné akutní i chronické toxicitě (závažná je zejména nefrotoxicita) jsou využívány různé strategie ke zlepšení jeho vlastností jako např. inkorporace do lipidových forem.^{13,14} Teprve v poslední době se objevují pokusy o vyřešení tohoto problému vazbou na hydrofilní polymer. Předběžná studie ukázala, že ve vodě rozpustný konjugát amfotericinu B s methoxy(polyethylenglykolem) vykazuje při snížené toxicitě srovnatelnou účinnost.¹⁵ Podobných výsledků bylo dosaženo u biodegradabilních konjugátů amfotericinu B s kopolymery poly(ethylenglykolu) a poly(α -L-aminokyselin)¹⁶ a také konjugátů amfotericinu B s polysacharidy.¹⁷

2. OBECNÁ ČÁST

2.1 Poly(ethylenglykol)

Poly(ethylenglykoly) jsou dobře definované a snadno dostupné makromolekuly s vhodnými vlastnostmi pro využití v chemii, biotechnologii a farmacii,⁷ a to jak v základním výzkumu, tak i pro zvláštní praktické uplatnění. Z hlediska farmaceutické aplikace je důležité, že se jedná o netoxickou, ve vodě rozpustnou makromolekulární látku, která nevyvolává imunitní odpověď organismu.^{2,7}

Termín poly(ethylenglykol) **PEG** je používán pro makromolekuly s relativní molekulovou hmotností menší než 20 000, zatímco poly(ethylenoxid) **PEO** bývá používán pro polymery s vyšší molekulovou hmotností.² Ve farmacii se pro tento polymer také setkáváme s pojmenováním **makrogoly**.

Poly(ethylenglykoly) se charakterizují relativní molekulovou hmotností polymeru, např. PEG 400. Poly(oxyethylen) je strukturální název skeletu dle IUPAC,¹⁸ proto budou tyto sloučeniny pro větší přesnost pojmenovány i těmito názvy.

Kromě poly(ethylenglykolu) se dvěma terminálními hydroxyskupinami se pro syntetické účely využívá i jeho monomethoxyderivát (**mPEG**). Oba typy poly(ethylenglykolů) jsou syntetizovány polymerací ethylenoxidu za použití nukleofilní katalýzy buď s hydroxidovým nebo methoxidovým aniontem⁷ (schéma 1).

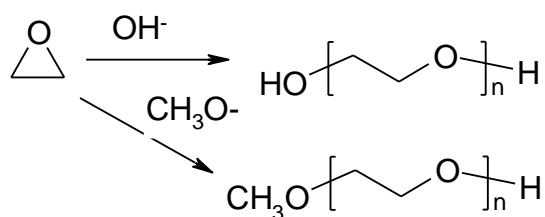


Schéma 1: Syntéza polymeru

Poly(ethylenglykoly) jsou velmi dobře rozpustné jak v polárních, tak i nepolárních rozpouštědlech, tj. ve vodě a ve většině organických rozpouštědel s výjimkou diethyletheru, diisopropyletheru, petroletheru a ethylenglykolu.⁶ Díky jejich šroubovicové struktuře dobře krystalizují z některých rozpouštědel. Vodné roztoky mohou být sterilizovány filtrací, autoklávem apod.

Toxicitu vykazují pouze poly(ethylenglykoly) s nízkou molekulovou hmotností ($M < 400$). S rostoucí molekulovou hmotností toxicita polymeru klesá.⁶ Ve vodném roztoku nemá jejich přítomnost negativní vliv na konformace proteinů nebo aktivitu enzymů. Vykazují rychlou *clearance* a organizací FDA byly schváleny pro širokou škálu biomedicínálních aplikací.²

Poly(oxyethylenový) skelet polymeru je inertní vůči většině chemických reakcí. Přítomnost jedné (mPEG) nebo dvou (PEG) terminálních hydroxylových skupin umožňuje jejich přeměnu na reaktivní funkční skupiny, což je první krok v přípravě biokonjugátů. Jedná se o transformaci koncové hydroxylové skupiny na chlorid, bromid, popř. estery sulfonových kyselin. Takto modifikované poly(ethylenglykoly) snadno podstupují nukleofilní reakce. Toho se využívá např. pro zavedení terminální aminoskupiny. Dalšími způsobem modifikace poly(ethylenglykolového) řetězce je zavedení koncových karboxylových a aldehydických skupin.^{2,19}

2.2 Konjugáty poly(ethylenglykolu) a biologicky aktivních látek

Jak již bylo zmíněno, konjugáty léčiv s poly(ethylenglykolem) mají řadu výhodných vlastností, k fyzikálně-chemickému aspektu patří zvýšení rozpustnosti léčiva ve vodě, *in vivo* pak dochází ke zlepšení farmakokinetického profilu a snížení toxicity dané substance.^{1,5} Tyto konjugace s poly(ethylenglykolem) jsou dále např. využívány k maskování liposomů (tzv. *stealth*-liposomy) a proteinů,² tvorbě nanočástic a polymerních micel (blokové kopolymery s α -L-aminokyselinami).²⁰ Vysoká míra hydratace řetězců vede k poklesu eliminace léčiva pomocí retikuloendoteliálního systému, tím zvyšuje koncentraci v plazmě, což vede k prodloužení biologických poločasů.

2.2.1 Konjugáty s biomakromolekulami

Biologicky aktivní látky polypeptidového charakteru jsou v organismu rychle štěpeny četnými endo- a exopeptidasami přítomnými v krvi a ostatních kompartmentech. Většina z nich je imunogenních a také jsou rychle vylučovány renální ultrafiltrací. Jejich konjugace s poly(ethylenglykoly) může řadě těchto problémů předcházet.

V roce 1977 poprvé použili pojem PEGylace Abuchowski, Davis et al.⁵ pro kovalentní vazbu methoxy(polyethylenglykolu) s bovinním sérovým albuminem. K vazbě na molekuly methoxypoly(ethylenglykolu) byly využity zejména primární alifatické aminoskupiny přítomné v postranních řetězcích aminokyselin albuminu. U konjugátu byl pozorován delší plazmatický poločas, snížená imuno- a antigenicita při zachování velkého podílu biologické aktivity.⁵ Tyto vlastnosti přinášejí přítomnost obalu z molekul mPEG, který stericky brání reakci s buňkami imunitního systému a chrání protein před proteolytickou inaktivací.

Tyto výhody, které PEGylace přináší, byly důvodem pro přípravu konjugátů PEG a řady dalších léčiv ze skupiny hormonů (interferon (Pegintron®)², erythropoetin⁵, somatotropin² apod.) a enzymů (L-asparaginasa⁵, streptokinasa², superoxidodismutasa⁶, insulin²).

2.2.2 Konjugáty s léčivý charakteru nízkomolekulárních organických látek

Metody pro konjugaci biomakrolekul s poly(ethylenglykolem), byly využity i pro přípravu konjugátu s běžnými léčivý. Příkladem může být nesteroidní antiflogistikum *ibuprofen*,⁹ jehož karboxylová funkční skupina byla esterifikována koncovou hydroxylovou skupinou poly(ethylenglykolu). To vedlo k prodloužení účinku tohoto léčiva. Podobným způsobem byly navázány i molekuly dalších léčiv obsahujících karboxylovou funkční skupinu, např. kyselina acetylsalicylová.¹⁹

Vhodný způsob aktivace koncových hydroxylových skupin poly(ethylenglykolu), např. příprava *p*-nitrofenylformiátu,⁷ umožňuje přípravu karbamátů. Tímto způsobem lze na poly(ethylenglykol) navázat léčiva obsahující primární aminoskupiny, jako např. doxorubicin³, daunorubicin, adriamycin a amfotericin B.⁷

2.3 Blokované kopolymery poly(ethylenglykolu) s poly(L- α -aminokyselinami)

Blokované kopolymery poly(ethylenglykolu) s poly(L- α -aminokyselinami), PEG-*b*-p(L- α -AK), jsou často používané nosiče léčiv v *drug delivery* systémech.^{1,21,22,23} Jejich výhodou je nízká toxicita a biodegradabilita. Ta část kopolymeru, která je tvořena polyamidovým řetězcem, v organismu podstupuje hydrolytické nebo enzymatické štěpení, jehož produktem jsou L- α -aminokyseliny²⁴. V případě, že funkční skupiny přítomné v postranních řetězcích polyamidové části polymeru jsou modifikovány tak, aby byla snížena jejich rozpustnost ve vodě (tj. amid, ester), jsou blokované kopolymery schopny tvořit micely s hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem.²⁴ Tyto micely jsou schopné nést ve svém jádře hydrofobní molekuly léčiva.²⁵ Pro tvorbu micel schopných enkapsulovat molekuly hydrofobních léčiv byly rovněž použity PEG-*b*-p(L-Asp) a PEG-*b*-p(L-Glu), jejichž karboxylové skupiny v postranním řetězci byly modifikovány benzylesterem.²⁶ Jako léčiva byly v tomto případě použity indometacin a doxorubicin. Konjugáty doxorubicinu vykazovaly podobnou aktivitu jako samotné léčivo.²⁷

Přítomnost funkčních skupin v postranních řetězcích polyaminokyselin umožňuje připojení léčiva prostřednictvím biodegradabilních kovalentních

vazeb. Této skutečnosti bylo využito například při přípravě konjugátu PEG-*b*-p(L-Asp) s adriamycinem.²⁷ V takovém případě můžeme konjugát považovat za proléčivo, které uvolňuje aktivní látku až po hydrolytickém rozštěpení vazby léčivo – polymer.

Dalším možným využitím PEG-*b*-p(L-AA) je tvorba micel na základě tzv. „polyion komplexu“ (PIC).²³ Jako příklad lze uvést komplexy negativně nabitého kopolymeru PEG-*b*-p(L-Asp) a kladně nabitého PEG-*b*-p(L-Lys). Těchto vlastností lze využít i k interakci PEG-*b*-p(L-AA) s molekulou léčiva, jako v případě komplexu PEG-*b*-p(L-Lys) s oligonukleotidy.²⁰

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zavedení reaktivních koncových funkčních skupin do molekuly poly(ethylenglykolu) o různých molekulových hmotnostech, které umožňují připojení molekuly léčiva prostřednictvím kovalentních biodegradabilních vazeb pro tzv. *drug delivery* systémy.

Jednalo se o následující modifikace:

1. Zavedení koncových karboxylových skupin, které umožňují připojení molekuly léčiva prostřednictvím esterové či amidové vazby.

2. Esterifikace koncové hydroxylové skupiny poly(ethylenglykolu) 4-formylbenzoovou kyselinou. Ta slouží jako aromatická spojka mezi molekulou léčiva a poly(ethylenglykolem).

3. Transformace koncových hydroxylových skupin poly(ethylenglykolu) na aminoskupiny. Ty potom posloužily k připojení 4-formylbenzoové kyseliny pomocí amidické vazby.

Dalším druhem modifikace byla příprava triblokových kopolymerů poly(L- α -lysin)-*b*-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L- α -lysin). Tyto blokové kopolymery byly následně využity k přípravě dalších typů nosičů pro *drug delivery* systémy.

4. METODIKA PŘÍPRAVY MODIFIKOVANÝCH POLY(ETHYLENGLYKOLŮ)

4.1 Zavedení terminální karboxylové skupiny

Literatura popisuje několik metod pro přípravu karboxylových derivátů poly(ethylenglykolu), kde tato funkční skupina slouží pro navázání ligandů převážně pomocí amidové či esterové vazby.^{8,19} To je dobře využitelné zvláště pro tvorbu farmaceutických konjugátů.

Nejsnazší se zdá být zavedení karboxylu oxidací terminální hydroxyskupiny za použití manganistanu draselného v zásaditém prostředí, nebo oxidem chromovým v kyselém prostředí. Ačkoliv se tyto metody zdají elegantní, nejsou spolehlivé. Oxidace je doprovázena degradací poly(ethylenglykolového) skeletu⁷ - schéma 2.

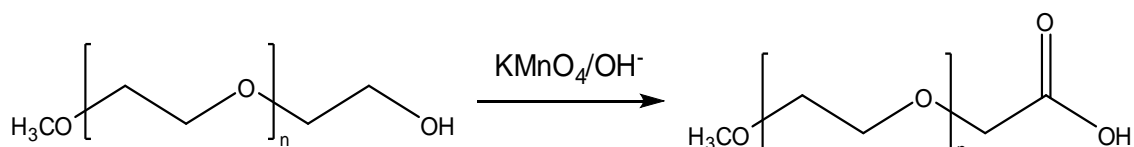


Schéma 2: Oxidace methoxypoly(ethylenglykolu) běžnými oxidačními činidly

Další z možností zavedení koncové karboxylové funkční skupiny je alkylace hydroxylový skupin poly(ethylenglykolu) estery alifatických ω -halogenkyselin.²⁸ Příprava je založena na reakci poly(ethylenglykolu) a *tert*-butyl-4-bromacetátu v *tert*-butanolu, za použití kalium-*tert*-butanolátu jako baze. Vzniklý ethylester poly(ethylenglykol)- α,ω -dikarboxylové kyseliny je poté hydrolyzován roztokem hydroxidu sodného (schéma 3).

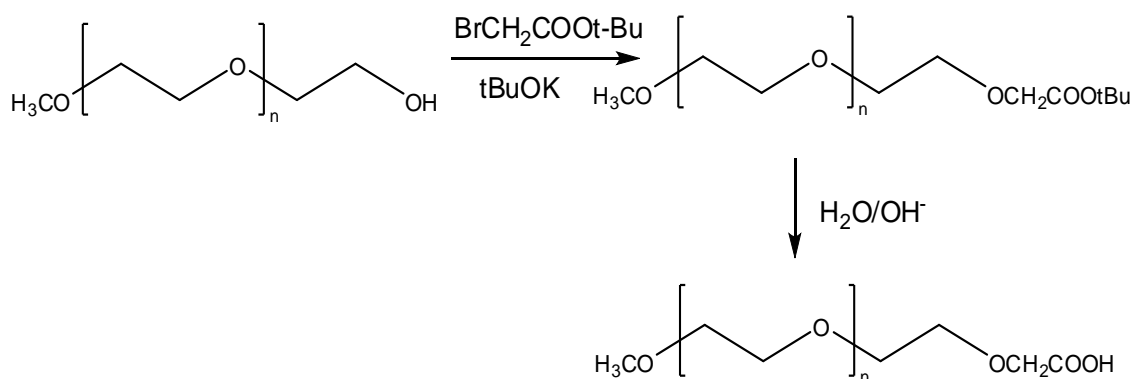


Schéma 3: Zavedení karboxylové funkční skupiny reakcí methoxy(polyethylenglykolu) s *tert*-butyl-2-bromacetátem

Po ukončení reakce je směs neutralizována a produkt je vytřepán do chloroformu.

Nejvýhodnější se ukázal postup využívající esterifikaci koncových hydroxylových skupin polymeru cyklickými anhydridy dikarboxylových kyselin. Reakce probíhá v přítomnosti 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) a lze ji provádět v organických rozpouštědlech při pokojové teplotě.²⁹ Alternativní cestou k provedení této syntézy je tavení sukcinahydridu s poly(ethylen glykolem) při 150 °C v přítomnosti DMAP (schéma 4). Toto provedení reakce výrazně snižuje reakční dobu při zachování výtěžku.⁷

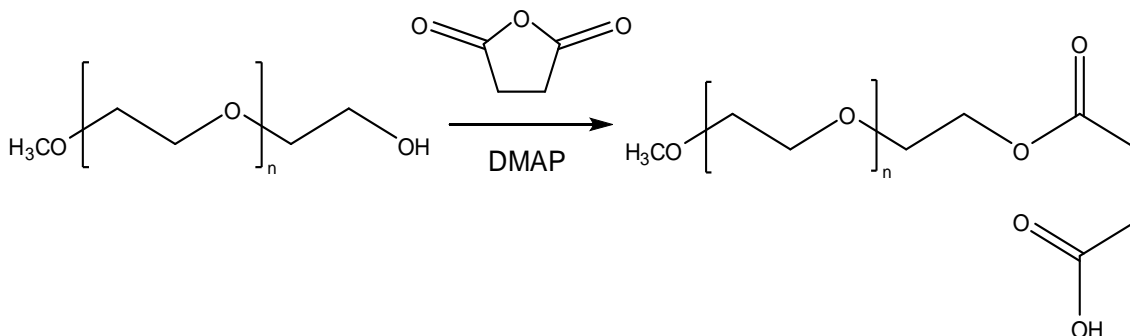


Schéma 4: Esterifikace methoxy(polyethylen glykolu) sukcinanhydridem

4.2 Zavedení koncové primární aminoskupiny

Pro syntézu poly(ethylen glykolu) s koncovou primární aminoskupinou se nabízí řada cest, z nichž jsou v literatuře nejčastěji zmiňovány tři.^{7,30,31} Všechny tři využívají klasické postupy přípravy primárních aminů z alkoholů. Všechny představují dvou- či víceetapňové syntézy.

Prvním krokem všech je konverze koncové hydroxylové skupiny poly(ethylen glykolu) na halogenderivát nebo ester sulfonové kyseliny, nejčastěji mesylát či tosylát - schéma 5.

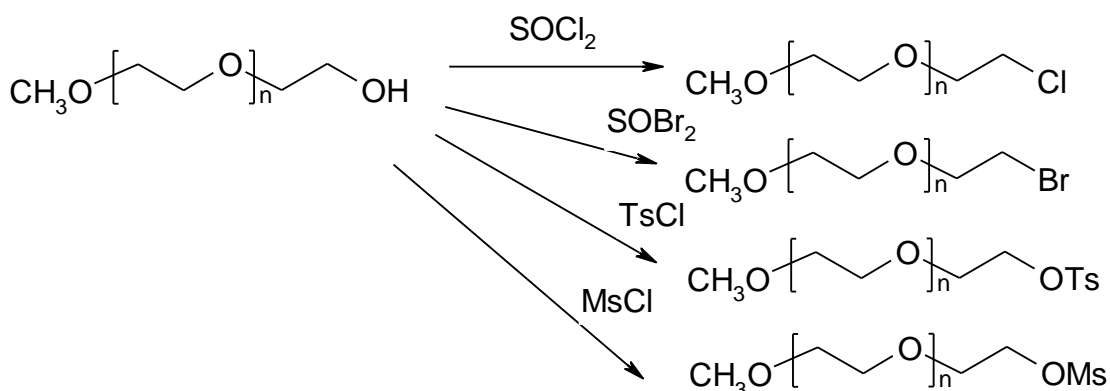


Schéma 5: Aktivace koncové hydroxylové skupiny methoxy(polyethylen glykolu)

Pro převedení na halogenderivát se nečastěji využívá reakce s thionylbromidem či thionylchloridem v toluenu s přídavkem pyridinu.⁷ Při použití thionylbromidu musíme zvláště dbát na to, aby reakce probíhala bez přístupu vzdušné vlhkosti. Thionylbromid se hydrolyzuje na bromovodík, který je schopen štěpit etherové vazby v poly(ethylenglykolu), což vede ke vzniku kratších řetězců polymeru. Pro přípravu mesylátu či tosylátu se využívá reakce chloridu příslušné kyseliny s poly(ethylenglykolem) v pyridinu.³³

V literatuře je popsán i postup přípravy monomesylátu tetra- a hexa(ethylenglykolu).³² Syntéza je založena na reakci ekvimolárních množství oligo(ethylenglykolu) a mesylchloridu s oxidem stříbrným, který funguje jako katalyzátor (schéma 6).

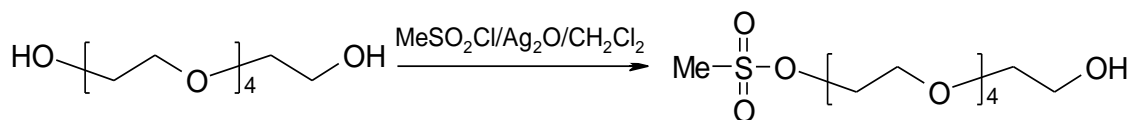


Schéma 6: Příprava monomesylátu tetra(ethylenglykolu)

Další cesta k zvedení primární aminoskupiny do molekuly poly(ethylenglykolu) využívá jako nukleofilu azidy (schéma 7).^{7,31} Aminoskupina je poté získána redukcí azidové skupiny vodíkem s využitím Pd/C katalyzátoru. Jako další činidlo vhodné pro redukcí azidové skupiny vázané na polyethylenglykolový řetězec je v literatuře zmiňován trifenylofosfin v prostředí vodného tetrahydrofuranu.³²

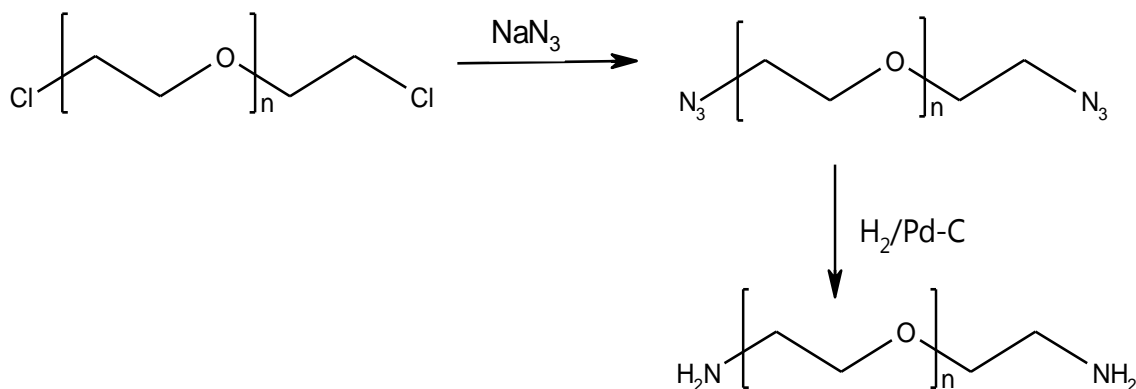


Schéma 7: Příprava α -amino- ω -methoxy(polyethylenglykolu) z aktivovaného PEGu

Třetí cestou pro zavedení primární aminoskupiny do molekuly poly(ethylenglykolu) je Gabrielova syntéza.^{7,31} Jedná se o třístupňovou syntézu, jejímž prvním krokem je příprava halogenderivátu³² nebo tosylátu.³³ Dalším

krokem je reakce s ftalimid-kaliem v prostředí DMF. Meziprodukt je následně podroben hydrazinolýze.

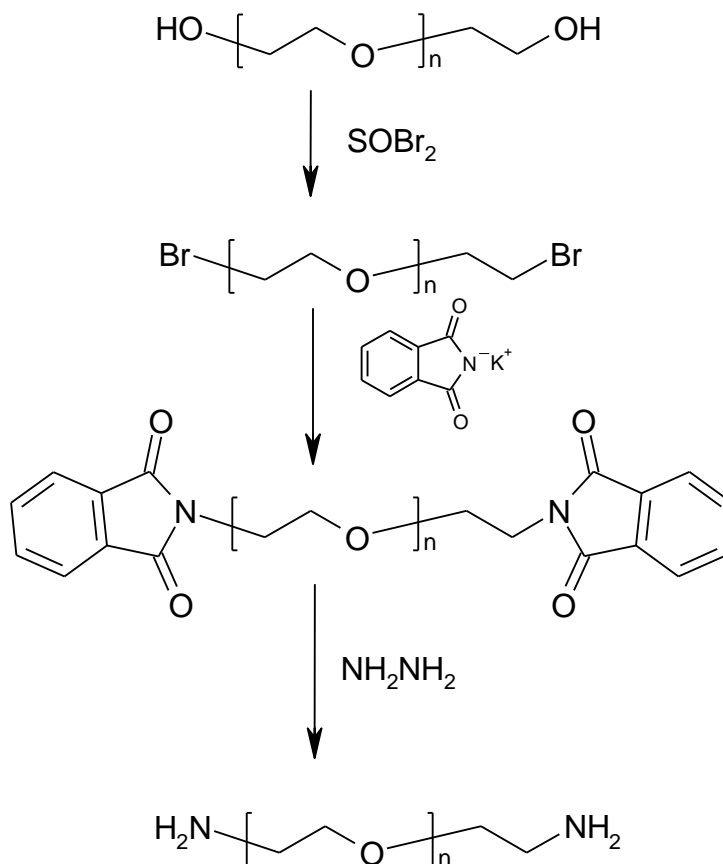


Schéma 8: Zavedení terminální aminoskupiny Gabrielovou syntézou

4.3 Zavedení aromatické skupiny s aldehydickou funkční skupinou

Pro zavedení aromatické aldehydické skupiny do molekuly poly(ethylenglykolu) byla využita reakce s *p*-formylbenzoovou kyselinou. Jedná se o esterifikaci koncových hydroxylových skupin polymeru. K syntéze byla využita metoda využívající *N,N'*-diisopropylkarbodiimid jako dehydratační činidlo a 4-dimethylaminopyridin jako katalyzátor.⁷

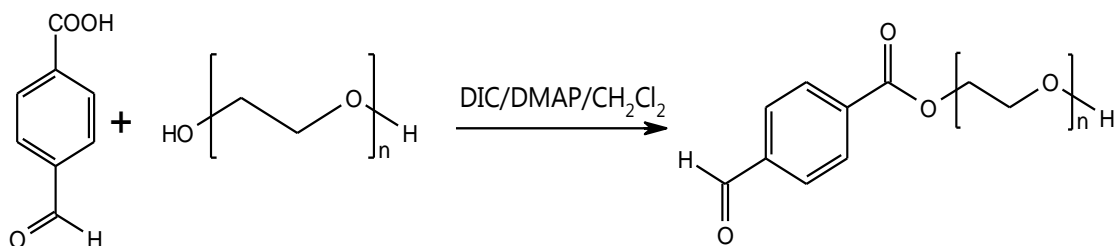


Schéma 9: Zavedení aromatické funkční spojky na poly(ethylenglykol)

Reakcí karboxylové funkční skupiny 4-formylbenzoové kyseliny s *N,N'*-diisopropylkarbodiimidem vzniká *O*-(4-formylbenzoyl)-*N,N'*-diisoproylisourea (schéma 10), která v další fázi reakce slouží jako acylační činidlo, které atakuje koncové hydroxylové skupiny poly(ethylenglykolu).³⁵

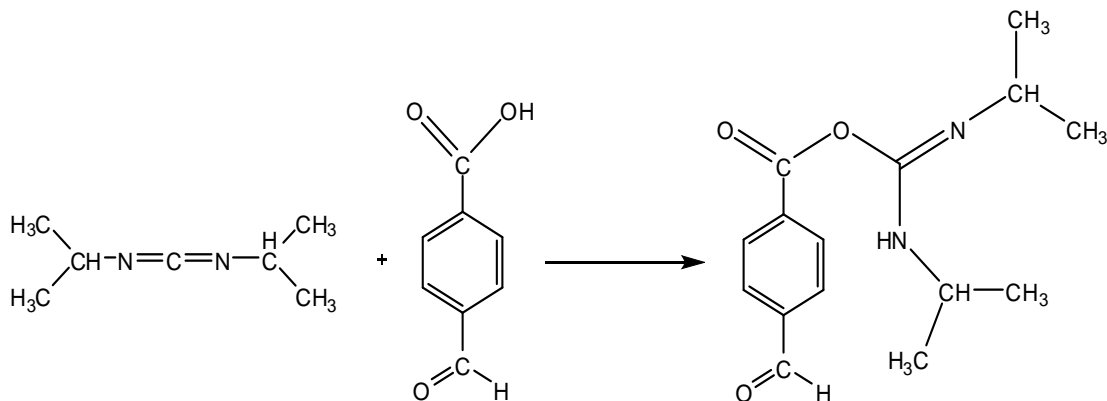


Schéma 10: Reakce DIC s kyselinou *p*-formylbenzoovou za vzniku acylačního činidla

4.4 Syntéza blokového kopolymeru poly(ethylenglykolu) s poly(L- α -aminokyselinami)

Pro přípravu polyamidových řetězců lze využít reakci tzv. *ring-opening* polymeraci monomerů *N*-karboxyanhydridů α -aminokyselin (NCA), kde jako iniciátor vystupuje primární amin^{20,33} – schéma 11.

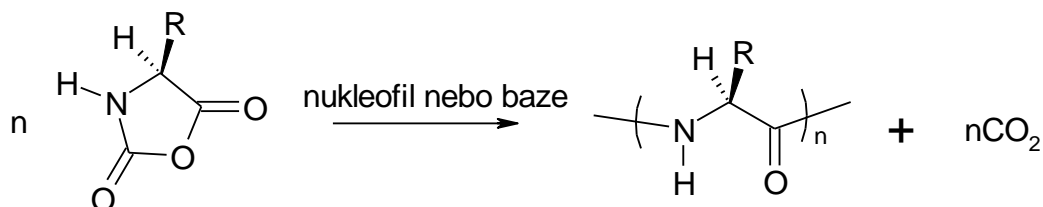


Schéma 11: *Ring-opening* polymerizace NCA

Této reakce se dá využít při přípravě blokových kopolymeru poly(ethylenglykolu) a poly(L- α -aminokyselin).

Příprava *N*-karboxyanhydridů může být provedena dle Fuchse-Farthinga²⁰ reakcí trifosgenu s α -aminokyselinami v prostředí tetrahydrofuranu – schéma 12. V případě, že se v postranním řetězci vyskytuje reaktivní funkční skupina (hydroxyl, amino, karboxyl), musí být tato skupina ochráněna (benzylether, benzyloxykarbonyl, benzylester). Reakci je nutno provádět v inertní atmosféře, tak abychom vyloučili kontakt se vzdušnou vlhkostí.

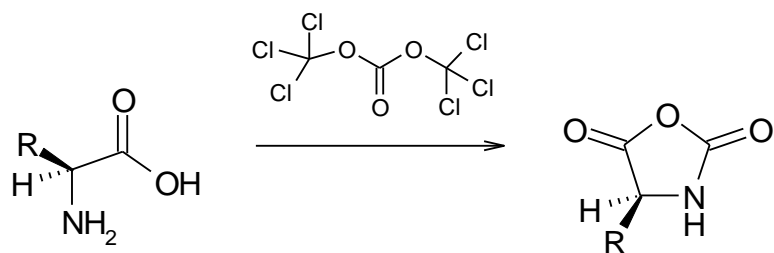


Schéma 12: Příprava *N*-karboxyanhydridů reakcí s trifosgenem

V případě přípravy poly(L-lysinového) řetězce jsou v literatuře popsány postupy, vycházející z *N*-karboxyanhydridu 6-benzyloxykarbonyl-L-lysinu. Jako iniciátor polymerace byl použit α,ω -diaminopoly(ethylenglykoly) o molekulové hmotnosti 10 000 (schéma 13). Poměr monomeru a iniciátoru (primárních aminoskupin přítomných v molekule α,ω -diaminopoly(ethylenglykoly)) byl v obou případech 20:1. K ochránění funkčních skupin přítomných v postranních řetězcích polyamidické části kopolymeru lze použít katalytické hydrogenace nebo kyselá hydrolyzy.³⁶

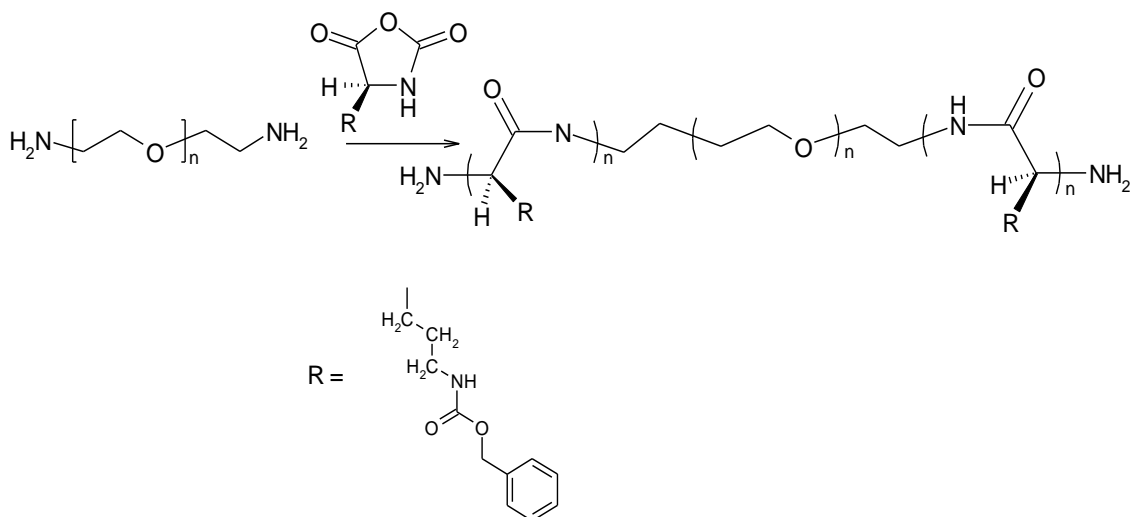


Schéma 13: Syntéza kopolymeru methoxy(polyethylenglykoly) a chráněného poly(L- α -lysinu)

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použité experimentální metody:

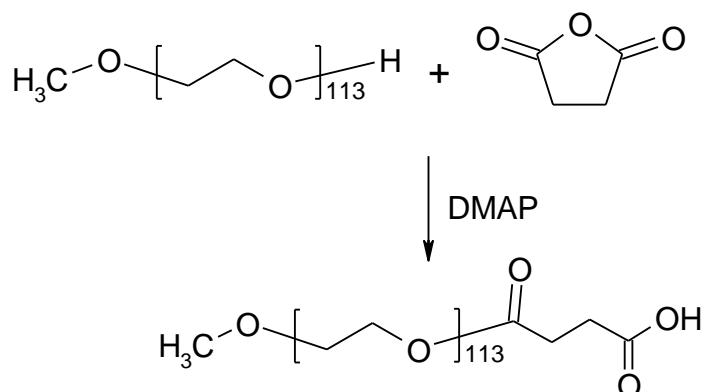
Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Fluka a použity bez čištění. Pyridin byl před použitím predestilován z molekulárního síta, dichlormethan byl destilován z CaH₂ v čas potřeby.

Měření IR spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET IMPACT 400, v tabletách 400 mg KBr s 0.7 mg vzorku. Vlnočet byl měřen v cm⁻¹.

NMR spektra všech látek byla měřena v roztocích CDCl₃ při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 (300 MHz). Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v *parts per million* (ppm). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, m: multiplet), integrální intenzita.

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na Silufolu UV 254 (Kavalier) s detekcí pod UV lampou a detekcí v parách jodu.

Syntetizovaný blokový kopolymer byl charakterizován gelovou permeační chromatografií (GPC), s použitím HEMA-BIO sloupců (hydrofilní modifikovaný HEMA-gel, velikost částic 10 μ m, porozita 40/100/300/1000) při pokojové teplotě, RI detektor a UV/VIS detektor. Jako eluent byla používána destilovaná voda o pH 7.1. Sloupce byly kalibrovány sérií standardů poly(ethylenglykolů) s různou molekulovou hmotností.

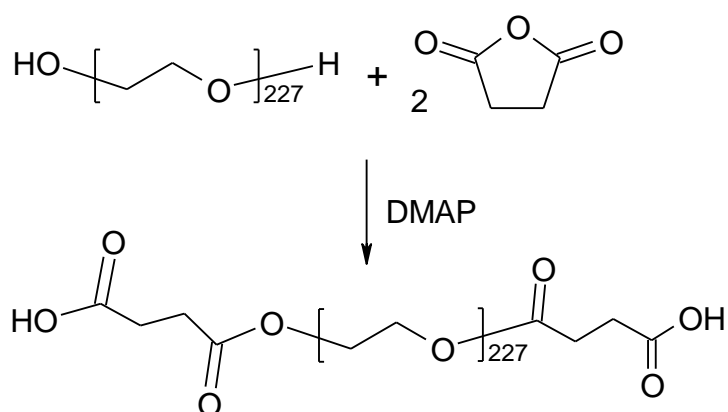
Příprava α -(3-karboxypropanoyl)- ω -methoxypoly(oxyethylenu)**Sumární vzorec:** $C_{231}H_{460}O_{117}$ **Molekulová hmotnost:** 5066,12**Schéma reakce:****Pracovní postup:**

Ve 250 ml baňce promyté argonem jsem ve 125 ml toluenu rozpustil 5 g (1 mmol) methoxypoly(ethylenglykolu), 0,5 g (5 mmol) sukcinanhydridu a 0,122 g (1 mmol) 4-dimethylaminopyridinu. Vakuovou destilací jsem odstranil rozpouštědlo. Vzniklý odparek jsem 6 hodin taval na olejové lázni při 150°C. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře argonu. Po ukončení reakce jsem taveninu rozpustil v dichlormethanu. K roztoku jsem přidal 30 μ l trifluoroctové kyseliny. Směs jsem přefiltroval a čirý filtrát jsem precipitoval 400 ml diethyletheru. Produkt jsem získal krystalizací z propan-2-olu. Poté jsem produkt vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 4,5 g produktu, což odpovídá 90 % teoretického výtěžku.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2,61 (t, 4H, $\text{OOC}-[\text{CH}_2]_2-\text{COO}$); 3,23 (s, 3H, CH_3-O); 3,28 – 3,84 (m, 450H, $[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_{113}$); 4,2 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OOC}$).

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1735, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α,ω -bis(3-karboxypropanoyl)poly(oxyethylenu)**Sumární vzorec:** $C_{462}H_{918}O_{234}$ **Molekulová hmotnost:** 10218,33

Schéma reakce:**Pracovní postup:**

Ve 250 ml baňce promyté argonem jsem ve 125 ml toluenu rozpustil 10 g (1 mmol) poly(ethylenglykolu), 0,5 g (5 mmol) sukcinanhydridu a 0,122 g (1 mmol) 4-dimethylaminopyridinu. Vakuovou destilací jsem odstranil rozpouštědlo. Vzniklý odparek jsem 9 hodin taval na olejové lázni při 150°C. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře, s vyloučením vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce jsem taveninu rozpustil v dichlormethanu. K roztoku jsem přidal 30 μ l trifluoroctové kyseliny. Směs jsem přefiltroval a čirý filtrát jsem precipitoval 400 ml diethyletheru. Produkt jsem získal krystalizací z propan-2-olu. Poté jsem produkt vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 8,7 g produktu, což odpovídá 87 % teoretického výtěžku.

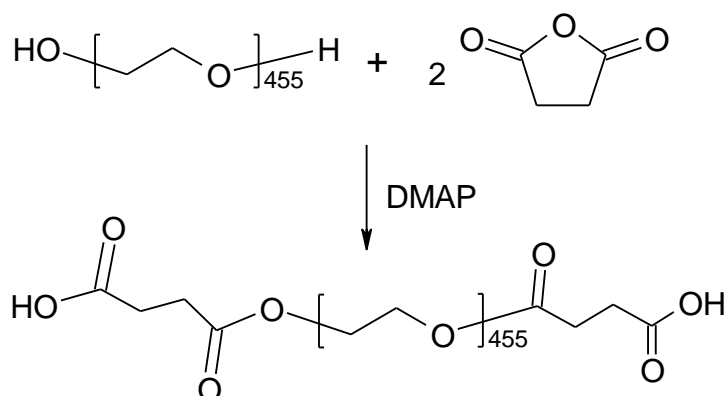
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 2,61 (t, 8H, OOC-[CH₂]₂-COO); 3,28-3,84 (m, 904H, [CH₂-CH₂-O]₂₂₇); 4,2 (t, 4H, -CH₂-OOC).

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1735, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α,ω -bis(3-karboxypropanoyl)poly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: C₉₁₈H₁₈₃₀O₄₆₂

Molekulová hmotnost: 20262,54

Schéma reakce:**Pracovní postup:**

Ve 250 ml baňce promyté argonem jsem ve 125 ml toluenu rozpustil 10 g (1 mmol) poly(ethylenglykolu), 0,5 g (5 mmol) sukcinanhydridu a 0,122 g (1 mmol) 4-dimethylaminopyridinu. Vakuovou destilací jsem odstranil rozpouštědlo. Vzniklý odparek jsem 12 hodin taval na olejové lázni při 150 °C. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře argonu. Po ukončení reakce jsem taveninu rozpustil v dichlormethanu. K roztoku jsem přidal 30 µl trifluoroctové kyseliny. Směs jsem přefiltroval a čirý filtrát jsem precipitoval 400 ml diethyletheru. Produkt jsem získal krystalizací z propan-2-olu. Poté jsem produkt vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 8,7 g produktu, což odpovídá 87 % teoretického výtěžku.

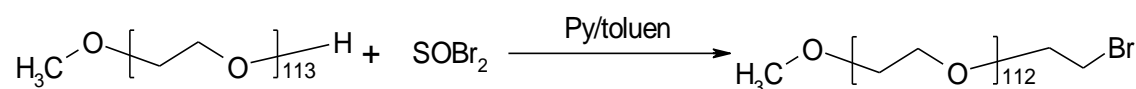
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2,61 (t, 8H, $\text{OOC}-[\text{CH}_2]_2-\text{COO}$); 3,28-3,84 (m, 1816H, $[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_{455}$); 4,2 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{OOC}$).

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1735, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -(2-bromethyl)- ω -methoxypoly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: $\text{C}_{227}\text{H}_{455}\text{BrO}_{113}$

Molekulová hmotnost: 5072,99

Schéma reakce:

Pracovní postup:

5 g (1 mmol) methoxypoly(ethylenglykolu) jsem rozpustil ve 100 ml toluenu. Azeotropickou destilací jsem odstranil 30 ml rozpouštědla, tak abych reakční směs zbavil vlhkosti. K roztoku jsem přidal 1 ml pyridinu a postupně přikapal 0,5 ml (6,5 mmol) thionylbromidu. Reakční směs jsem zahříval 6 hodin pod zpětným chladičem v inertní atmosféře, tak abych zabránil kontaktu se vzdušnou vlhkostí. Po ukončení reakce jsem destilací za sníženého tlaku odstranil rozpouštědlo. Odparek jsem rozpustil ve 30 ml dichlormethanu a roztok jsem zfiltraval. Filtrát jsem smísil se 400 ml diethyletheru, vzniklý precipitát jsem izoloval filtrací za sníženého tlaku. Takto získaný surový filtrát jsem čistil krystalizací z propan-2-olu. Produkt jsem vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 4,5 g produktu, což odpovídá 90% teoretického výtěžku.

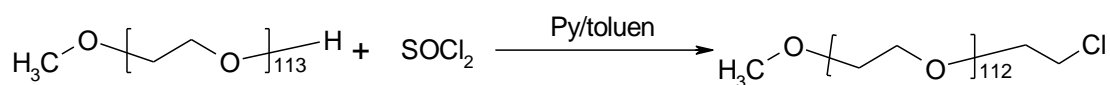
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,45 (t, 2H, CH_2), 3,62-3,72 (m, 448H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{112}$), 3,82 (t, 2, $\text{CH}_2\text{-Br}$).

IČ (KBr) ν : 3225, 2945, 2887, 2741, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -(2-chlorethyl)- ω -methoxypoly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: $\text{C}_{227}\text{H}_{455}\text{ClO}_{113}$

Molekulová hmotnost: 5072,99

Schéma reakce:**Pracovní postup:**

5 g (1 mmol) methoxypoly(ethylenglykolu) jsem rozpustil ve 100 ml toluenu. Azeotropickou destilací jsem odstranil 30 ml rozpouštědla, tak abych zbavil reakční směs zbytků vlhkosti. K roztoku jsem přidal 1 ml pyridinu a postupně přikapal 0,5 ml (6,5 mmol) thionylchloridu. Reakční směs jsem zahříval 6 hodin pod zpětným chladičem v inertní atmosféře argonu. Po ukončení reakce jsem destilací za sníženého tlaku odstranil rozpouštědlo. Odparek jsem rozpustil ve 30 ml dichlormethanu a roztok jsem zfiltraval. Filtrát

jsem smísil se 400 ml diethyletheru, vzniklý precipitát jsem izoloval filtrací za sníženého tlaku. Takto získaný surový filtrát jsem čistil krystalizací z propan-2-olu. Produkt jsem vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 4,6 g produktu, což odpovídá 92 % teoretického výtěžku.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,41 (t, 2H, CH_2), 3,62-3,72 (m, 448H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{112}$), 3,80 (t, 2, $\text{CH}_2\text{-Cl}$)

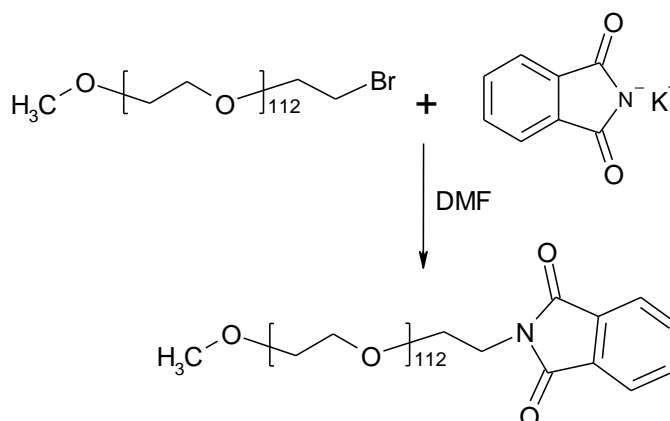
IČ (KBr) ν : 3225, 2945, 2887, 2741, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -[2-(1,3-dioxisoindolidin-2-yl)ethyl]- ω -methoxypoly(oxyethylenu) metoda A

Sumární vzorec: $\text{C}_{235}\text{H}_{459}\text{NO}_{115}$

Molekulová hmotnost: 5205,11

Schéma reakce:



Pracovní postup:

2 g (0,4 mmol) α -(2-bromethyl)- ω -methoxypoly(oxyethylenu) jsem rozpustil ve 100 ml DMF. K roztoku jsem přidal 0,52 g ftalimid-kalía (2,8 mmol). Reakční směs jsem zahříval na 120°C po dobu 6 hodin. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře, tak abych zabránil přístupu vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce jsem reakční směs zfiltraval a rozpouštědlo odpařil destilací za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustil v dichlormethanu a zfiltraval. Vzniklý roztok jsem precipitoval nadbytkem diethyletheru. Produkt jsem čistil krystalizací z ethanolu a vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 1,8 g produktu, což je 88 % teoretického výtěžku.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,45 (t, 2H, CH_2), 3,62-3,72 (m, 448H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{112}$); 3,82 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 7,61 (m, 2H-arom); 7,82 (m, 2H-arom).

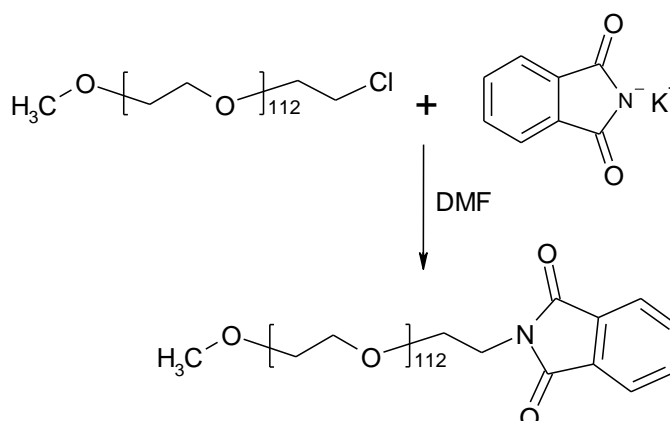
IČ (KBr) ν : 3225, 2945, 2887, 2741, 1773, 1715, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -[2-(1,3-dioxisoindolidin-2-yl)ethyl]- ω -methoxypoly(oxyethylenu), metoda B

Sumární vzorec: $\text{C}_{235}\text{H}_{459}\text{NO}_{115}$

Molekulová hmotnost: 5205,11

Schéma reakce:



Pracovní postup:

2 g (0,4 mmol) α -(2-chlorethyl)- ω -methoxypoly(oxyethylenu) jsem rozpustil ve 100 ml DMF. K roztoku jsem přidal 0,52 g ftalimid-kalia (2,8 mmol). Reakční směs jsem zahříval na 120°C po dobu 10 hodin. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře, s vyloučením vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce jsem reakční směs zfiltraval a rozpouštědlo odpařil destilací za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustil v dichlormethanu a zfiltraval. Vzniklý roztok jsem precipitoval nadbytkem diethyletheru. Produkt jsem čistil krystalizací z ethanolu a vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 1,9 g produktu, což je 95 % teoretického výtěžku.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,45 (t, 2H, CH_2), 3,62-3,72 (m, 448H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{112}$); 3,82 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 7,61 (m, 2H-arom); 7,82 (m; 2H-arom).

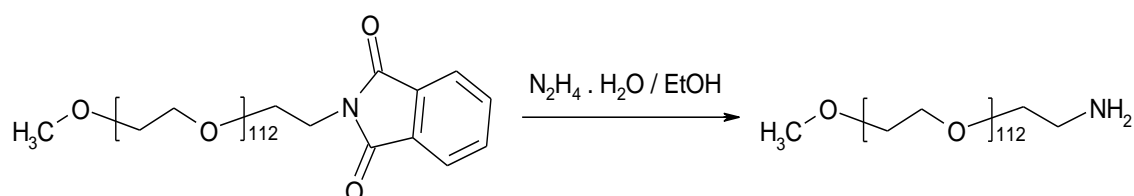
IČ (KBr) ν : 3225, 2945, 2887, 2741, 1773, 1715, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -(2-aminoethyl)- ω -methoxypoly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: C₂₂₇H₄₅₇NO₁₁₃

Molekulová hmotnost: 5009,11

Schéma reakce:



Pracovní postup:

1 g (0,2 mmol) α -[2-(1,3-dioxoisoindolidin-2-yl)ethyl]- ω -methoxypoly(oxyethylenu) jsem rozpustil v 30 ml ethanolu. Aparaturu jsem promyl proudem argonu. K roztoku polymeru v ethanolu jsem přidal 0,2 ml (4 mmol) hydrazin monohydrátu. Reakční směs jsem zahříval pod zpětným chladičem, v inertní argonové atmosféře, po dobu 5 hodin. Po ukončení reakce jsem rozpouštědlo odstranil destilací za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustil v dichlormethanu. Filtrací jsem odstranil nerozpustný podíl a filtrát jsem precipitoval nadbytkem diethyletheru. Získaný surový produkt jsem čistil krystalizací z propan-2-olu. Překrystalizovaný produkt jsem poté zbavil zbytků rozpouštědla sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 0,8 g, což je 80 % teoretického výtěžku reakce.

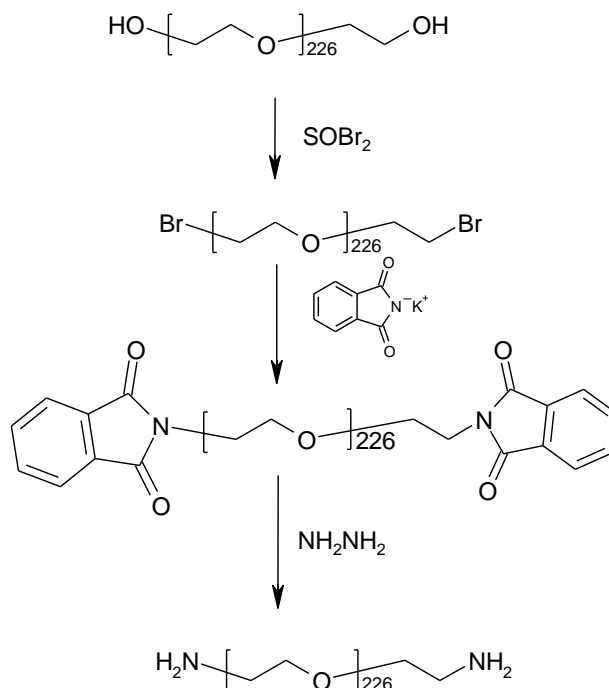
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 2,31 (s, 2H, NH); 3,23 (s, 3H, CH₃-O); 3,40 (t, 2H, CH₂-N), 3,62-3,72 (m, 448H, [CH₂-CH₂-O]₁₁₂); 3,92 (t, 2H, CH₂).

IČ (KBr) ν : 3446, 3225, 2945, 2887, 2741, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -(2-aminoethyl)- ω -aminopoly(oxyethylenu)Sumární vzorec: $C_{454}H_{912}N_2O_{226}$

Molekulová hmotnost: 10016,21

Schéma reakce:



Pracovní postup:

Příprava α -(2-bromethyl)- ω -brompoly(oxyethylenu)

10 g (1 mmol) poly(ethylenglykolu) jsem rozpustil ve 150 ml toluenu. Azetropickou destilací jsem odstranil 50 ml rozpouštědla, tak abych reakční směs zbavil vlhkosti. K roztoku jsem přidal 2 ml pyridinu a postupně přikapal 1 ml (13 mmol) thionylbromidu. Reakční směs jsem zahříval 10 hodin pod zpětným chladičem v inertní atmosféře, s vyloučením vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce jsem destilací za sníženého tlaku odstranil rozpouštědlo. Odparek jsem rozpustil ve 30 ml dichlormethanu a roztok jsem zfiltraval. Filtrát jsem smísil se 400 ml diethyletheru vzniklý precipitát jsem izoloval filtrací za sníženého tlaku. Takto získaný surový produkt jsem čistil krystalizací z propan-2-olu. Produkt jsem vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 9 g produktu, což odpovídá 90% teoretického výtěžku.

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 3,45 (t, 4H, $2 \times CH_2$), 3,62-3,72 (m, 900H, $[CH_2-CH_2-O]_{226}$), 3,82 (t, 4H, CH_2-Br).

IČ (KBr) ν : 3340, 3225, 2945, 2887, 2741, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

*Příprava α -[2-(1,3-dioxyindolin-2-yl)ethyl]- ω -(1,3-dioxoisindolin-2-yl)
poly(oxyethylenu)*

8,2 g (0,8 mmol) α -(2-bromethyl)- ω -brompoly(oxyethylenu) jsem rozpustil ve 100 ml DMF. K roztoku jsem přidal 2,08 g ftalimid-kalia (11,2 mmol). Reakční směs jsem zahříval na 120 °C po dobu 16 hodin. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře, tak abych zabránil přístupu vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce jsem reakční směs zfiltraval a rozpouštědlo odpařil destilací za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustil v dichlormethanu a zfiltraval. Vzniklý roztok jsem precipitoval nadbytkem diethyletheru. Produkt jsem čistil krystalizací z ethanolu a vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 7 g produktu, což je 85 % teoretického výtěžku.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,45 (t, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3,62-3,72 (m, 900H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{226}$); 3,82 (t, 4H, $2\times\text{CH}_2\text{-N}$); 7,61 (m, 4H-arom); 7,82 (m, 4H-arom).

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1743, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

*Hydrazinolýza α -[2-(1,3-dioxyindolin-2-yl)ethyl]- ω -(1,3-dioxoisindolin-2-yl)
poly(oxyethylenu)*

6 g (0,6 mmol) α -[2-(1,3-dioxyindolin-2-yl)ethyl]- ω -(1,3-dioxoisindolin-2-yl)poly(oxyethylenu) jsem rozpustil v 50 ml ethanolu. Aparaturu jsem promyl proudem argonu. K roztoku polymeru v ethanolu jsem přidal 1,2 ml (24 mmol) hydrazin monohydrátu. Reakční směs jsem zahříval pod zpětným chladičem, v inertní argonové atmosféře, po dobu 8 hodin. Po ukončení reakce jsem rozpouštědlo odstranil destilací za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustil v dichlormethanu. Filtrací jsem odstranil nerozpustný podíl a filtrát jsem precipitoval nadbytkem diethyletheru. Získaný surový produkt jsem čistil krystalizací z propan-2-olu. Překrystalizovaný produkt jsem poté zbavil zbytků rozpouštědla sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 1,7 g produktu, což je 85 % teoretického výtěžku reakce.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2,31 (s; 4H, NH); 3,40 (t; 4H, $2\times\text{CH}_2\text{-N}$), 3,62-3,72 (m; 900H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{226}$); 3,92 (t; 4H, $2\times\text{CH}_2$).

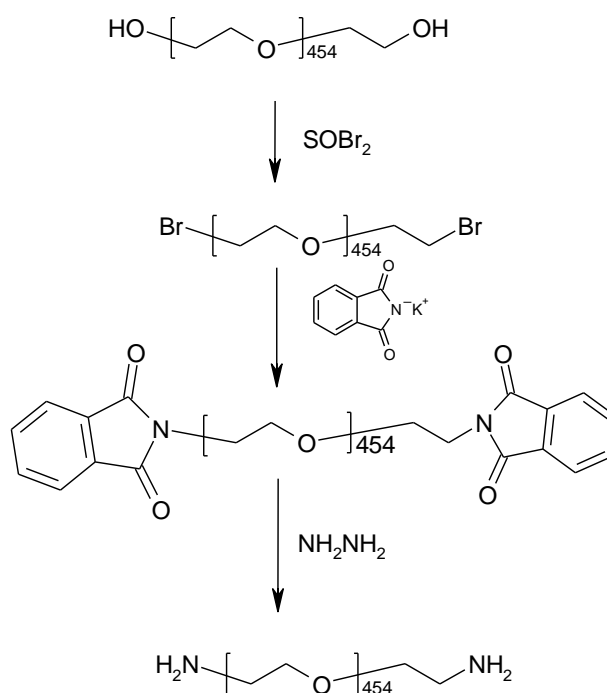
IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -(2-aminoethyl)- ω -aminopoly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: $C_{910}H_{1824}N_2O_{454}$

Molekulová hmotnost: 20060,42

Schéma reakce:



Pracovní postup:

Příprava α -(2-bromethyl)- ω -brompoly(oxyethylenu)

20 g (1 mmol) poly(ethylenglykolu) jsem rozpustil ve 150 ml toluenu. Azeotropickou destilací jsem odstranil 50 ml rozpouštědla, tak abych zbavil reakční směs vlhkosti. K roztoku jsem přidal 2 ml pyridinu a postupně přikapal 1 ml (13 mmol) thionylbromidu. Reakční směs jsem zahříval 15 hodin pod zpětným chladičem v inertní atmosféře. Po ukončení reakce jsem destilací za sníženého tlaku odstranil rozpouštědlo. Odparek jsem rozpustil ve 50 ml dichlormethanu a roztok jsem zfiltraval. Filtrát jsem smísil se 400 ml diethyletheru a vzniklý precipitát jsem izoloval filtrací za sníženého tlaku. Takto získaný surový produkt jsem čistil krystalizací z propan-2-olu. Produkt jsem vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti

a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 17 g produktu, což odpovídá 85% teoretického výtěžku.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,45 (t; 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3,62-3,72 (m; 1812H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{454}$); 3,82 (t; 4H, $2\times\text{CH}_2\text{-Br}$).

IČ (KBr) ν : 3225, 2945, 2887, 2741, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

*Příprava α -[2-(1,3-dioxyindolin-2-yl)ethyl]- ω -(1,3-dioxoisindolin-2-yl)
poly(oxyethylenu)*

16,2 g (0,8 mmol) α -(2-bromethyl)- ω -brompoly(oxyethylenu) jsem rozpustil ve 100 ml DMF. K roztoku jsem přidal 2,08 g ftalimid-kalia (11,2 mmol). Reakční směs jsem zahříval na 120°C po dobu 24 hodin. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře. Po ukončení reakce jsem reakční směs zfiltraval a rozpouštědlo odpařil destilací za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustil v dichlormethanu a zfiltraval. Vzniklý roztok jsem precipitoval nadbytkem diethyletheru. Produkt jsem čistil krystalizací z ethanolu a vysušil ve vakuu při laboratorní teplotě. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 14,6 g produktu, což je 90% teoretického výtěžku.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,45 (t; 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3,62-3,72 (m; 1812H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{454}$); 3,82 (t; 4H, $2\times\text{CH}_2\text{-N}$); 7,61 (m; 4H-arom); 7,82 (m; 4H-arom).

IČ (KBr): ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1743, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

*Hydrazinolýza α -[2-(1,3-dioxyindolin-2-yl)ethyl]- ω -(1,3-dioxoisindolin-2-yl)
poly(oxyethylenu)*

14 g (1,4 mmol) N,N'-[poly(ethylenglykol- α,ω -diyl)]bis(ftalimidu) jsem rozpustil v 50 ml ethanolu. Aparaturu jsem promyl proudem argonu. K roztoku polymeru v ethanolu jsem přidal 2,8 ml (56 mmol) hydrazin monohydrátu. Reakční směs jsem zahříval pod zpětným chladičem, v inertní argonové atmosféře, po dobu 8 hodin. Po ukončení reakce jsem rozpouštědlo odstranil destilací za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustil v dichlormethanu. Filtrací jsem odstranil nerozpustný podíl a filtrát jsem precipitoval nadbytkem diethyletheru. Získaný surový produkt jsem čistil krystalizací z propan-2-olu.

Překrystalizovaný produkt jsem poté zbavil zbytků rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 11,9 g, produktu což je 85 % teoretického výtěžku reakce.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2,31 (s, 4H, NH); 3,40 (t, 4H, $2\times\text{CH}_2\text{-N}$), 3,62-3,72 (m, 1812H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{454}$); 3,92 (t, 4H, $2\times\text{CH}_2$);

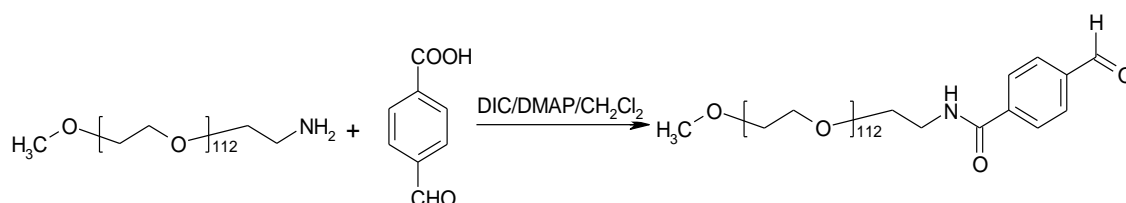
IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -[2-(4-formylbenzamido)ethyl]- ω -methoxypoly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: $\text{C}_{235}\text{H}_{461}\text{NO}_{115}$

Molekulová hmotnost: 5141,23

Schéma reakce:



5 g (1 mmol) α -(2-ethylamino)- ω -methoxypoly(ethylenglykolu), 0,6 g (4 mmol) 4-formylbenzoové kyseliny a 0,1 g (0,8 mmol) 4-dimethylaminopyridinu jsem rozpustil v 50 ml suchého dichlormethanu a vzniklý roztok ochladil na 0 °C. Během 10 minut jsem do reakční směsi přikapal vychlazený roztok 0,6 ml (4 mmol) *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna zahřáta na laboratorní teplotu. Po 24 h jsem odfiltroval *N,N'*-diisopropylmočovinu. Produkt jsem izoloval precipitací diethyletherem a čistil krystalizací z propan-2-olu. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 4,3 g produktu, což odpovídá 86 % teoretického výtěžku.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,36 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,52 – 4,27 (m, 452H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{113}$); 6,48 (m, H, NH-CO); 7,96 (d; $J=7.8$ Hz, 2H-arom); 8,22 (d; $J=7.8$ Hz, 2H-arom); 10,11 (s, 1H, CH=O).

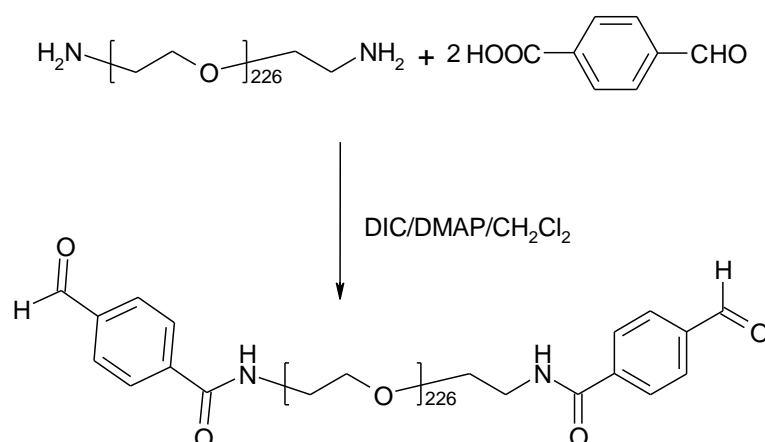
IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531 cm^{-1} .

Příprava α -[2-(4-formylbenzamido)ethyl]- ω -(4-formylbenzamido)poly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: C₄₇₀H₉₂₀N₂O₂₃₀

Molekulová hmotnost: 10280,45

Schéma reakce:



10 g (1 mmol) α -(2-aminoethyl)- ω -aminopoly(oxyethylenu), 1,2 g (8 mmol) 4-formylbenzoové kyseliny a 0,1 g (0,8 mmol) 4-dimethylaminopyridinu jsem rozpustil v 70 ml suchého dichlormethanu a vzniklý roztok ochladil na 0°C. Během 10 minut jsem do reakční směsi přikopal vychlazený roztok 1,2 ml (8 mmol) *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna zahřáta na laboratorní teplotu. Po 24 h jsem odfiltroval *N,N'*-diisopropylmočovinu. Produkt jsem precipitoval diethyletherem a čistil krystalizací z propan-2-olu. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 8,8 g produktu, což je 88 % teoretického výtěžku.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 3,52 – 4,27 (m; 908H, [CH₂-CH₂-O]₂₂₇); 6,48 (m; H, NH-CO); 7,96 (d; *J*=7.8 Hz, 4H-arom); 8,22 (d; *J*=7.8 Hz, 4H-arom); 10,11 (s; 2H, CH=O).

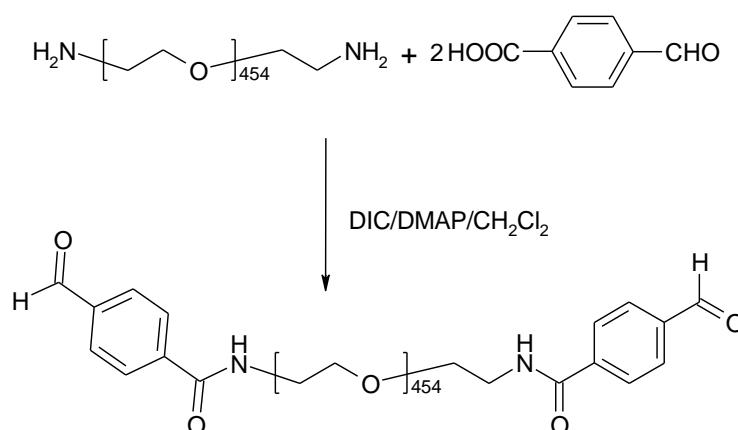
IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -[2-(4-formylbenzamido)ethyl]- ω -(4-formylbenzamido)poly(oxyethylenu)

Sumární vzorec: C₉₂₆H₁₈₃₂N₂O₄₅₈

Molekulová hmotnost: 20324,66

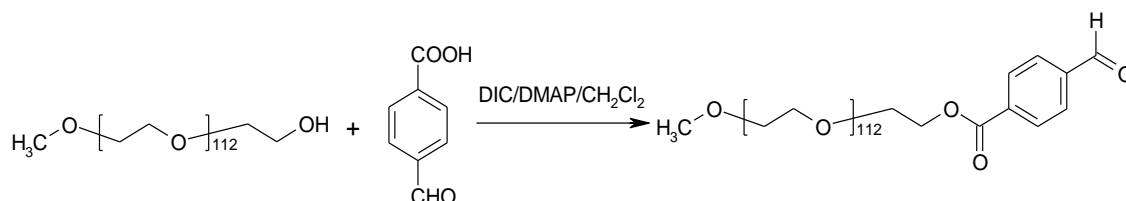
Schéma reakce:



20 g (1 mmol) α -(2-aminoethyl)- ω -aminopoly(oxyethylenu), 1,2 g (8 mmol) 4-formylbenzoové kyseliny a 0,1 g (0,8 mmol) 4-dimethylaminopyridinu jsem rozpustil v 70 ml suchého dichlormethanu a vzniklý roztok ochladil na 0°C. Během 10 minut jsem do reakční směsi přikapal vychlazený roztok 1,2 ml (8 mmol) *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna zahřáta na laboratorní teplotu. Po 24 h jsem odfiltroval *N,N'*-diisopropylmočovinu. Produkt jsem izoloval precipitací diethyletherem a čistil krystalizací z propan-2-olu. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 17,5 g produktu, což je 88 % teoretického výtěžku.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 3,52 – 4,27 (m; 1820H, [CH₂-CH₂-O]₄₅₅); 6.48 (m; H, NH-CO); 7.96 (d; *J*=7.8 Hz, 4H-arom); 8.22 (d; *J*=7.8 Hz, 4H-arom); 10.11 (s; 2H, CH=O).

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -[2-(4-formylbenzamido)ethyl]- ω -methoxypoly(ethylenglykolu)**Sumární vzorec:** C₂₃₅H₄₆₀O₁₁₆**Molekulová hmotnost:** 5142,22**Schéma reakce:**

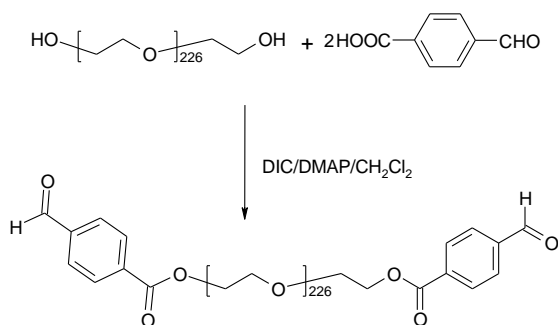
5 g (1 mmol) ω -methoxypoly(ethylenglykolu), 0,6 g (4 mmol) 4-formylbenzoové kyseliny a 0,1 g (0,8 mmol) 4-dimethylaminopyridinu jsem rozpustil v 50 ml suchého dichlormethanu a vzniklý roztok ochladil na 0 °C. Během 10 minut jsem do reakční směsi přikapal vychlazený roztok 1,2 ml (8 mmol) *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna zahřáta na laboratorní teplotu. Po 24 h byla odfiltrována *N,N'*-diisopropylmočovina. Produkt jsem izoloval precipitací diethyletherem a čistil krystalizací z propan-2-olu. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 4 g produktu, což odpovídá 80% teoretického výtěžku.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 3,36 (s; 3H, CH₃-O); 3,52 – 4,27 (m; 450H, [CH₂-CH₂-O]₁₁₂); 4,50 (m; 2H, CH₂-O-CO); 7,96 (d; *J*=7.8 Hz, 2H-arom); 8,22 (d; *J*=7.8 Hz, 2H-arom); 10,11 (s; 1H, CH=O).

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531

Příprava α -[2-(4-formylbenzamido)ethyl]- ω -(4-formylbenzamido)poly(oxyethylenu)**Sumární vzorec:** C₄₇₀H₉₁₈O₂₃₂**Molekulová hmotnost:** 10282,42

Schéma reakce:



10 g (1 mmol) poly(ethylenglykolu), 1,2 g (8 mmol) 4-formylbenzoové kyseliny a 0,1 g (0,8 mmol) 4-dimethylaminopyridinu jsem rozpustil v 70 ml suchého dichlormethanu a vzniklý roztok ochladil na 0°C. Během 10 minut jsem do reakční směsi přikapal vychlazený roztok 1,2 ml (8 mmol) *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna zahřáta na laboratorní teplotu. Po 48 h jsem odfiltroval *N,N'*-diisopropylmočovinu. Produkt jsem izoloval precipitací diethyletherem a čistil krystalizací z propan-2-olu. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Bylo získáno 9,2 g produktu, což odpovídá 92 % teoretického výtěžku.

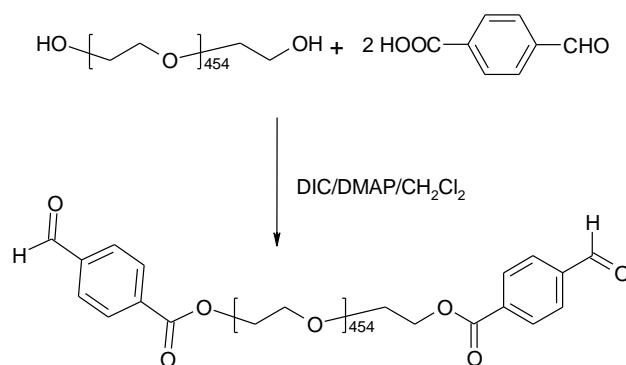
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,52 – 4,27 (m, 904H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{227}$); 4,50 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O-CO}$); 7,96 (d, $J=7,8$ Hz, 4H-arom); 8,22 (d, $J=7,8$ Hz, 4H-arom); 10,11 (s, 2H, CH=O).

IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531.

Příprava α -[2-(4-formylbenzamido)ethyl]- ω -(4-formylbenzamido)poly(ethylenglykolu)

Sumární vzorec: $\text{C}_{926}\text{H}_{1830}\text{O}_{460}$

Molekulová hmotnost: 20326,63

Schéma reakce:

20 g (1 mmol) poly(ethylenglykolu), 1,2 g (8 mmol) 4-formylbenzoové kyseliny a 0,1 g (0,8 mmol) 4-dimethylaminopyridinu jsem rozpustil v 70 ml suchého dichlormethanu a vzniklý roztok ochladil na 0°C. Během 10 minut jsem do reakční směsi přikapal vychlazený roztok 1,2 ml (8 mmol) *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu. Reakční směs byla míchána ještě 4 h při 0 °C a následně byla pozvolna zahřáta na laboratorní teplotu. Po 48 h byla odfiltrována *N,N'*-diisopropylmočovina. Produkt jsem izoloval precipitací diethyletherem a přečistil krystalizací z propan-2-olu. Dále jsem produkt zbavil zbytků vlhkosti a rozpouštědel sušením ve vakuu při laboratorní teplotě. Získal jsem 9,2 g produktu, což je 19 % teoretického výtěžku.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3,52 – 4,27 (m, 1816H, $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_{455}$); 4,50 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O-CO}$); 7,96 (d, $J=7,8$ Hz, 4H-arom); 8,22 (d, $J=7,8$ Hz, 4H-arom); 10,11 (s, 2H, CH=O).

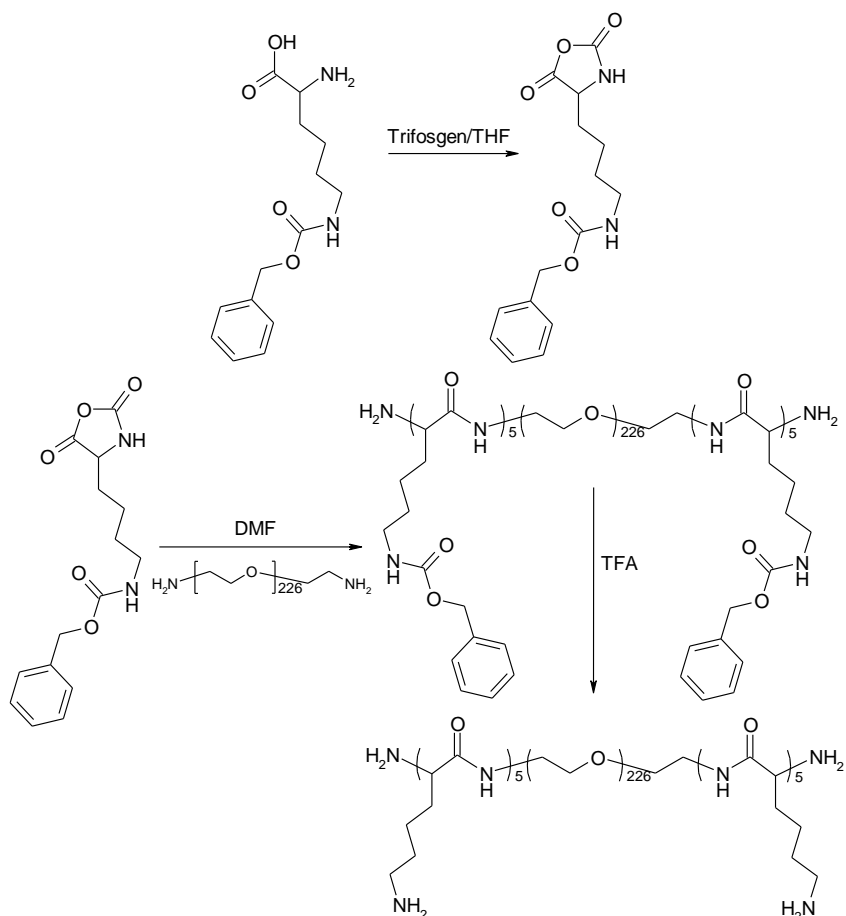
IČ (KBr) ν : 3439, 3225, 2945, 2887, 2741, 1701, 1693, 1467, 1360, 1343, 1280, 1201, 1149, 1110, 1061, 963, 843, 531

Příprava poly(L- α -lysin)-*b*-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L- α -lysinu)

Sumární vzorec: $\text{C}_{514}\text{H}_{1032}\text{N}_{22}\text{O}_{236}$

Molekulová hmotnost: 11297,96

Schéma reakce:



Pracovní postup:

1 g (3,6 mmol) α -(*N*-benzyloxycarbonyl)-L-lysinu jsem suspendoval v 30 ml tetrahydrofuranu. K suspenzi jsem přidal 0,5 g (1,8 mmol) trifosgenu. Reakční směs jsem zahříval po 1 hodinu na 40°C. Reakci jsem prováděl v inertní atmosféře argonu. Vzniklý *N*-karboxanhydrid α -(*N*-benzyloxycarbonyl)-L-lysinu jsem získal krystalizací ze směsi tetrahydrofuran/hexan. 1 g (0,1 mmol) α,ω -diaminopoly(ethylenglykolu) a 0,46 g (1,5 mmol) *N*-karboxanhydridu jsem rozpustil ve 20 ml *N,N*-dimethylformamidu. Reakční směs jsem 3 dny zahříval na 40°C s vyloučením vzdušné vlhkosti. Po ukončení reakce jsem vzniklý kopolymer izoloval precipitací diethyletherem. Produkt jsem čistil krystalizací z propan-2-olu. Takto připravený kopolymer jsem rozpustil v 30 ml směsi trifluoroctové a methansulfonové kyseliny. Po 1 hodině jsem reakční směs zředil

60 ml destilované vody a opakovaně vytřepal s etherem. Vodnou fází jsem poté zneutralizoval triethylaminem. Produkt jsem získal opakovanou extrakcí dichlormethanem. Roztok kopolymeru v dichlormethanu byl sušen nad žíhaným uhličitánem draselným. Produkt jsem izoloval precipitací etherem. Získal jsem 0,8 g poly(L- α -lysin)-*b*-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L- α -lysinu), což odpovídá 60% teoretického výtěžku. Produkt byl charakterizován IČ a GPC.

IČ (KBr) ν : 3339, 3114, 2942, 2866, 2337, 1852, 1814, 1783, 1657, 1630, 1537, 1455, 1258, 1139, 923, 748, 696, 693, 531.

GPC: $M_w/M_n = 1.16$.

6. DISKUZE

Ve své diplomové práci jsem se zabýval přípravou polymerních nosičů odvozených od poly(ethylenglykolu), využitelných v *drug delivery* systémech. Tato práce je součástí rozsáhlejšího výzkumu, který je zaměřen na přípravu nových konjugátů polyenových antibiotik s polymerními nosiči na bázi poly(ethylenglykolu). Podílel jsem se zejména na vypracování metodik pro zavedení reaktivních koncových skupin do molekuly poly(ethylenglykolu) a využití těchto postupů pro přípravu modifikovaných polymerů o různých molekulových hmotnostech. Dále jsem se věnoval přípravě blokových polymerů polyethylenglykol-*b*-poly(L-lysinu). Tyto blokové polymery sloužily dále jako výchozí sloučeniny pro přípravu dalších typů polymerních nosičů pro přípravu konjugátů s polyenovým antibiotikem - amfotericinem B.

První úkol, kterému jsem se věnoval bylo zavedení koncových karboxylových skupin do molekuly poly(ethylenglykolu). Pro řešení tohoto úkolu se nabízelo několik cest. Prvním možností byla oxidace koncové hydroxylové skupiny poly(ethylenglykolu) silnými oxidačními činidly jako je manganistan draselný v zásaditém prostředí, nebo oxid chromový v kyselém prostředí. Po prostudování literatury ovšem vyplynulo, že tato metoda není příliš spolehlivá a může vést ke štěpení řetězce polymeru. Druhým nabízejícím se způsobem byla reakce poly(ethylenglykolu) s estery brom- či chloroctové kyseliny v alkalickém prostředí. Problémem je v tomto případě zejména izolace produktu po posledním kroku – alkalické hydrolyze. Na stejný problém narážíme i u metody využívající reakci poly(ethylenglykolu) s akrylonitrilem, kde je posledním krokem hydrolyza koncové nitrilové slupiny. Jako nejschůdnější metoda se proto jevila reakce koncových hydroxylových skupin se sukcinanhydridem, která vede ke vzniku monoesteru kyseliny jantarové. Tuto reakci lze provádět dichlormethanu, při laboratorní teplotě za přítomnosti *p*-dimethylaminopyridinu jako katalyzátoru. V tomto případě jsou nevýhodou zejména dlouhé reakční časy, které dosahují až 55 hodin. K výraznému zkrácení reakčních časů došlo, pokud jsem směs poly(ethylenglykolu), sukcinanhydridu a *p*-dimethylaminopyridinu taval při 150°C. Reakci bylo nutné provádět s vyloučením vzdušné vlhkosti, v inertní atmosféře. Ani v případě použití poly(ethylenglykolů) o molekulových hmotnostech $M = 20\ 000$, nepřesáhly reakční časy 12 hodin.

Druhým úkolem při řešení mé diplomové práce byla esterifikace koncových skupin poly(ethylenglykolu) kyselinou 4-formylbenzoovou. Ta slouží jako aromatická spojka mezi molekulou nosiče a léčiva. Její aldehydická skupina umožňuje vazbu primárních aminoskupin léčiva prostřednictvím acidolabilní iminovazby.

Pro provedení této syntézy jsem zvolil metodu využívající *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu jako dehydratačního činidla. Princip reakce spočívá v tom, že reakcí karboxylové funkční skupiny 4-formylbenzoové kyseliny s *N,N'*-diisopropylkarbodiimidem vznikne *O*-(4-formylbenzoyl)-*N,N'*-diisopropylisourea, která v další fázi reakce působí jako acylační činidlo, které atakuje koncové hydroxylové skupiny poly(ethylenglykolu). Reakci jsem prováděl v dichlormethanu za vyloučení vzdušné vlhkosti v inertní atmosféře. Reakční časy se pohybovaly v závislosti na molekulové hmotnosti příslušného poly(ethylenglykolu) od 12 do 48 hodin. Tímto způsobem se mi podařilo připravit ester 4-formylbenzoové kyseliny s methoxypoly(ethylenglykolem) o molekulové hmotnosti $M = 5\ 000$ a s poly(ethylenglykoly) o molekulových hmotnostech $M = 10\ 000$ a $20\ 000$. Jednotlivé produkty byly charakterizovány pomocí IČ a ^1H NMR spektroskopie. Takto modifikované poly(ethylenglykoly) byly použity jako polymerní nosiče v konjugátech s amfotericinem B, kde molekula léčiva bylo připojena pomocí acidolabilní iminové vazby.

Dalším úkolem, na jehož řešení jsem se podílel, bylo vypracování metodiky pro zavedení koncových aminoskupin do molekuly poly(ethylenglykolu). V podstatě se jednalo o přípravu primárního aminu, a proto se nabízelo několik cest, jak tento problém vyřešit. Většina autorů využívá takový postup, kdy jsou koncové hydroxylové skupiny nejprve aktivovány pro nukleofilní atak převedením na dobře odstupující funkční skupiny. V praxi se nejčastěji jedná o přeměnu na bromid, chlorid popř. na estery sulfonových kyselin – mesylát či tosylát. Takto aktivovaný poly(ethylenglykol) je poté podroben reakci s nukleofilním činidlem. V tomto případě se jako nejjednodušší nabízí přímo reakce s amoniakem, která ovšem často vede ke vzniku vedlejších produktů, zejména sekundárních aminů. Další možností je reakce aktivovaného poly(ethylenglykolu) s azidem sodným, kdy primární amin získáme ze vzniklého alkylazidu katalytickou hydrogenací. Přeměnu koncové hydroxylové skupiny poly(ethylenglykolu) na aminoskupinu lze provést i klasickou metodou

organické chemie – Gabrielovou syntézou. pro zavedení koncových aminoskupin do molekuly poly(ethylenglykolu). Tuto metodu jsem zvolil zejména s ohledem na bezpečnost práce v porovnání se zpracováním azidů.

Pro vypracování metodiky jsem jako výchozí polymer zvolil methoxypoly(ethylenglykol) o molekulové hmotnosti $M = 5000$.

Prvním krokem této syntézy bylo převedení hydroxylových skupin polymeru na halogenid. Nabízely se dvě možnosti a to příprava chlor- či bromderivátu methoxypoly(ethylenglykolu).

Pro příprava bromderivátu jsem využíval reakci methoxypoly(ethylenglykolu) s thionylbromidem v přítomnosti pyridinu v prostředí toluenu. Pro úspěšné provedení reakce je nezbytné chránit reakční směs před vzdušnou vlhkostí. Proto jsem veškeré reakční kroky prováděl s využitím inertní atmosféry argonu. Thionylbromid dává reakcí s vodou vzniknout bromovodíku, který je schopen štěpit etherové vazby v molekule poly(ethylenglykolu), což vede k nežádoucímu vzniku polymerních řetězců o menší molekulové hmotnosti.

Pro přípravu chlorderivátu methoxypoly(ethylenglykolu) jsem jako činidla využíval thionylchlorid v prostředí toluenu, opět s využitím pyridinu jako baze. Reakce musela být také prováděna v inertní atmosféře, za vyloučení vzdušné vlhkosti. Za podmínek reakce sice nedochází ke štěpení etherových vazeb chlorovodíkem, na druhou stranu chloridové anionty jsou v porovnání s bromidovými anionty relativně hůře odstupující skupina, což mohlo mít vliv na průběh na další kroky celé syntézy.

Tímto krokem byla reakce připravených halogenderivátů methoxypoly(ethylenglykolu) s ftalimidem-kaliem. Tuto reakci jsem prováděl zahřívání pod zpětným chladičem v prostředí *N,N*-dimethylformamidu, v inertní atmosféře s vyloučením vzdušné vlhkosti. Po izolaci produktu byla provedena jeho analýza pomocí ^1H NMR spektroskopie na jejímž základě byl určen stupeň konverze funkční skupiny. Na základě této analýzy jsem zjistil, že jak v případě použití bromderivátu, tak v případě chlorderivátu probíhala substituce ftalimidem z 90%. Pokud jsem jako výchozí látku využíval bromderivát methoxypoly(ethylenglykolu), byl reakční čas potřebný k proběhnutí reakce 6 hodin. K dosažení podobných výsledků s využitím chlorderivátu methoxypoly(ethylenglykolu) bylo nutné reakční čas prodloužit na 10 hodin.

Jako poslední krok této syntézy jsem prováděl hydrazinolýzu vzniklého N' -substituovaného ftalimidu. Jako činidlo jsem v této reakci využíval hydrazin monohydrát a reakci jsem prováděl v prostředí bezvodého ethanolu. Reakční směs byla zahřívána 6 hodin pod zpětným chladičem v inertní atmosféře argonu. Získaný α -amino- ω -methoxypoly(ethylenglykol) byl charakterizován pomocí ^1H NMR, IČ spektroskopie.

Poznatky, které jsem získal při přípravě α -amino- ω -methoxypoly(ethylenglykolu) o molekulové hmotnosti $M = 5\,000$, jsem využil při přípravě α,ω -diaminopoly(ethylenglykolů) o molekulových hmotnostech $M = 10\,000$ a $20\,000$. Přestože jsem na základě předešlých zjištění vycházel z reaktivnějšího bromderivátu, bylo vzhledem k velkým molekulovým hmotnostem nutné přistoupit k několikanásobnému prodloužení reakčních časů, a to ve všech stupních syntézy. Touto metodou jsem připravil α,ω -diaminopoly(ethylenglykoly) o molekulových hmotnostech $M = 10\,000$ a $20\,000$.

Takto připravené poly(ethylenglykoly) s koncovými aminoskupinami jsem poté využil k přípravě amidů 4-formylbenzoové kyseliny. Při přípravě těchto derivátů poly(ethylenglykolu) jsem postupoval analogicky jako při přípravě esterů 4-formylbenzoové kyseliny a poly(ethylenglykolu). Rovněž jsem využil metodu používající N,N' -diisopropylkarbodiimid jako dehydratační činidlo. Touto metodou jsem připravil amid 4-formylbenzoové kyseliny s α -amino- ω -methoxypoly(ethylenglykolem) o molekulové hmotnosti $M = 5\,000$ a α,ω -diaminopoly(ethylenglykoly) o molekulových hmotnostech $M = 10\,000$ a $20\,000$. Jednotlivé produkty byly charakterizovány pomocí IČ a ^1H NMR spektroskopie. Takto modifikované poly(ethylenglykoly) byly použity jako polymerní nosiče v konjugátech poly(ethylenglykolů) a amfotericinu B, kde molekula léčiva bylo připojena pomocí acidolabilní iminové vazby.³⁷

Posledním úkolem, jehož řešením jsem se zabýval při vypracování mé diplomové práce byla příprava triblokového kopolymeru poly(L- α -lysin)-*b*-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L- α -lysin). Pro přípravu tohoto blokového polymeru jsem využil tzv. *ring-opening* polymeraci N -karboxyanhydridu ε -benzyloxykarbonyl-L- α -lysinu.

Příprava N -karboxyanhydridu ε -benzyloxykarbonyl-L- α -lysinu probíhala jeho reakcí s trifosgenem. Reakce jsem prováděl při 50°C v prostředí tetrahydrofuranu. Reakční směs bylo nutné ochránit před působením vzdušné

vlhkosti, a proto jsem reakci prováděl v inertní atmosféře. Reakční čas nutný k provedení reakce byl 1 hodina. Reakce probíhala kvantitativně, izolovaný produkt byl charakterizován pomocí IČ a ^1H NMR spektroskopie. Na IČ spektru byly dobře viditelné zejména absorpční pásy 1880 cm^{-1} a 1790 cm^{-1} , které jsou charakteristické pro karbonylové dvojně vazby v pětičlenném kruhu *N*-karboxyanhydridu.

Jako iniciátory polymerace jsem použil α,ω -diaminopoly(ethylenglykoly) o molekulových hmotnostech $M = 10\ 000$ a $20\ 000$. Poměr monomeru a iniciátoru (primárních aminoskupin přítomných molekul α,ω -diaminopoly(ethylenglykolů)) byl v obou případech 20:1. Reakce jsem prováděl v tetrahydrofuranu s vyloučením vzdušné vlhkosti v inertní atmosféře. Reakční směs jsem zahříval na 40°C s vyloučením vzdušné vlhkosti po dobu tří dnů. Odchránění primárních aminoskupin v postranním řetězci lysinu jsem provedl reakcí se směsí kyselin trifluoroctové a methansulfonové. Podařilo se mi připravit triblokový kopolymer poly(L- α -lysin)-*b*-poly(ethylenglykol)-*b*-poly(L- α -lysinu), který obsahoval dva oligopeptidové řetězce obsahující pět jednotek lysinu. Kopolymer byl charakterizován pomocí NMR a IČ spektroskopie a dále gelovou permeační chromatografií.

Takto připravený blokový kopolymer byl dále využit při přípravě nového konjugátu amfotericinu B.³⁸

7. ZÁVĚR

Cílem mojí diplomové práce byla příprava modifikovaných poly(ethylenglykolů) jako nosičů léčiv. Nejdříve byl připraven methoxypoly(ethylenglykol) s koncovou karboxylovou, amino- a aldehydickou skupinou o molekulové hmotnosti 5 000. Na základě získaných zkušeností byla vypracována metodika pro přípravu analogických derivátů o molekulových hmotnostech 10 000 a 20 000. Látky budou využity pro tvorbu nosičů pro polyenové antibiotikum amfotericin B.

Syntetizoval jsem také blokový trikopolymer poly(L- α -lysinu)-*b*-poly(ethylenglykolu)-*b*-poly(L- α -lysinu) s využitím poly(ethylenglykolu) o $M = 10\,000$. Rovněž tato látka bude využita pro tvorbu nosiče s amfotericinem B.

Všechny látky byly charakterizovány IČ a ^1H NMR spektroskopií, s výjimkou kopolymeru, jehož stupeň polydisperzity byl stanoven GPC chromatografií.

8. LITERATURA

- 1 Veronese F M, Morpurgo M: Bioconjugation in pharmaceutical chemistry, *Farmaco* 54: 497-516, **1999**
- 2 Bhadra D, Bhadra S: Pegnology: A review of PEG-nylated systems, *Pharmazie* 57: 5-29, **2002**
- 3 Ulbrich K, Šubr V: Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1023-1050, **2004**
- 4 Duncan R, Gac-Breton S, Keane R et al.: Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic, *J. Control. Release* 74: 135-146, **2001**
- 5 Greenwald R B, Choe Y H, McGuire J, Conover Ch D: Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 217–250, **2003**
- 6 Harris J M: Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol). In: *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry*, Harris J M (ed.), New York: Plenum Press, **1992**, p. 1-12
- 7 Sedlák M: Recent advances in chemistry and applications of substituted poly(ethylene glycol)s, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70: 269-291, **2005**
- 8 Soyez H, Schacht E, Vanderkerken S: The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21: 81-106, **1996**
- 9 Zalipsky S, Gilon C, Zilkha A. Attachment of drugs to poly(ethylene glycol)s, *Eur. Polym. J.* 19: 1177–1183, **1983**
- 10 Haber J: Současný stav a perspektivy antimykotik se systémovým účinkem, *Čas. Čes. Lék.* 19: 596–604, **2001**
- 11 Zotchev S B: Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy, *Curr. Med. Chem.* 10: 211–223, **2003**
- 12 Zhao X, Calderone R A: Antifungals currently used in the treatment of invasive fungal diseases. In: *Fungal Pathogenesis - Principles and Clinical Applications*, Calderone R A, Cihlar R L (eds.), New York: Marcel Dekker, **2002**, p. 559-577

- 13 Barrett J P, Vardulaki K A, Conlon C, Cooke J, Daza-Ramirez, P, Evans E G V, Hawkey P M, Herbrecht R, Marks D I, Moraleda J M, Park G R, Senn S J, Viscoli C: A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations, *Clin. Ther.* 25, 1295-1320, **2003**
- 14 Dupont, B: Overview of the lipid formulations of amphotericin B, *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 31-36, **2002**
- 15 Sedlák M, Buchta V, Kubicová L, Šimůnek P, Holčapek M, Kašparová P: Synthesis and characterisation of a new amphotericin B-methoxypoly(ethylene glycol) conjugate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2833-2835, **2001**
- 16 Conover Ch D, Zhao H, Longley C B, Shum K L, Greenwald R B: Utility of poly(ethylene glycol) conjugation to create prodrugs of amphotericin B, *Bioconj. Chem.* 14: 661-666, **2003**
- 17 Ehrenfreund-Kleinman T, Azzam T, Falk R, Polacheck I, Golenser J, Domb A J: Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B-arabinogalactan conjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 217-250, **2003**
- 18 Beneš F, Čefelín P, Kahovec J: Grafické znázornění makromolekul, *Chem. Listy* 95: 112-122, **2001**.
- 19 Khandare J, Minko T: Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs, *Prog. Polym. Sci.* 31: 359-397, **2006**
- 20 Schlaad H, Antonietti M: Block copolymers with amino acid sequences: Molecular chimeras of polypeptides and synthetic polymers, *Eur. Phys. J. E* 10, 17-23, **2003**
- 21 Pechar M, Ulbrich K, Šubr V: Poly(ethylene glycol) multiblock copolymer as a carrier of anti-cancer drug doxorubicin, *Bioconj. Chem.* 11: 131-139, **2000**
- 22 Adams M L, Lavasanafir A, Kwon G S: Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 92, 1343-1355, **2003**
- 23 Lavasanafir A, Samuel J, Kwon G S: Poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 169-190. **2002**
- 24 Pechar M, Strohalm J, Ulbrich K, Schacht E: Biodegradable drug carriers based on poly(ethylene glycol) block copolymers, *Macromol. Chem. Phys.* 198: 1009-1020, **1997**

- 25 Lavasanifar A, Samuel J, Kwon G S: The effect of fatty acid substitution on the in vitro release of amphotericin B from micelles composed of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl stearate-L-aspartamide), *J. Control. Release* 79: 165–172, **2002**
- 26 Kwon G S, Naito M, Kataoka K, Yokoyama M, Sakurai Y, Okano T: Block copolymer micelles as vehicles for hydrophobic drugs, *Colloid Surfaces B. 2*: 429–434, **1994**
- 27 Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, Okamoto K, Kwon G S: Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(γ -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance, *J. Control. Release*, 64: 143–153, **2000**
- 28 Royer G P, Anantharmaiah G M: Peptide-synthesis in water and the use of immobilized carboxypeptidase-Y for deprotection, *J. Amer. Chem. Soc.* 101: 3394-3396, **1979**
- 29 Braunová A, Pechar M, Ulbrich K: Degradation behavior of poly(ethylene glycol) diblock and multiblock polymers with hydrolytically degradable ester linkages, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69: 1643-1656, **2004**
- 30 Loccufier J, Crommen J, Vandorpe J, Schacht E: End-group modification of α -hydro- ω -methoxypoly(oxyethylene), *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 12: 159–165, **1991**
- 31 Mongondry P, Bonnans-Plaisance C, Jean M, Tassin J F: Mild synthesis of amino-poly(ethylene glycol)s. Application to steric stabilization of clays, *Macromol. Rapid Commun.* 24: 681-685, **2003**
- 32 Linayong W, Shenguo W, Jian Z B: Synthesis and characterization of macroinitiator-amino terminated PEG and poly(γ -benzyl-L-glutamate)-PEO-poly(γ -benzyl-L-glutamate) triblock copolymer, *Polym. Adv. Technol.*, 15: 617–621, **2004**
- 33 Pillai VNR, Mutter M, Bayer E, Gatfield I: New, easily removable poly(ethylene glycol) supports for the liquid phase method of peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, 45: 5364–5370, **1988**
- 34 Deming T J: Facile synthesis of block copolypeptides of defined structure, *Nature* 390: 386-389, **1997**
- 35 Mathias L J: Esterification and alkylation reactions employing isoureas, *Synthesis (Stuttgart)* 8: 561-576, **1979**

- 36 Thünemann A F: Poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-lysine) complexes with retinoic acid, *Macromolecules* 33: 5906-5911, **2000**
- 37 Sedlák M, Pravda M, Štaud F, Kubicová L, Týčová K, Ventura K: Synthesis of pH-sensitive amphotericin B-poly(ethylene glycol) conjugates and study of their controlled release in vitro, *Bioorg. Med. Chem.*, 15: 4069-4067, **2007**
- 38 Sedlák M, Pravda M, Kubicová L, Mikulčíková P, Ventura K: Synthesis and characterisation of a new pH-sensitive amphotericin B-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) conjugate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17: 2554-2557, **2007**