

*Institut für Organische Chemie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz,
D-65 Mainz und

**Institut für Pharmakologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz,
D-65 Mainz

Pharmakologisch aktive Polymere, 14^{*)**)}

Modellsysteme zur Untersuchung der Abspaltung niedermolekularer Komponenten von polymeren Pharmaka

Karl Joachim Netter**, Helmut Ringsdorf*, Hans-Christof Wilk*

Herrn Prof. Dr. K. Hamann zum 70. Geburtstag gewidmet

(Eingangsdatum: 5. Februar 1976)

ZUSAMMENFASSUNG:

Es wurden Polymere dargestellt, in denen 4-Biphenylamino-, *N*-(4-Sulfamoylphenylazophenyl)amino- und 4-Sulfamoylphenylazophenylazoxy-Gruppen entweder direkt oder über eine ionische Spacergruppe kovalent an die Polymerkette gebunden sind. Die polymeren 4-Biphenylamino-Derivate wurden als Modellsubstanzen zur Messung der Abspaltungsgeschwindigkeit von Pharmaka *in vitro* und nach intraperitonealer Applikation bei Ratten pharmakologisch untersucht.

SUMMARY:

4-Biphenylamino, *N*-(4-sulfamoylphenylazophenyl)amino, or 4-sulfamoylphenylazoxy groups were fixed covalently to polymeric backbones either directly or via ionic spacer groups. The polymeric 4-biphenylamino derivatives were used as model substances to study pharmacologically the rate of release of drugs *in vitro* and after intraperitoneal application in rats.

Einleitung

Von kovalent an Polymere gebundenen Pharmaka ist eine Langzeitwirkung durch verzögerte Wirkstoffabgabe zu erwarten, wie bereits 1955 von Jatzke-

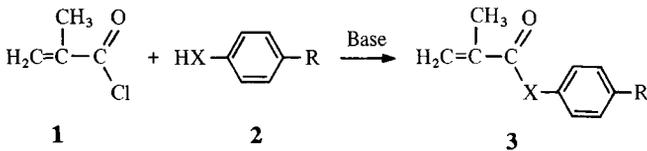
*) 13. Mitteilung: cf.²⁾

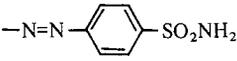
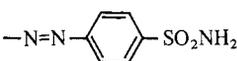
***) Teil der Dipl.-Arbeit von *H.-Ch. Wilk*, Universität Mainz 1974.

witz¹⁾ gezeigt wurde. Im Rahmen von Untersuchungen über pharmakologisch aktive Polymere²⁾ wurden Polymethacrylsäure-Derivate mit 4-Biphenylylamino-, *N*-(4-Sulfamoylphenylazophenyl)amino- und 4-Sulfamoylphenylazophenoxy-Gruppen (**2a-c**) synthetisiert. Diese Gruppen wurden sowohl direkt als auch über einen Abstandshalter (Spacer) an die Polymerkette fixiert. Sie dienen als Modelle zur Untersuchung der Abspaltung niedermolekularer Komponenten von polymeren Pharmaka, wozu sie auf Grund ihrer leichten UV-spektroskopischen Nachweisbarkeit ausgewählt wurden. 4-Biphenylylamin ist carcinogen^{3,4)} und deshalb hinsichtlich seines Metabolismus gut untersucht⁵⁾. Die beiden Sulfamoylphenylazo-Derivate sind pharmakologisch aktiv⁶⁾.

Synthese der Monomeren und Polymeren

Zur Synthese der direktgebundenen Methacrylsäure-Derivate **3a-c** wurden die Ausgangsverbindungen **2a-c** in Gegenwart von Basen (z. B. Triäthylamin) mit Methacrylsäurechlorid (**1**) umgesetzt:

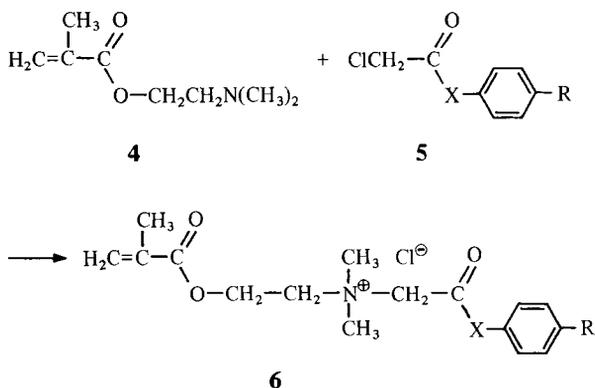


	X	R
2a, 3a	NH	C ₆ H ₅
b	NH	
c	O	

Durch Quarternisierung von 2-Dimethylaminoäthylmethacrylat (**4**) mit den in gleicher Weise durch Umsetzen mit Chloressigsäure dargestellten Chloracetyl-Derivaten **5a-c**, entstanden die polymerisationsfähigen Monomeren **6a-c**^{*)} mit Spacergruppen.

Die Charakterisierung der neuen Monomeren erfolgte durch IR- und NMR-Spektroskopie sowie durch Elementaranalyse. Die Ergebnisse sind in den Tabn. 1 und 2 zusammengefaßt.

^{*)} **6c** liegt nach Aufarbeitung durch HCl-Abspaltung als inneres Salz vor.



	X	R
5a, 6a	NH	C ₆ H ₅
b	NH	-N=N-  -SO ₂ NH ₂
c	O	-N=N-  -SO ₂ NH ₂

Die genannten Monomeren sind in Lösung bei 60°C radikalisch polymerisierbar. Zur pharmakologischen Untersuchung wurden wasserlösliche Produkte hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die Verbindungen **3a–c** und **6a** mit 2-Methylsulfinyläthylmethacrylat (**7**)⁷⁾ copolymerisiert. Als Initiator diente 2,2'-Azobisobutyronitril. Die Zusammensetzung der Copolymeren wurde UV-spektroskopisch ermittelt.

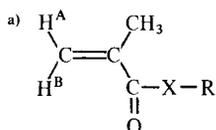
Um die Brauchbarkeit des Modellsystems zu erproben, wurden die 4-Biphenylamino-Gruppen enthaltenden Polymeren ersten pharmakologischen Tests unterzogen.

Diskussion der pharmakologischen Ergebnisse

Die Abspaltung der Modellsubstanzen wurde sowohl „in vitro“ als auch „in vivo“ untersucht. „In vitro“, d. h. nach Inkubation⁸⁾ mit Leberhomogenat (Ratte), Lebermikrosomen (Ratte) und Serum (Mensch) konnte nach 60 min

Tab. 1. Charakterisierung der Monomeren

Mono- meres	Schmp in °C	Ausb. in %	IR-Absorpt. $\nu_{C=O}/\text{cm}^{-1}$	NMR-Signale in ppm ^{a)}	
				H ^A	H ^B
3a	160 ^{b)}	72	1660	5,73	5,39
3b	302	40	1655	5,87	5,58
3c	255	71	1730	6,16	5,78
6a	88 ^{c)}	46	1685 ^{d)}	6,12	5,59
6b	236	36	1670 ^{d)}	6,06	5,61
6c	232 ^{e)}	26	1720	6,00	5,64

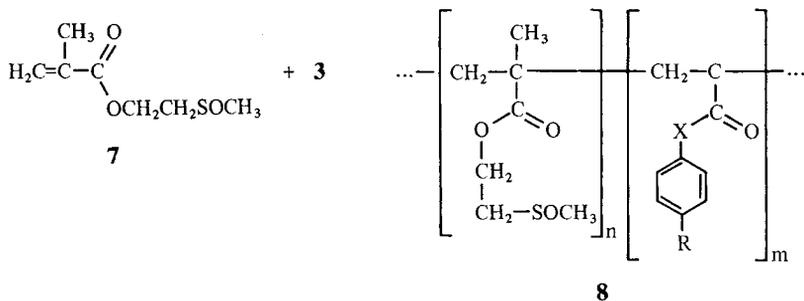


b) Lit.: Schmp 159°C⁹⁾.

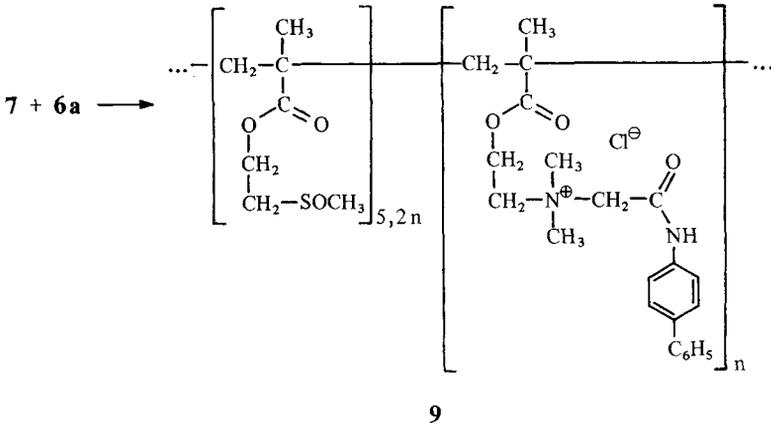
c) Zers.-P.

d) CO-Schwingung der Estergruppe.

e) Spaltet bei Aufarbeitung HCl ab und liegt als inneres Salz vor.



	X	R	n/m
8a	NH	C ₆ H ₅	10,5
b	NH	-N=N--SO ₂ NH ₂	9,3
c	O	-N=N--SO ₂ NH ₂	7,6



Inkubationszeit keine Abspaltung der niedermolekularen Komponenten vom Polymeren UV-spektroskopisch nachgewiesen werden. Demgegenüber waren bei „in vivo“ Versuchen, d. h. nach intraperitonealer Injektion, abgespaltenes 4-Biphenylamin und dessen Metaboliten noch nach 8 Tagen im Urin von Albinoratten feststellbar (vgl. Exp. Teil). Aussagen über die Struktur der ausgeschiedenen und UV-spektroskopisch nachgewiesenen Metaboliten waren im Rahmen dieser Untersuchungen nicht erstrebt. Abb. 1 zeigt die Absorptionswerte in Abhängigkeit von der Zeit.

Unter Vernachlässigung der unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der Metaboliten errechnet man die Menge an insgesamt wiedergefundenem freiem 4-Biphenylamin zu weniger als 10% der eingesetzten polymergebundenen Substanzmenge. Im Vergleich dazu scheiden Tiere, die ungebundenes 4-Biphe-

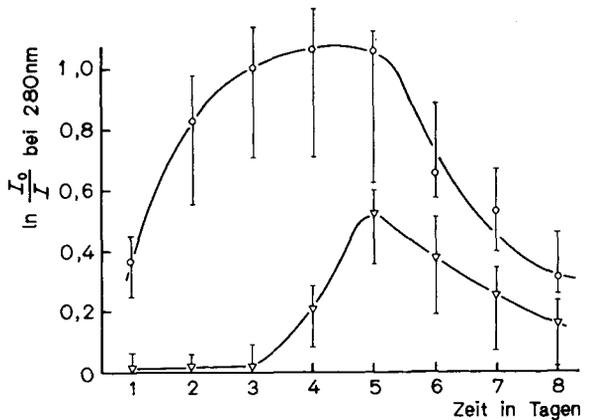


Abb. 1. Ausscheidung von 4-Biphenylamin und Metaboliten, ermittelt aus der UV-Absorption (bei 280 nm) der Hexanextrakte des Urins. (∇): Nach Verabreichung von Substanz 8a; (○): nach Verabreichung von 9

nylamin in Olivenöl erhalten haben, in 3 Tagen etwa 80% der verabreichten Dosis aus. Demnach ist eine deutliche Ausscheidungsverzögerung feststellbar wobei der Ammoniumspacer die Abspaltung beträchtlich erleichtert. A Grund der Stabilität von **8a** und **9** gegen Hydrolyse bei 37°C und einen pH-Wert von 7,4 scheint eine enzymatische Abspaltung vorzuliegen. Der Abfall der Nachweisbarkeit der Modells-substanzen nach 5–7 Tagen für beide Substanzen läßt sich als inaktive Ablagerung ohne weiteren Stoffwechsel oder als Ausscheidung der Polymeren deuten.

Untersuchungen über die sulfonamidhaltigen Systeme sind im Gange.

Experimenteller Teil

Synthese der Monomeren

Ausb. und spektroskopische Daten der Monomeren s. Tab. 1; Analysenwerte s. Tab. 2. Optimierung der Versuchsbedingungen und Ausbeuten war nicht beabsichtigt.

N-(4-Biphenyl)methacrylamid (**3a**): 5,1 g 4-Biphenylamin (0,03 mol) und 4,5 g destilliertes Triäthylamin (0,045 mol) wurden in 100 ml Methylenchlorid gelöst und auf 0°C gekühlt. 4,0 g (0,04 mol) Methacrylsäurechlorid in 50 ml Methylenchlorid wurden innerhalb von 90 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemp. belassen. Zur Aufarbeitung wurde mit ca. 4% Sodalösung und anschließend mit Wasser mehrmals ausgeschüttelt. Das Produkt wurde nach Trocknen und Einengen der org. Phase zweimal aus Methanol umkristallisiert.

N-(4-Sulfamoylphenylazophenyl)methacrylamid (**3b**): 1,82 g 4-(4-Aminophenylazo)benzolsulfonamid (6,6 mmol) wurden in 50 ml trockenem THF gelöst und 2,0 g trockenes Natriumcarbonat zugegeben. In diese Mischung tropfte man 2,5 ml Methacrylsäurechlorid, gelöst in 20 ml Acetonitril. Die Reaktionsmischung wurde 2 Tage gerührt und dann der Niederschlag abfiltriert. Die anorganischen Bestandteile wurden durch Waschen mit 100 ml Wasser entfernt. Der Rest wurde aus Aceton umkristallisiert. Das in der org. Phase noch reichlich vorhandene Ausgangsprodukt kann nochmals eingesetzt werden.

4-Sulfamoylphenylazophenylmethacrylat (**3c**): 4,16 g 4-(4-Hydroxyphenylazo)benzolsulfonamid (0,015 mol) wurden in 50 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und dazu eine Lösung von 2,00 g Methacrylsäurechlorid (0,02 mol) in 20 ml wasserfreiem Dioxan während 20 min unter Eiskühlung zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei Raumtemp. belassen. Ein anfangs gebildeter gelber Niederschlag löste sich wieder auf. Nach Zugabe von 2 ml Methanol wurde bei 30°C i. Vak. zur Trockne eingedampft, mit 100 ml Wasser gewaschen, über P₂O₅ getrocknet und schließlich aus 250 ml Äthanol umkristallisiert.

N-(4-Biphenyl)chloracetamid (**5a**): Darstellung wie **3a**, Ausb. 5,3 g (95%); Schmp 182°C.

N-(4-Sulfamoylphenylazophenyl)chloracetamid (**5b**): 3,6 g 4-(4-Aminophenylazo)benzolsulfonamid (13 mmol) wurden in 40 ml wasserfreiem THF gelöst und 3,0 g Triäthylamin (30 mmol) zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 2,0 g (12 mmol) Chloressigsäurechlorid in 10 ml THF bei 0°C zugetropft. Anschließend wurde bei Raumtemp. 3 h gerührt,

das ausgefallene Produkt abfiltriert, mit 200 ml Wasser frei von Triäthylaminhydrochlorid gewaschen und getrocknet. Ausb. 4,5 g (98%), Schmp 221 °C.

N-(4-Sulfamoylphenylazophenyl)chloracetat (**5c**): Darst. wie **5b**, Ausb. 68%, Schmp 233 °C.

N-(4-Biphenylaminocarbonylmethyl-2-methacryloyloxyäthyl)-dimethylammoniumchlorid (**6a**): Zu 5,30 g (22 mmol) *N*-(4-Biphenyl)chloracetamid (**5a**), gelöst in 80 ml Aceton, fügte man 3,43 g (21 mmol) 2-Dimethylaminoäthylmethacrylat (**4**) sowie 0,20 g 1,3-Dinitrobenzol als Polymerisationsinhibitor und 0,05 g KJ als Katalysator. Danach wurde 6 h unter Rückfluß erhitzt. Nach einem Tag bei Raumtemp. wurde dreimal in Aceton gelöst und mit 200 ml Diäthyläther gefällt. Das Rohprodukt wurde dreimal aus Aceton umkristallisiert.

2-Methacryloyloxyäthyl-4-(4-sulfamoylphenylazo)phenylaminocarbonylmethyl-dimethylammoniumchlorid (**6b**): 4 g (12 mmol) *N*-(4-Sulfamoylphenylazophenyl)chloracetamid (**5b**) und 3 g (18 mmol) 2-Dimethylaminoäthylmethacrylat (**4**) wurden in 10 ml DMF gelöst und 24 h auf 60 °C erwärmt. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und aus 80 ml Methanol umkristallisiert.

Inneres Salz des 2-Methacryloyloxyäthyl-4-(4-sulfamoylphenylazo)phenylaminocarbonylmethyl-dimethylammoniumchlorids (**6c**): 3,31 g (9,3 mmol) 4-Sulfamoylphenylazophenylchloracetat (**5c**) und 1,47 g (9,3 mmol) 2-Dimethylaminoäthylmethacrylat (**4**) wurden in 100 ml Aceton gelöst und 0,2 g 1,3-Dinitrobenzol als Inhibitor sowie 0,05 g KJ als Katalysator zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 12 h zum Sieden erhitzt und 4 Tage bei Raumtemp. belassen. Aufarbeitung erfolgte durch Trennen in einer 15 cm Säule (Durchmesser 20 mm, feste Phase Kieselgel 60, Merck, Laufmittel Aceton). Die erste Fraktion, 250 ml, enthielt Ausgangsprodukt, die zweite und dritte Fraktion (700 ml Aceton bzw. 1000 ml Methanol) enthielten das innere Salz von **6c**.

Darstellung der Copolymeren 8a–c und 9: Alle Copolymeren wurden durch radikalische Copolymerisation von 2-Methylsulfinyläthylmethacrylat (**7**) mit **3a–c** und **6a** in DMF bei 60 °C dargestellt. Als Initiator wurde 2,2'-Azobisobutyronitril (Molenbruch 0,01) verwendet. Die Polymerisationszeit betrug 24 h.

Die Polymeren wurden durch zweimaliges Umfällen gereinigt. Für **8a** und **9** war Chloroform Lösungsmittel und Diäthyläther Fällungsmittel. **8b** und **c** wurden in DMF gelöst und mit Aceton gefällt. Weitere Angaben s. Tab. 3.

Pharmakologische Versuche

„In vitro“ Experimente wurden ausgeführt mit Rattenleberhomogenat (1 g Leber auf 3 ml Pufferlösung*) von pH 7,4) sowie mit Lebermikrosomen, welche durch Differentialzentrifugation isoliert wurden⁸¹. Die Homogenat-Aufschlammung enthielt 10 mmol/l polymer gebundenes 4-Biphenylamin, die Mikrosomenansätze 2,5 mmol/l. Es wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. Abgespaltenes 4-Biphenylamin konnte nach Extraktion des biologischen Materials mit Hexan UV-spektroskopisch nicht nachgewiesen werden. Zugewetztes Substrat 4-Biphenylamin wurde wiedergefunden. Zur Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse wurde in ein 1:1 mit Pufferlösung*) (pH 7,4) verdünntes Humanserum inkubiert und 60 min bei 37 °C belassen. Es wurde mit Hexan extrahiert. UV-spektroskopisch war

*) 2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1-ol, 66 mmol l⁻¹, in Wasser, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Tab. 2. Analysenwerte der Monomeren und Zwischenprodukte

Verbindung	Summenformel (Molmasse)	Elementaranalyse					
		ber.			gef.		
		C	H	N	C	H	N
3a	$C_{16}H_{15}ON$ (237,3)	80,96	6,33	5,93	81,06	6,33	6,10
3b	$C_{16}H_{16}O_3N_4S$ (344,4)	55,80	4,68	16,27	56,33	4,50	14,87
3c	$C_{16}H_{15}O_4N_3S$ (345,4)	55,64	4,37	12,16	55,51	4,51	11,98
5a	$C_{14}H_{12}ClNO$ (245,7)	68,44	4,92	5,70	68,56	5,11	5,67
5b	$C_{14}H_{13}ClN_4O_3S$ (352,8)	47,66	3,71	15,91	47,32	3,66	15,47
5c	$C_{14}H_{12}ClN_3O_4S$ (353,8)	47,53	3,41	11,87	47,19	3,45	11,77
6a	$C_{22}H_{27}ClN_2O_3$ (402,9)	65,58	6,75	6,95	64,43	6,86	7,03
6b	$C_{22}H_{28}ClN_5O_5S$ (510,0)	51,81	5,53	13,73	51,85	5,63	13,63
6c ^{a)}	$C_{22}H_{26}N_4O_6S$ (474,51)	55,68	5,52	11,80	55,61	5,67	11,58

^{a)} Inneres Salz

Tab. 3. Ausgangsmengen und Ergebnisse bei der Copolymerisation von 2-Methylsulfinyläthylmethacrylat (7) mit den Verbindungen 3a-c und 6a in DMF

Polymeres	Ausgangsprodukte		Nr.	Ausb. in %	$[\eta]$ (ml g ⁻¹)		
	1. Komponente	2. Komponente					
	Nr.	Menge in mol	Nr.	Gewicht in g	Menge in mol		
8a	3a	0,35	7	3,50	19,80	93	45,0
8b	3b	0,50		2,00	11,35	63	40,5
8c	3c	0,50		2,00	11,35	61	56,5
9	6a	0,81		1,10	6,24	53	— ^{a)}

^{a)} Elektrolyt.

kein Unterschied der Absorption zum Extrakt des unbehandelten Serums meßbar. Zuge-setztes 4-Biphenylamin wurde wiedergefunden. Zur Prüfung der Stabilität der Polymeren **8a** und **9** gegen Hydrolyse wurden diese in Pufferlösung^{*)} (pH 7,4) gelöst (1 g/l) und 10 Tage bei 37°C belassen. Im Hexanextrakt konnte kein 4-Biphenylamin nachgewiesen werden.

„In vivo“ Versuche wurden mit Albino-Ratten durchgeführt, die keinen bekannten Zuchtstämmen angehörten. Die Tiere wurden in Stoffwechsellkäfigen gehalten und mit Trockenfutter und Wasser ernährt. Jeweils 3 Tieren (Gewicht ca. 200 g) wurden 100 mg Polymeres **8a** bzw. 144 mg Polymeres **9** in 1 ml Wasser intraperitoneal verabreicht. Kontrolltieren wurde Wasser appliziert. Zur vergleichenden Messung der Ausscheidung erhielt eine weitere Gruppe 16 mg 4-Biphenylamin in 1 ml Olivenöl. Der Urin wurde täglich gesammelt und wie folgt behandelt:

1,00 ml Urin wurde zur Hydrolyse möglicher Konjugate mit 0,25 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und 30 min bei 85°C belassen. Danach wurde mit 0,5 ml 10 M NaOH alkalisiert, auf Raumtemp. abgekühlt und mit 2 ml Hexan extrahiert. Die Proben wurden dazu 1 min maschinell geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung 10 min bei 3500 m^{-1} zentrifugiert. 1 ml der Hexanphase wurde entnommen, 2 ml Hexan zugegeben und bei 280 nm spektroskopisch gegen Hexan vermessen.

Die Absorption der Hexanextrakte des Urins des Kontrolltieres wurde abgezogen, der verbleibende Wert mit der Gesamtmenge des Urins multipliziert und auf gleiche Menge polymergebundenes 4-Biphenylamin umgerechnet.

Die Lösungen der Polymeren wurden unter diesen Bedingungen nicht hydrolysiert.

Herrn C. Elcomb sei für tatkräftige Mithilfe bei der Durchführung der pharmakologischen Experimente gedankt. Dem *Fonds der Chemie*, Frankfurt (Main) und der *Hoechst AG*, Frankfurt (Main)-Hoechst danken für die Unterstützung der Arbeit.

^{*)} 2-Amino-2-hydroxymethylpropandiol, 66 mmol l⁻¹, in Wasser, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

- ¹⁾ H. Jatzkewitz, Z. Naturforsch., Teil B **10**, 27 (1955)
- ²⁾ G. Abel, T. A. Connors, V. Hofmann, H. Ringsdorf, Makromol. Chem. **177**, 2669 (1976)
- ³⁾ A. L. Walpole, M. H. G. Williams, D. C. Roberts, Brit. J. Ind. Med. **11**, 105 (1954)
- ⁴⁾ W. B. Deichmann, M. M. Coplan, F. M. Woods, W. A. D. Anderson, J. Heglin, J. Radomski, Arch. Ind. Health **13**, 8 (1956)
- ⁵⁾ G. Armeli, Med. Lav. **56**, 264 (1965); E. Brill, J. L. Radomski, Xenobiotica **1**, (4-5) 347 (1971); H. Uehleke, K. Nestel, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. **257** (2), 151 (1967)
- ⁶⁾ H. G. Crabtree, Br. J. Cancer **10**, 129-33 (1956); Saburo Kashimura, Ryoza Hirata, Nagao Naoi, Toshio Yuasa, Ann. Rep. Res. Inst. Tuberc. Kanazawa Univ. **11** (2), 17 (1953)
- ⁷⁾ H. G. Batz, V. Hofmann, H. Ringsdorf, Makromol. Chem. **169**, 323 (1973)
- ⁸⁾ B. N. LaDu, H. G. Mandel, E. L. Way, "Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition", Williams & Wilkins Co., Baltimore 1971
- ⁹⁾ V. A. Kargin, M. Azori, V. M. Plate, S. I. Banduryan, Dokl. Akad. Nauk SSSR **154** (5), 1157 (1964); C. A. **60**, 13326c (1964)