

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C08G 65/32

A61K 47/48

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194460.3

[45] 授权公告日 2002 年 5 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1085689C

[22] 申请日 1994. 11. 14

[21] 申请号 94194460.3

[30] 优先权

[32] 1993. 11. 12 [33] US [31] 08/151,481

[86] 国际申请 PCT/US94/13013 1994. 11. 14

[87] 国际公布 WO95/13312 英 1995. 5. 18

[85] 进入国家阶段日期 1996. 6. 12

[73] 专利权人 舍沃特聚合物公司

地址 美国亚拉巴马

[72] 发明人 J. M. 哈里斯

[56] 参考文献

EP 622394 1994. 11. 2 C08G65/32

WO 9216292 1992. 10. 1 B01J20/22

WO 9301498 1993. 1. 21 C01N33/543

审查员 高胜华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 任宗华

权利要求书 8 页 说明书 25 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 可分离的水溶性和水解稳定的活性聚乙二醇砷及有关的聚合物用于表面和分子的改性

[57] 摘要

公开报道一种聚乙二醇衍生物,该衍生物用砷部分活化,用于选择性地连接到分子和表面的硫羟部分上。活化 PEG 是水溶性的、长时间水解稳定,并与硫羟部分形成水解稳定的键。该键在还原环境中一般是不可逆的。PEG 衍生物适用于材料的改性,包括生理活性分子和表面的生物相容性改性。还报道了活性 PEG 的合成法,活性 PEG 和基它材料,包括生理活性材料的结合物的制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种含抗水解稳定的生理活性结合物的药物组合物, 该结合物由连接(1)具有反应活性的硫羧基部分和(2)水溶性可分离的抗水解稳定的活化聚合物而产生, 其中所述聚合物(i)选自聚氧化亚烷基、聚氧乙基化多元醇、和聚烯醇以及(ii)具有至少一个活性砜部分, 该至少一个活性砜部分包含至少两个使砜基-SO₂-与从砜基的第二个碳原子上的适合硫羧基特定性偶联的一个反应活性部位相连接的碳原子, 但该不溶性可分离的活化聚合物不具有 PAG[O-V₁-S-SR₁]_n 的结构, 式中 PAG 表示聚亚烷基二醇, V₁ 是范围可变的非聚合有机基团, SR₁ 是 -SO₂-CH₂-CH=CH₂, 和 n 是 1 或 2, 其中所述聚合物(2)通过该硫羧基部分与所述生理活性分子(1)连接。

2. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该至少一个活性砜部分(ii)选自乙烯基砜、活性乙基砜、乙烯基砜和乙基砜的活性衍生物, 和它们的混合物。

3. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该聚合物(i)选自聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙基化丙三醇、聚氧乙基化山梨醇、聚氧乙基化葡萄糖, 和聚烯醇。

4. 权利要求 1、2 或 3 的药物组合物, 其中该聚合物(i)是聚乙二醇。

5. 权利要求 4 的药物组合物, 其中所述至少一种活性砜部分(ii)选自乙烯基砜和卤乙基砜。

6. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该活化聚合物(2)是聚乙二醇乙烯基砜。

7. 权利要求 7 的药物组合物, 其中该活化聚合物 (2) 是直链的聚合物。

8. 权利要求 7 的药物组合物, 其中该直链的聚合物除活性砒部分 (ii) 之外没有其它取代基。

9. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该活化聚合物 (2) 是一种无规共聚物, 或者嵌段共聚物, 或者三元共聚物。

10. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该活化聚合物 (2) 是哑铃状结构, 聚合物主链至少一个末端有该活性部分, 聚合物主链的另一端有一个与该活性部分相同或不同的活性部分。

11. 权利要求 10 的药物组合物, 活化聚合物 (2) 中该聚合物主链的另一端包含与氨基部分有反应活性的不同的活性部分。

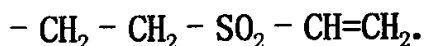
12. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该活化聚合物 (2) 包含支化分子结构的至少一个臂。

13. 权利要求 12 的药物组合物, 其中该支化分子结构是树枝状的。

14. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该活性砒部分 (ii) 借助一个包含连接剂部分 (iii) 的键连接到该聚合物上, 且其中该聚合物 (i) 包含的活性部分 (iv) 能形成连接到该连接剂部分 (iii) 的键。

15. 权利要求 14 的药物组合物, 其中该活性部分 (iv) 是胺-特定性的, 且该连接剂部分 (iii) 包含一个活性氨基部分。

16. 权利要求 14 的药物组合物, 其中该聚合物 (i) 是聚乙二醇, 该活性部分 (iv) 是一个氨基部分, 该连接剂的结构为 $\text{NHS} - \text{O}_2\text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_2 - \text{CH}=\text{CH}_2$, 该活化聚合物 (2) 的结构为 $\text{PEG} - \text{NH} - \text{CO}$



17. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该聚合物衍生物 (2) 是聚乙二醇衍生物和所述键在 pH 低于 11 的条件下起作用。

18. 权利要求 1 的药物组合物, 其中所述键在 pH 为 9 或低于 9 的情况下起作用。

19. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该活化聚合物 (2) 在还原环境中是稳定的。

20. 权利要求 1 的药物组合物, 其中该活化聚合物 (2) 在水中是无限可溶的。

21. 权利要求 1 的药物组合物, 其中活化聚合物 (2) 具有下列结构或它们的衍生物:



式中 $n=5-3,000$; Y 是 $-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ 或 $-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{X}$; R 选自 $\text{H}-$ 、 $\text{H}_3\text{C}-$ 和不同于 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SO}_2-$ 或 $\text{X}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ 的聚乙二醇活化部分, X 是卤素。

22. 权利要求 21 的药物组合物, 其中 n 为 $5-2200$ 。

23. 权利要求 21 的药物组合物, 其中 n 为 $34-1100$ 。

24. 权利要求 21 的药物组合物, 其中 n 为 $45-110$ 。

25. 权利要求 24 的药物组合物, 其中 R 选自 $\text{HO}-$ 、 $\text{H}_3\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SO}_2-$ 、 $\text{X}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$, 和它们的衍生物, 或者是不同于 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SO}_2-$ 或 $\text{X}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ 和它们的衍生物的聚乙二醇活化部分。

26. 权利要求 1 的药物组合物, 其中活化有机聚合物 (2) 的制备方法包括 (A) 将含硫部分连接到聚合物 (i) 碳原子上的步骤, 和 (B)

然后将含硫部分转化成活性砒部分(ii)的步骤。

27. 权利要求 26 的药物组合物, 其中所述方法还包括(C)将有活性砒部分的活化聚合物(ii)分离的步骤。

28. 权利要求 26 的方法, 其中步骤(A)包括(a)将聚合物(i)上至少一个可活化羟基部分活化的步骤, 和(b)使所得的化合物与一种含有硫羟基部分的醇起反应, 使硫原子直接连接到聚合物(i)的碳-碳键上的步骤。

29. 权利要求 28 的药物组合物, 其中所述步骤(a)选自羟基取代步骤和用更易反应的部分置换羟基氢的步骤。

30. 权利要求 28 的药物组合物, 其中含有硫羟基部分的醇是巯基乙醇。

31. 权利要求 28 的药物组合物, 其中步骤(B)包括(c)使含硫部分中的硫氧化成砒, 和(d)使产物与一个羟基活化部分或一个羟基取代部分起反应。

32. 权利要求 31 的药物组合物, 其中所述砒是一种活性乙基砒, 该方法还包括(e)使活化乙基砒与强碱起反应, 在聚合物上形成乙烯基砒部分的步骤。

33. 权利要求 26 的药物组合物, 其中制备的化合物是聚乙二醇乙烯基砒, 其中该方法包括下列步骤:

(a)使至少有一个活性羟基部分的聚乙二醇与一种化合物起反应形成一种酯取代或卤化物取代的聚乙二醇;

(b)使步骤(a)的酯取代或卤化物取代的聚乙二醇与巯基乙醇起反应, 用巯基乙醇基团取代酯或卤化物部分;

(c)使步骤(b)的巯基乙醇取代的聚乙二醇与一种氧化剂起反

应，使巯基乙醇部分中的硫氧化成砒；

(d)使步骤(c)的砒与一种化合物起反应，使巯基乙醇部分中的羟基转化成酯或卤化物部分；

(e)使步骤(d)的乙基砒与碱起反应，形成聚乙二醇乙烯基砒。

34. 权利要求 33 的药物组合物，还包括分离聚乙二醇乙烯基砒的步骤。

35. 权利要求 1 的药物组合物，其中活化聚合物(2)是聚乙二醇乙烯基砒，其制备方法包括下列步骤：

(a)使至少有一个活性羟基部分的聚乙二醇与一种化合物起反应形成一种酯取代或卤化物取代的聚乙二醇；

(b)使步骤(a)的酯取代或卤化物取代的聚乙二醇与巯基乙醇起反应，用巯基乙醇基团取代酯或卤化物部分；

(c)使步骤(b)的巯基乙醇取代的聚乙二醇与一种氧化剂起反应，使巯基乙醇部分中的硫氧化成砒；

(d)使步骤(c)的砒与一种化合物起反应，使巯基乙醇部分中的羟基转化成氯部分；

(e)将氯乙基砒溶于二氯甲烷、在乙醚中沉淀氯乙基砒和使沉淀物在乙酸乙酯中重结晶，分离聚乙二醇氯乙基砒；

(f)使步骤(e)的乙基砒与碱起反应，形成聚乙二醇乙烯基砒。

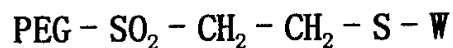
36. 权利要求 35 的药物组合物，该方法还包括分离聚乙二醇乙烯基砒的步骤。

37. 权利要求 35 的药物组合物，其中所述方法还包括在与碱反应生成聚乙二醇乙烯基砒以前使聚乙二醇氯乙基砒结晶溶解于一种有机溶剂的步骤，过滤法分离出聚乙二醇乙烯基砒以除去碱的步

骤，及蒸去溶剂的步骤。

38. 权利要求 1-37 任一项所述的药物组合物，其中所述生理活性分子(1)是一种蛋白质，该所述反应活性硫羟基部分包含在该蛋白质的半胱氨酸部分中。

39. 权利要求 29 的药物组合物，其中所述结合物具有下列结构：



式中 W 是一种生理活性分子(1)。

40. 权利要求 39 的药物组合物，其中 W 是一种蛋白质。

41. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述结合物包含两个相同或不同的生理活性分子，至少一个该生理活性分子有反应活性硫羟基部分，以及水溶性哑铃状聚合物衍生物，该聚合物衍生物主链每端各有一个反应活性部分，至少一个该部分是如权利要求 1 所述活性砜部分，并与该至少一个生理活性分子的硫羟基部分形成键，另一该生理活性分子与该聚合物的另一该反应活性部分形成键。

42. 权利要求 41 的药物组合物，其中所述生理活性分子选自蛋白质、药物、细胞、维生素，和它们的混合物。

43. 权利要求 41 的药物组合物，其中该活性砜部分是乙烯基砜或卤乙基砜，该聚合物衍生物的该另一反应活性部分与氨基的反应是选择性的。

44. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述结合物包含一种活化的水溶性聚合物，该聚合物至少有一个与硫羟基部分的反应是选择性的活性砜部分，以及至少一个与氨基部分的反应是选择性的另一部分；第一蛋白质含硫羟基部分，其中该硫羟基部分与聚合物的该

砒部分形成水解稳定的键；第二蛋白质有氨基部分，其中该氨基部分与该聚合物的该另一部分形成键。

45. 权利要求 44 的药物组合物，其中该第一蛋白质含有半胱氨酸单元，该第二蛋白质含有赖氨酸单元。

46. 聚乙二醇乙烯基砒的合成方法，该方法包括下列步骤：

(a) 使至少有一个活性羟基部分的聚乙二醇与一种化合物起反应形成一种酯取代或卤化物取代的聚乙二醇；

(b) 使步骤 (a) 的酯取代或卤化物取代的聚乙二醇与巯基乙醇起反应，用巯基乙醇基团取代酯或卤化物部分；

(c) 使步骤 (b) 的巯基乙醇取代的聚乙二醇与一种氧化剂起反应，使巯基乙醇部分中的硫氧化成砒；

(d) 使步骤 (c) 的砒与一种化合物起反应，使巯基乙醇部分中的羟基转化成氯部分；

(e) 将氯乙基砒溶于二氯甲烷、在乙醚中沉淀该氯乙基砒和使沉淀物在乙酸乙酯中重结晶，分离聚乙二醇氯乙基砒；

(f) 使步骤 (e) 的乙基砒与碱起反应，形成聚乙二醇乙烯基砒。

47. 权利要求 46 的方法，该方法还包括权利要求 36-37 的步骤。

48. 一种含抗水解稳定的生理活性结合物的药物组合物，该结合物由连接 (1) 具有反应活性的硫羟基部分和 (2) 水溶性可分离的抗水解稳定的活化聚合物而产生，其中所述聚合物 (i) 选自聚氧化亚烷基、聚氧乙基化多元醇、和聚烯醇以及 (ii) 具有至少一个活性砒部分，该至少一个活性砒部分包含至少两个碳原子和从链中砒基的第二个碳原子上包含适合硫羟基特定性偶联的一个反应活性部

位，并且(iii)制备该聚合物的方法包括将含硫部分连接到聚合物(i)碳原子上的步骤和然后将含硫部分转化成活性砷部分(ii)的步骤，其中所述聚合物(2)通过该硫羟基部分与所述生理活性分子(1)连接。

49. 水溶性可分离的抗水解稳定的活化聚合物，其中所述聚合物(i)选自聚氧化亚烷基、聚氧乙基化多元醇、和聚烯醇以及(ii)具有至少一个活性砷部分，该至少一个活性砷部分包含至少两个碳原子和从链中砷基的第二个碳原子上包含适合硫羟基特定性偶联的一个反应活性部位，其中活性砷部分(ii)通过包括连接剂部分(iii)的键连接到该聚合物(i)上，且其中该聚合物(i)包含除所述活性砷部分(ii)外的活性部分(iv)，该活性部分(iv)能形成连接到该连接剂部分(iii)的键。

说 明 书

可分离的水溶性和水解稳定的活性聚乙二醇砜及 有关的聚合物用于表面和分子的改性

本发明涉及聚乙二醇的活性衍生物及有关的亲水聚合物，涉及它们的合成方法，用于表面和分子的改性。

聚乙二醇 (PEG) 已被研究用于药物、人造植入物，以及生物相容性成为重要性的其它应用。种种聚乙二醇衍生物 (PEG 衍生物) 已被提出，其所含的活性部分使 PEG 有可能连接到药物和植入物上，连接到分子和表面上通常改善分子或表面的物理或化学性能，

例如，PEG 衍生物已被提出用于将 PEG 连接到表面上以控制润湿、静电积累、别种分子连接到表面上，包括蛋白质或蛋白质残基。更具体地说，PEG 衍生物已被提出用于连接到塑料隐形眼镜表面以减少蛋白质积累和视力模糊。PEG 衍生物已被提出用于连接到人造血管以减少蛋白质积累和阻塞的危险。PEG 衍生物已被提出用于蛋白质在表面上的固定化，如在化学反应的酶催化作用那样。

还有另外一些例子是，PEG 衍生物已被提出用于连接到分子，包括蛋白质上，保护分子免受化学侵蚀，减少该分子的有害副作用，或增加分子的体积从而可能使某些有医疗效益的材料变得有用，不然的话就是无用甚至对活着的机体有害。当小分子的体积借助连接一种生物相容性 PEG 衍生物而增加时就不会像往常那样经由肾脏排泄而能保留在血流中。当注射后引起免疫反应的蛋白质和别的材料借助将 PEG 分子连接到蛋白质上，就能在某种程度上使免疫系

统无法察觉。

PEG 衍生物同样已被提出用于例如从细胞体亲合分离出酶来。在亲合分离过程中, PEG 衍生物包含一种供可逆连接到细胞体内酶上的官能团。PEG 和酶结合物从细胞体中分离出来, 然后, 如有必要, 酶再从 PEG 衍生物中分离出来。

将 PEG 衍生物连接到蛋白质上的实验, 说明在 PEG 连接到表面和分子上已经遇到的某些问题。对许多表面和分子来说, 适用于与 PEG 衍生物起连接反应的部位数目是相当有限的。例如, 蛋白质一般含有有限数目和不同种类的可供连接的反应活性部位。更成问题的是, 某些反应活性部位可以说是决定着蛋白质的生理活性的, 像当一种酶催化某一化学反应那样。连接到足够数目这种部位上的 PEG 衍生物会有害地影响蛋白质的生理活性。

规定 PEG 衍生物与蛋白质连接位置的反应活性部位是由蛋白质的结构所控制的。蛋白质, 包括酶, 是由不同的 α -氨基酸顺序组成的, 该氨基酸的通式为 $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ 。一个氨基酸的 α -氨基部分 ($\text{H}_2\text{N}-$) 和相邻氨基酸的羧基部分 ($-\text{COOH}$) 连接在一起形成酰胺键, 可表示为 $-(\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO})_n-$, 式中 n 可为成百成千。片段 R 可含有用于蛋白质生理活性的反应活性部位和用于 PEG 衍生物连接的反应活性部位。

例如, 作为大多数蛋白质主链的氨基酸组成要素的赖氨酸除在 α 位之外还在 ϵ 位有一个 $-\text{NH}_2$ 基。 ϵ - NH_2 在碱性 pH 条件下是没有反应的。许多技术已经以那些连接到蛋白质赖氨酸 ϵ - NH_2 部分的 PEG 衍生物为发展目标。这些 PEG 衍生物共同的缺点是, 蛋白质赖氨酸部分一般都是失去活性的, 而赖氨酸对蛋白质活性是重要

的。

Zalipsky 在美国专利 5,122,614 中公开报道了用氧羰基 -N-二甲酰亚胺官能团活化的 PEG 分子可在含水碱性条件下借助尿烷键连接到多肽的胺基上。活化的 PEG-N-琥珀酰亚胺碳酸酯据说与胺基形成稳定的抗水解尿烷键。表明胺基在 pH 约 8.0—9.5 的碱性下更易起反应,而在低 pH 下其反应活性急剧减退。但未连接的 PEG 衍生物的水解在 pH 8.0—9.5 下同样急剧增进。Zalipsky 借助使用过量的 PEG 衍生物连接到蛋白质表面,避免了未连接的 PEG 衍生物与水的反应速率增高的问题。在 PEG 衍生物有机会水解和不反应之前,借助使用过剩量,很易起反应的 ϵ -氨基部位与 PEG 连接,以使蛋白质改性。

Zalipsky 的方法适用于将蛋白质的赖氨酸部分连接到 PEG 衍生物的一个活性部位上。但是如果 PEG 衍生物的水解速率相当大,它能成问题地在 PEG 分子的多个活性部位上提供连接,因为简单的过剩量不能使水解减速。

例如,每端都有活性部位的线性 PEG 将以一端连接到蛋白质上,但如果有效的水解速率,就将在另一端与水起反应,用较不易起反应的羟基部分(-OH)封端,而不是在每端与连接的蛋白质或其它预定的基团形成“哑铃状”分子结构。如果想要用 PEG 连接剂将分子连接到表面上,因为 PEG 首先连接到表面上或连接到分子上,而 PEG 衍生物的另一端对随后的反应必须保持活性,就会发生同样的问题。如果水解是一个问题,那么另一端通常会变得失去活性。

Zalipsky 在美国专利 5,122,614 中还公开报道了来自先有专利的若干其它 PEG 衍生物。PEG-琥珀酰基 -N-羟基琥珀酰亚胺

酯据说形成的酯键在水介质中稳定性有限,从而表明此衍生物的半衰期短得不合乎需要。PEG-氰尿酸氯据说呈现不良的毒性并对于与蛋白质上特定官能团的反应是非特定性的。因此PEG-氰尿酸氯衍生物会有不希望的副反应并会降低蛋白质活性,因为它连接到不同反应活性部位处若干不同种氨基酸上。据说PEG-苯基碳酸酯产生对蛋白质有亲合力的有毒疏水苯酚残基。据说用羰基二咪唑活化的PEG与蛋白质官能团起反应太慢,需要长时间反应以使蛋白质得到足够的改性。

还有别的PEG衍生物已被提出用于连接到氨基酸的官能团上,该官能团不是赖氨酸的 ϵ -NH₂。组氨酸含有反应活性的亚胺基部分(-N(H)-),而许多与 ϵ -NH₂起反应的衍生物也与-N(H)-一起反应。半胱氨酸含有反应活性的巯基部分(-SH),而易与此部分起反应的PEG衍生物马来酰亚胺容易发生水解。

从上面小型抽样可知,大量精力已经投入开发各种各样PEG衍生物尤其是用于将其连接到各种蛋白质赖氨酸的-NH₂部分上。这些衍生物的多数已被证明在合成和应用上成问题。有些与蛋白质形成易于水解的不稳定键,因而在含水环境,诸如血流中寿命不很长。有些形成较稳定的键,但在成键之前易于水解,这意味着PEG衍生物上的反应活性基团在与蛋白质连接前可失去活性。有些多少有点毒性因而不太适合于体内应用。有些在实用上起反应太慢。有些经过连接到决定蛋白质活性的部位后导致蛋白质活性的丧失。有些对将要连接的部位是非特定性的,同样能够导致有用活性的丧失而且缺少可再现性。

本发明提供聚乙二醇(PEG)聚合物的水溶性和水解稳定的衍生

物和有关的含一个或多个活性砒部分的疏水性聚合物。这些带有活性砒部分的聚合物衍生物对于与分子和表面上的硫羟部分而不是氨基部分的连接是高度选择性的,尤其是在 pH 约 9 或略小于 9 的条件下。砒部分,聚合物和砒部分之间的键,以及硫羟部分和砒部分之间的键在还原环境中通常是不可逆的,并在含水环境 pH 约 11 或略小于 11 的条件下对水解是长期稳定的。因此,各种各样材料的物理和化学性能可用活性砒聚合物衍生物在要求的含水条件下予以改进。

例如,可以选择生理活性材料的最佳改性条件以保持高度的生理活性。药物从阿斯匹林到青霉素,只要这些药物经改性使之含有硫羟基,就能借助活性砒聚合物衍生物的连接有效地予以改性。包含带活性硫羟部分的半胱氨酸单元的大蛋白质同样能有效地改性。重组细胞 DNA 工艺技术(遗传工程)能用来将半胱氨酸基团引入到蛋白质中预定的位置。这些半胱氨酸可被连接到活性砒聚合物衍生物上,在各种通常不含半胱氨酸单元的蛋白质上生成水解稳定的键。

本发明活化聚合物特定的砒部分是那些至少有两个碳原子的砒部分,这两个碳是从砒基起第二个碳上的硫羟特定性连接反应的反应活性部位连接到砒基 $-SO_2$ 上的。

更准确地说,活性砒部分包含乙烯基砒、活性乙基砒、包括卤乙基砒,以及这些砒的硫羟特定性活性衍生物。乙烯基砒部分的结构是 $-SO_2-CH=CH_2$; 活性乙基砒部分的结构是 $-SO_2-CH_2-CH_2-Z$, 式中 Z 可是卤素或某些能被硫羟取代的另外的离去基团,形成砒和硫羟键 $-SO_2-CH_2-CH_2-S-\bar{W}$, 式中 \bar{W} 是生理活性分子、表面、或某些其它材料。该乙烯基和乙基砒的衍生物可包含另外的取

代基,只要能够保持水溶性和第二个碳上反应活性部位的硫羧特定反应性。

本发明涉及含硫羧部分的材料和含活性砒部分的聚合物衍生物的水解稳定性结合物。例如,一种水溶性砒-活化的 PEG 聚合物能在反应活性的硫羧部位连接到一种生理活性分子上。PEG 和生理活性分子连接的键包含连接到硫羧部分的砒部分,其结构是 $\text{PEG} - \text{SO}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \bar{\text{W}}$, 式中 $\bar{\text{W}}$ 是生理活性分子,无论砒部分在 PEG 连接之前是乙烯基砒还是活性乙基砒。

本发明还涉及一种生物材料,该材料包含具有一个或多个反应活性硫羧部位和一种或多种本发明的水溶性砒-活化聚合物的表面,该聚合物经由一个砒和硫羧键连接到表面。生物材料和其它材料也可通过不是砒和硫羧键的其它键,诸如常规的氨基键,连接到砒活化聚合物衍生物上,给出一种更加水解稳定的活化基团,砒部分,用于随后的反应。

本发明涉及一种本发明活化聚合物的合成方法。先将一个含硫部分直接连接到聚合物的碳原子上,然后将其转化成活化砒部分。另一选择的方法是,可将一种在一端有砒部分的连接剂连接到常规的活化聚合物上,使所得的聚合物在其末端有砒部分。

更具体地说,一种至少有一个活性羟基部分的水溶性聚合物起反应生成一种其上有更易起反应部分的取代聚合物。所得的取代聚合物进行反应,用一个至少有两个碳原子的含硫部分来取代该更易起反应部分,这里含硫部分中的硫是直接连接到聚合物的碳原子上的。然后使含硫部分起反应,将硫-S-,氧化成砒, $-\text{SO}_2-$, 在含砒部分的第二个碳原子上生成一个足够活性的部位,用于与含硫羧

部分形成键。

还要更具体地说,本发明活化聚合物的合成方法包括使聚乙二醇与一种羟基活化的化合物起反应以形成酯或与一种含卤衍生物起反应以形成卤代 PEG。所得的活化 PEG 再与巯基乙醇起反应,用巯基乙醇基团来取代酯部分或卤化物。巯基乙醇部分中的硫被氧化成砷。乙醇砷的活化方法,既可活化羟基部分,也可用更活性部分诸如卤素来取代羟基部分。如有必要,再将 PEG 的活性乙基砷转化成乙烯基砷,方法是将活化羟基或其它活性部分裂开,邻接砷基 - SO_2 - 引入碳-碳双键。

本发明还涉及一种结合物的制备方法,该结合物是由一种材料和一种含有活性砷部分的聚合物衍生物结合而成。该制备方法包括在聚合物衍生物和材料之间形成键的步骤,该键可处于砷部分和硫羟部分之间。

因此,本发明提供的活化聚合物在反应性上是特定的,在水中是稳定的,在还原环境中是稳定的,并与表面和分子,包括生理活性分子形成比前已实现的更稳定的键。该活化聚合物可用来改进那些生物相容性成为重要的表面和分子的性能。由于活化聚合物在含水条件下是稳定的,且与硫羟部分形成稳定的键,能够选择最有利的反应条件来保持生理活性材料的活性并使聚合物连接的反应速率最优化。

用来制备聚乙二醇和有关聚合物的活性砷的合成路线至少包括四个步骤,其中先把硫连接到聚合物分子上,然后通过一系列反应转化成一个活性砷官能团。起始的 PEG 聚合物分子至少有一个羟基部分, -OH, 该羟基可用来参与化学反应,被认为是一个“活性”羟基

部分。PEG 分子可以有多个化学反应可用的活性羟基部分,如下所述。这些活性羟基部分事实上是相对非活性的,合成的第一步骤是制备一种具有更易起反应部分的 PEG。

通常用两条合成路线之一来生成更易起反应部分:羟基活化或者取代反应。其它可用的方法对本行业的人应是显而易见的,而羟基活化法和取代法则是两种最常用的方法。在羟基活化法中,羟基部分-OH 的氢原子-H 被一个更为活性的基取代。通常是,酸或酸的衍生物诸如酰卤与 PEG 起反应生成一个活性酯,其中 PEG 和酸部分通过酯键连接。酸部分通常比羟基部分更易起反应。典型的酯是磺酸酯、羧酸酯,以及磷酸酯。

适用于实施本发明的磺酰氯包括甲磺酰氯和对甲苯磺酰氯。甲磺酰氯的结构是 $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, 其酯叫做甲磺酸酯。对甲苯磺酰氯的结构是 $\text{H}_3\text{CC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$, 其酯叫做甲苯磺酸酯。

在取代反应中,PEG 上的整个-OH 基被更易起反应的部分,通常是卤化物所取代。例如,亚硫酸氯(SOCl_2)能与 PEG 反应形成更易起反应的氯取代的 PEG。羟基部分被另一部分取代,技术上往往叫做羟基活化。“羟基活化”一词在本文中应被理解为既取代又酯化以及其它羟基活化方法。

“基”、“官能团”、“部分”、“活性部分”、“反应活性部位”、和“基团”等用语在化学技术上多少有点同义而用于技术,在本文中是指分子中明显的可限定的部分或单位,是指执行某种功能或活性的单位,是容易与其它分子或分子的一部分起反应的。在此意义上当连接到聚合物上时蛋白质或蛋白质残基可被认为是一个分子或官能团。

“PEG”一词用于技术,在本文中表示几种通式为 H

$(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ (也可表示为 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OH}$) 的乙二醇的缩聚物。PEG 也叫做聚氧亚乙基、聚环氧乙烷、聚乙二醇和聚醚二醇。PEG 能以环氧乙烷和各种其它单体的共聚物的形式制备。

聚乙二醇适合于生物应用,因为它具有非常合乎需要的性能,通常许可用于生物或生物工艺学应用。PEG 通常是透明、无色、无嗅、水溶性,热稳定的,对许多化学试剂呈惰性、不水解,不劣化,而且是无毒的。人们认为聚乙二醇是生物相容性的,也就是说,PEG 能与活组织或有机体共存而不带来伤害。更具体地说,PEG 不是免疫性的,也就是说,PEG 不会在体内产生免疫反应。当连接到一个在体内具有某种合乎需要功能的部分上时,PEG 会掩蔽该部分并减轻或消除一切可能的免疫反应,使有机体能够耐受该部分的存在。因此,本发明的砷活化 PEG 应当是基本上无毒的而且不会引起血液凝固或其它不良效应。

合成的第二个步骤是将硫直接连接到聚合物的碳原子上,使其结构能转化成乙基砷或具有相同活性的乙基砷衍生物。“乙基”是指分子的一部分,该部分有一个可看作是相同的,由两个碳原子连接在一起的基团。活性砷 PEG 衍生物要求,链中离开砷基的第二个碳原子提供一个反应活性部位用于硫羟部分与砷的连接。这一结果的实现方法是使上述第一步骤中生成的活性部分在取代反应中与一种醇起反应。上述活性部分通常为酯或卤化物取代的 PEG;上述醇同样含有一个连接到乙基上的活性硫羟部分,既硫代乙醇部分。硫羟部分氧化成砷,乙基上离开砷的第二个碳转化成反应活性部位。

含有硫羟部分, $-\text{SH}$, 的化合物是类似醇的有机化合物,它含有羟基部分 $-\text{OH}$, 只是在硫醇中至少一个羟基部分的氧被硫取代。

来自第一反应的 PEG 衍生物上的活化部分,一般或者是卤化物或者是酯的酸部分,从聚合物裂开而被硫代乙醇化合物的醇基所取代。醇的硫羟部分中的硫直接连接到聚合物的碳上。

醇会提供一个硫代乙醇部分,用于直接连接到聚合物链的碳上,或者能够不费力地转化成一個硫代乙醇部分或同样活性的取代部分。这种醇的例子是巯基乙醇, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 往往也叫做硫代乙醇。

在合成的第三步骤中,氧化剂是用来将连接在碳上的硫转化成砷基, $-\text{SO}_2-$ 。这类氧化剂有很多,包括过氧化氢和过硼酸钠。可以使用一种催化剂,诸如钨酸。但是,形成的砷对硫羟-选择性反应不是呈活性状态,需要将醇中相对不反应的羟基部分除去,该醇是第二步骤的取代反应中添加的。

在第四步骤中,第二步骤添加的醇中羟基部分转化成更易反应的形式,或通过羟基的活化或通过用更易起反应的基团取代羟基,反应顺序与第一步骤相似。通常是用卤化物取代,形成卤乙基砷或其衍生物,该物在离开砷部分的第二个碳上有一个反应活性部位。通常,乙基上第二个碳将用氯化物或溴化物活化。羟基活化反应应提供一相同反应性的部位,诸如磺酸酯。合用的反应剂是酸、酰卤以及上述关于反应第一步骤的其它试剂,尤其是亚硫酸氯,用于用氯原子取代羟基。

所得的高分子活化乙基砷是稳定、可分离以及适用于硫羟-选择性连接反应的。如实施例中所示,PEG 氯乙基砷在 pH 约 7 或略小于 7 下于水中是稳定的,但仍习惯于在碱性 pH 高达至少约 9 的条件下使用,对硫羟选择性连接反应有利。

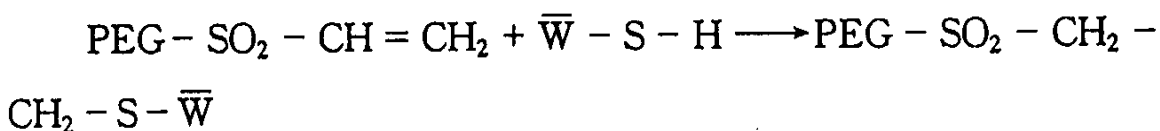
在硫羟连接反应中,用硫羟部分取代氯是可能做到的,反应如下:

$$\text{PEG}-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} + \bar{\text{W}}-\text{S}-\text{H} \longrightarrow \text{PEG}-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\bar{\text{W}}$$
式中 $\bar{\text{W}}$ 是硫羟部分 SH 连接的部分,它可以是一个生理活性分子、表面,或某些别的材料。但是,只要不希望受到理论的束缚,就可以认为,基于实施例 3 所示的可观察到的反应动力学,氯乙基和其它活化乙基砒以及活性衍生物转化成 PEG 乙烯基砒,而且就是这个 PEG 乙烯基砒或其衍生物实际上连接到硫羟部分上。尽管如此,所得的砒和硫羟键不是可辨认得出的,或从活性 PEG 乙基砒,或从 PEG 乙烯基砒,故此活性乙基砒可用在 pH 大于 7 下供连接到硫羟基之用。

PEG 乙烯基砒同样是稳定和可分离的,如下文所述,能够形成硫羟—选择性,水解稳定的键,通常比卤乙基砒或其它活化乙基砒在短得多的时间内形成键。

在可以附加到合成法的第五步骤中,使活化乙基砒与任何一种碱诸如 NaOH 或三乙胺起反应,以形成 PEG 乙烯基砒或其活性衍生物,用于硫羟—选择性连接反应。

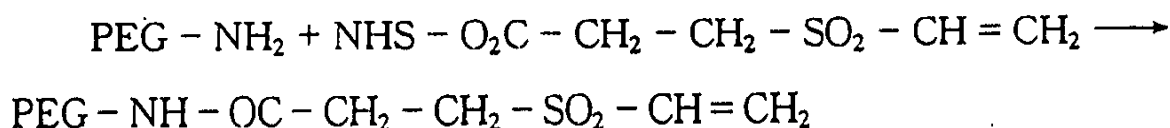
如下面各实施例,特别是实施例 3 中所示,PEG 乙烯基砒与硫羟部分迅速反应,在 pH 小于约 11 的水中稳定达至少数日而不水解。其反应如下:



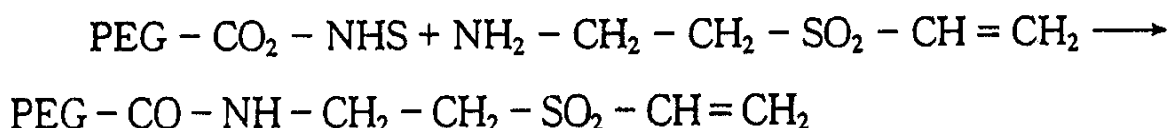
硫羟部分被认为是“跨接双键”而加上的。 $\bar{\text{W}}-\text{S}$ 部分加到双键的末端 CH_2 上,这是从砒基 SO_2 起第二个碳。氢 H 加到双键的 CH 上。

但是在 pH 大于约 9 下, 砒部分对硫羧的选择性减小, 砒部分就变得有点更易与氨基反应。

可以代替上述合成法的是, 将一种含砒部分的连接剂连接到一种用不同官能团活化的 PEG 上, 这样来制备砒-活化的 PEG 衍生物。例如, 使一种氨基活化的 PEG, PEG-NH₂, 在合适的 pH 条件 (约 9 或略小于 9) 下与一个小分子起反应, 该小分子的一端有琥珀酰亚胺基活性酯部分 NHS-O₂C-, 另一端有砒部分, 乙烯基砒-SO₂-CH=CH₂。氨基活化 PEG 与琥珀酰亚胺基酯形成稳定的键。所得的 PEG 用末端的乙烯基砒部分活化, 是水解稳定的。该反应及所得乙烯基砒活化 PEG 的结构式如下:



同样地, 使一种胺-活化的 PEG 诸如琥珀酰亚胺基活性酯 PEG, PEG-CO₂-NHS, 与一个小分子起反应, 该小分子的一端有胺部分, 另一端有乙烯基砒部分。琥珀酰亚胺基酯与胺部分形成稳定的键如下:



本发明的活性 PEG 砒可以是任何分子量的, 可以是线型的, 或者是带有成百个臂的支化的聚合物。PEG 可以是取代的或未取代的, 只要至少有一个反应活性部位用于砒部分取代。PEG 的平均分子量一般为 200—100,000, 其生理性能因分子量而异并取决于支化和取代的程度。因此不是所有的这类 PEG 衍生物都适合于生理或生物工艺学应用。对大多数生理和生物工艺学应用来说, 将使用基

本上线型直链的 PEG 乙烯基砜, 或双乙烯基砜, 或活化乙基砜, 除乙烯基砜或乙基砜部分以及, 在需要的场合, 其它附加的官能团外, 使用基本上未取代的 PEG。对许多生理和生物工艺学应用来说, 取代基一般往往是不起反应的基团诸如氢 H-, 和甲基 CH₃- (“m-PEG”)。

PEG 可以有多个乙烯基砜或已连接的前体部分, 或者 PEG 可以在一端用较不起反应的部分诸如甲基, -CH₃ 来封端。例如如果只是想沿蛋白质链的各个巯基部位上连接聚合物链, 封端形式可能是可用的。将 PEG 分子连接到一种生理活性分子诸如蛋白质或别的药物或表面上的反应往往叫做聚乙二醇基化(PEGylation)。

两端带有活性羟基的线型 PEG 可用乙烯基砜或者有相同反应性的前体或衍生物加以活化, 变成双官能 PEG。例如双官能结构, PEG 双乙烯基砜, 如往往叫做哑铃结构, 例如可以用作连接剂或间隔基以便将一个生理活性分子连接到材料表面, 或者将不只一个生理活性分子连接到 PEG 分子上。砜部分的抗水解稳定性使之对双官能或杂双官能应用特别有效。

PEG 乙烯基砜及其前体的另一应用是树枝状活化 PEG 其中许多个 PEG 分支臂连接到一个中心核结构上。树枝状 PEG 结构可以是高度支化的, 通常叫做“星状”分子。星状分子在 Merrill 的美国专利 5, 171, 264 中有概括的描述, 其内容编列于此以供参考。可用砜部分在从核延伸出来的 PEG 链末端上提供一个活性官能团并作为连接剂用于将官能团接到星状分子臂上。

PEG 乙烯基砜及其前体和衍生物可用来直接连接到含巯基部分的表面和分子上。但是, 更具有代表性的是, 一种一端有砜部分,

另一端有不同官能部分的杂双官能 PEG 衍生物将要用不同部分连接到材料表面或分子上。例如,当用其他活性部分之一取代时,可以使用杂双官能 PEG 哑铃结构,借助一端的砒键和另一端的别的键,诸如胺键来携带蛋白质或别的生理活性分子以生成一个有两种不同活性的分子。一端有砒部分另一端有胺特定部分的杂双官能 PEG,既能连接到蛋白质的半胱氨酸部分又能连接到它的赖氨酸部分。可获得一个稳定的胺键,然后水解稳定的未反应砒部分可随要求用于随后的硫羟-特异性反应。

杂双官能砒-活化 PEG 的其它活性基团可选自各种各样的化合物。就生理和生物工艺学应用来说,取代基一般经常选自通常用于 PEG 化学的活性部分以活化 PEG,诸如醛、三氟乙磺酸酯、n-羟基琥珀酰亚胺酯、氰尿酸氟、氰尿酸氟、酰基叠氮、琥珀酸酯、对重氮苄基、3-(对重氮苄氧基)-2-羟基丙氧基,以及其它。

除砒以外的活性部分的例子参见下列文献: Davis 等人的 US 4, 179, 337; Lee 等人的 US 4, 296, 097 和 4, 430, 260; Iwasaki 等人的 4, 670, 417; Katre 等人的 US 4, 766, 106; 4, 917, 888; 以及 4, 931, 544; Nakagawa 等人的 US 4, 791, 192; Nitecki 等人的 US 4, 902, 502 和 5, 089, 261; Saifer 的 US 5, 080, 891; Zalipsky 的 US 5, 122, 614; Shadle 等人的 US 5, 153, 265; Rhee 等人的 US 5, 162, 430; 欧洲专利申请 0 247, 860; 以及 PCT 国际申请 US 86/01252; GB 89/01261; GB 89/01262; GB 89/01263; US 90/03252; US 90/06843; US 91/06103; US 92/00432; 以及 US 92/02 047, 其内容编列于此以供参考。

对本行业的人显而易见的是,上述哑铃状结构可以用来携带各

种各样的取代基和取代基的混合物。药物诸如阿斯匹林、维生素、青霉素,和其它等不胜枚举;种种官能度和分子量的多肽或蛋白质和蛋白质片段;不同种类的细胞;生物材料表面,几乎所有的材料都能改性。本文中所用的“蛋白质”一词应理解为包括肽和多肽,它们是氨基酸的聚合物。“生物材料”一词意指一种材料,通常是合成的且往往由塑料组成,它适合于植入到活体中以修复损坏或患病的部件。生物材料的一个例子是人造血管。

用于生理和生物工艺应用的本发明的一个直链 PEG 衍生物所具有的基本结构为 $R - CH_2CH_2 - (OCH_2CH_2)_n - Y$ 。PEG 单体 OCH_2CH_2 优选是沿聚合物主链基本上未取代和无支链的。下标 n 为约 5—3,000。更典型的范围是约 5—2,200, 相当于分子量约 220—100,000。最典型的范围是约 34—1,100, 相当于分子量约 1,500—50,000。大多数应用是在分子量大约 2,000—5,000, 相当于 n 值约 45—110 的范围内实现的。

在上述结构中, Y 是 $-SO_2 - CH = CH_2$ 或 $-SO_2 - CH_2 - CH_2 - X$, 式中 X 是卤素, R 是与 Y 相同或不同的基团。 R 可以是 $HO -$ 、 $H_3CO -$ 、 $CH_2 = CH - SO_2 -$ 、 $Cl - CH_2 - CH_2 - SO_2 -$, 或者一个除 $CH_2 = CH - SO_2 -$ 、 $Cl - CH_2 - CH_2 - SO_2 -$ 以外的聚合物活化基团, 诸如涉及关于上述专利和出版的专利申请。

活性聚合物衍生物是水溶性和水解稳定性的, 并与巯羟基生成水溶性和水解稳定性的键。该衍生物被认为是无限溶于水的或看成近似无限溶解度并能使在其它情况下不溶的分子当与该衍生物结合时能进入溶液。

衍生物的水解稳定性表示聚合物和砒部分之间的键在水中是稳

定的,表示在 pH 小于约 11 下乙烯基砜部分不与水起反应能持续时间至少有数天,而且如下面实施例 3 所示可能在长时期内不反应。活化乙基砜在碱性 pH 条件下能转化成具有同样稳定性的乙烯基砜。硫羟键的水解稳定性表示,活化聚合物和含有硫羟部分材料结合物的砜—硫羟键在含水环境中 pH 小于约 11 下在长时间内是稳定的。可以预见大多数蛋白质在苛性 pH 11 或略大于 11 下丧失其活性。因此对本行业的人显而易见的是,活性砜 PEG 衍生物的许多应用须在 pH 小于 11 下实施,与高 pH 下砜部分稳定性无关。

为适用于蛋白质和其它材料的改性,只须砜稳定持续足够的时间,使砜与蛋白质或其它材料上的活性硫羟部分起反应。砜部分与硫羟的反应速率随 pH 而从约 2 分钟到 30 分钟变化,这一情况示于下文实施例 2,这一变化比水解速率,如果有的话,要快得多。可预见乙烯基砜在很宽范围的反应时间内与硫羟起反应因为它是长期稳定的。同样,如下文实施例 3 所示,在碱性 pH 下氯乙基砜不水解而转化成乙烯基砜,它保持稳定长达几天而且甚至对硫羟基更有反应性。因此,对材料的改性来说,活性乙基砜同样被认为是在宽 pH 范围内长时间水解稳定的。

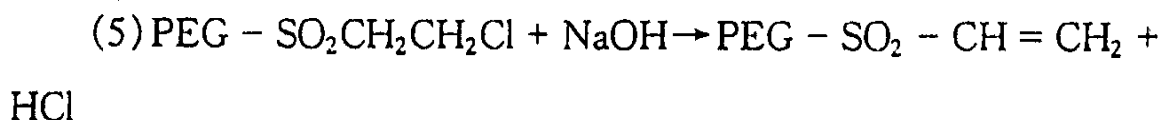
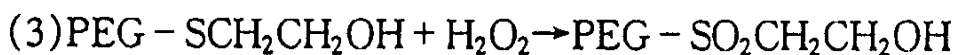
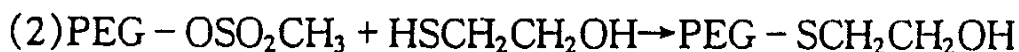
除 PEG 以外的其它水溶性聚合物被认为适合于类似的用活化砜部分的改性和活化。这些其它的聚合物包括聚乙烯醇 (PVA); 别的聚氧化亚烷基诸如聚丙二醇 (PPG) 等等; 以及聚氧乙基化多醇诸如聚氧乙基化丙三醇、聚氧乙基化山梨醇, 和聚氧乙基化葡糖, 等等。该聚合物可以是均聚物或者无规或嵌段共聚物 and 三元共聚物, 这类聚合物是以上述聚合物的单体为基础的, 直链或支链的或者类似于 PEG 的取代或未取代的聚合物, 但至少有一个用于反应形成砜部分

的活性部位。

下列实施例 1 表明聚乙二醇氯乙基砜的合成、分离和表征,接着是由氯乙基砜制备聚乙二醇乙烯基砜。从砜基第二个碳原子上有反应活性部位的其它高分子砜的制法是相似的,以上列聚合物和下文实施例 1 为基础,其制备步骤对本行业的人是显而易见的。

实施例 1:合成方法

各反应步骤可在结构上举例说明如下:



上述每个反应详细说明如下:

反应 1 反应 1 是聚乙二醇的甲磺酰酯的制备,该酯也可叫做聚乙二醇的甲磺酸酯。甲苯磺酸酯及其卤化物也可用类似方法制备,这对本行业的人是显而易见的。

为制备甲磺酸酯,25g PEG(分子量 3400)在 150ml 甲苯中共沸蒸馏使之干燥。在 PEG 干燥过程中约有一半甲苯被馏出,向甲苯和 PEG 溶液中添加 40ml 无水二氯甲烷,接着在冰浴中冷却。向冷却了的溶液中添加 1.230ml 蒸馏过的甲磺酰氯(1.06 当量,相对于 PEG 羟基)和 2.664ml 无水三乙胺(1.3 当量,相对于 PEG 羟基)。上述“当量”可看做是“化合量”,指的是与 1 当量的 PEG 羟基反应所需化合物的量。

使反应搁置过夜,在此期间使温度保持在室温。有盐酸三乙铵析出,将沉淀用过滤法除去。其后用旋转式汽化法使体积缩减到20ml,加到100ml冷干乙醚中沉淀出甲磺酸酯。核磁共振(NMR)分析表明羟基已100%转化成甲磺酸酯基。

反应2 反应2是甲磺酸酯与巯基乙醇反应生成聚乙二醇巯基乙醇。此反应使PEG的甲磺酸酯基被取代。巯基乙醇基中的硫直接连接到PEG碳-碳主链的碳上。

20g反应1的甲磺酸酯溶于150ml蒸馏水中。甲磺酸酯溶液和水在冰浴中沉浸冷却。向冷却了的溶液中添加2.366ml巯基乙醇(对PEG羟基计为3当量)。还添加16.86ml 2N NaOH溶液。反应回流3小时,此时来自反应的蒸气不断冷凝而返回到反应中。

用二氯甲烷三次萃取聚乙二醇巯基乙醇,每次用约25ml二氯甲烷。收集其有机部分,用无水 $MgSO_4$ 干燥。使体积缩减到20ml,加到150ml冷干乙醚中沉淀出产物。

在 d_6 -DMSO二甲亚砜中NMR分析得到PEG-SCH₂CH₂OH的下列峰值:2.57ppm,三重峰, -CH₂-S-;2.65ppm,三重峰, -S-CH₂-;3.5ppm主链单峰;以及4.76ppm,三重峰, -OH。4.76ppm处的羟基峰表明81%取代度。而2.65ppm峰(-S-CH₂-)表明100%取代度。已经发现,羟基峰往往对取代度给出低数值,因此2.65ppm峰(-S-CH₂-)被认为是更可信赖的,所以确认100%取代度。

反应3 反应3是聚乙二醇巯基乙醇产物的过氧化物氧化,使硫,S,转化成砷,SO₂。生成PEG乙醇砷。

20g PEG-SCH₂CH₂OH溶于30ml 0.123M钨酸溶液中并在冰

浴中冷却。钨酸溶液的制法是将该酸溶解于 NaOH 液 (pH11.5) 中, 然后用冰醋酸将 pH 调节到 5.6。将 20ml 蒸馏水和 2.876ml 30% H_2O_2 (2.5 当量, 相对于羟基计) 添加到钨酸和聚乙二醇巯基乙醇的溶液中, 使温度保持在室温过夜。

氧化产物用二氯甲烷萃取三次, 每次用 25ml 二氯甲烷。收集的有机部分用稀 $NaHCO_3$ 水液洗涤并用无水 $MgSO_4$ 干燥。使体积缩减到 20ml, 加到冷干乙醚中沉淀出 PEG 乙醇砜产物。

在 d_6 - DMSO 二甲亚砜中 NMR 分析得到 PEG - $SO_2CH_2CH_2OH$ 的下列峰值: 3.25ppm, 三重峰, $-CH_2-SO_2-$; 3.37ppm, 三重峰, $-SO_2-CH_2-$; 3.50ppm, 主链; 3.77ppm, 三重峰, $-CH_2OH$; 5.04ppm, 三重峰, $-OH$ 。5.04ppm 处的羟基峰表明 85% 取代度。而 3.37ppm 峰 ($-SO_2-CH_2-$) 表明 100% 取代度, 所以被认为是更可信赖的。

反应 4 反应 4 是聚乙二醇氯乙基砜的合成、分离, 和表征的最终步骤。

为合成该产物, 将 20g PEG - $SO_2CH_2CH_2OH$ 聚乙二醇乙醇砜溶于 100ml 新蒸馏的亚硫酸氯中, 所得溶液回流过夜。上述亚硫酸氯已用喹啉蒸馏过。用蒸馏法除去多余的亚硫酸氯。添加 50ml 甲苯和 50ml 二氯甲烷, 然后用蒸馏法除去。

为分离出产物, PEG 氯乙基砜溶于 20ml 二氯甲烷, 然后加到 100ml 冷干乙醚中析出沉淀。用 50ml 乙酸乙酯使沉淀重结晶以分离出产物。

用核磁共振来表征产物。PEG - $SO_2CH_2CH_2Cl$ 在 d_6 - DMSO 二甲亚砜中的 NMR 分析得出下列峰值: 3.50ppm, 主链; 3.64ppm,

三重峰, $-\text{CH}_2\text{SO}_2-$; 3.80ppm, 三重峰, $-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ 。3.94ppm 处出现细小的羟基杂质三重峰。由于此谱中的各重要峰靠近很大的主链峰, 计算其取代度是很难的。

反应 5 反应 5 是来自反应步骤 4 的聚乙二醇氯乙基砒转化成聚乙二醇乙烯基砒, 以及乙烯基砒产物的分离和表征。

PEG 乙烯基砒可用下法不费力地制备。将固态 PEG 氯乙基砒溶于二氯甲烷溶剂中, 接着添加两个当量的 NaOH 液。滤去溶液中的碱, 蒸去溶剂以分离出最终产物 PEG- $\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ PEG 乙烯基砒。

PEG 乙烯基砒在 d_6 -DMSO 二甲亚砒中用 NMR 分析进行表征。NMR 分析表明下列峰值: 3.50ppm; 主链; 3.73ppm, 三重峰, $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$; 6.21ppm, 三重峰, $=\text{CH}_2$; 6.97ppm, 一对双峰, $-\text{SO}_2-\text{CH}-$ 。6.97ppm 峰 ($-\text{SO}_2-\text{CH}-$) 表明 84% 取代度。6.21ppm 峰 ($=\text{CH}_2$) 表明 94% 取代度。用巯基乙醇和 2,2'-二硫代二吡啶进行滴定表明 95% 取代度。

实施例 2: 硫羟 - 选择性反应性

实施例 2 表明, PEG 乙烯基砒及其前体 PEG 氯乙基砒与硫羟基 ($-\text{SH}$) 起反应, 比与氨基 ($-\text{NH}_2$) 或亚氨基 ($-\text{NH}-$) 起反应显著地更具反应性。含有硫羟基的化合物是与醇 (含有羟基 $-\text{OH}$) 相似的有机化合物。只是在硫醇中, 羟基的氧被硫置换。硫醇有时也叫做巯基或氢巯基化合物。PEG 乙烯基砒含有乙烯基砒基团 $-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ 。PEG 氯乙基砒含有氯乙基砒基团 $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 。

就蛋白质改性而论, 对硫醇的选择性是重要的, 因为这意味着半胱氨酸单元 (含 $-\text{SH}$) 的改性将优先于赖氨酸单元 (含 $-\text{NH}_2$) 和组

氨酸单元(含-NH-)。PEG 乙烯基砜对硫醇的选择性意味着 PEG 能选择性地连接到半胱氨酸单元上,从而保持特定蛋白质的蛋白质活性并控制连接到蛋白质上的 PEG 分子数目。

PEG 乙烯基砜与巯基和与氨基的相对反应性的测定方法是分别测量 PEG 乙烯基砜与 N- α -乙酰基赖氨酸甲酯和与巯基乙醇的反应速率。N- α -乙酰基赖氨酸甲酯是一个含有氨基的赖氨酸模型,缩写为 Lys-NH₂。巯基乙醇用作一个含有巯基的半胱氨酸模型,缩写为 Cys-SH。同样地测定 PEG 氯乙基砜的相对反应性。此砜的分子可用作乙烯基砜的一种“被保护”形式,因为它在酸中是稳定的而当加碱时即转化为 PEG 乙烯基砜。

在 pH8.0、pH9.0 和 pH9.5 下探讨 PEG 乙烯基砜和 PEG 氯乙基砜前体的反应性。用于控制 pH 的缓冲剂是 0.1M 磷酸盐(在 pH8.0 下)和 0.1M 硼酸盐(在 pH9.0 和 pH9.5 下)。为测量巯基乙醇的反应性,向上两种缓冲剂中加 5mM 乙二胺四乙酸(EDTA)以抑制“巯基”转化成“二硫化物”。

为本发明的 PEG 衍生物与 Lys-NH₂ 起反应,在搅拌状态下向 0.3mM Lys-NH₂ 在合适的缓冲剂(分别适用于 pH8.0 和 pH9.0, pH9.5)溶液中添加 3mM PEG 衍生物溶液。向反应溶液中添加荧光胺,与剩余的氨基反应生成荧光衍生物,用来监控这一反应。监控步骤的实行是向 1.950mL 磷酸盐缓冲液(pH8.0)中添加 50 μ L 反应混合物,接着在剧烈搅拌下添加 1.0mL 荧光胺溶液。该荧光胺溶液是 0.3mg 荧光胺/ml 丙酮。

混合 10 分钟后测量荧光,波长 390nm 处显示激发,475nm 处发光。无论 PEG 乙烯基砜或者 PEG 氯乙基砜在 pH8.0 下,24 小时内

都没看到反应。在 pH9.5 下反应迟缓,但几天之后全部氨基都已起反应。

为 PEG 乙烯基砒和 PEG 氯乙基砒前体与 Cys-SH 起反应,向 0.2mM Cys-SH 在合适的缓冲剂(分别适用于 pH8.0 和 pH9.0, pH9.5)中的溶液中添加 2mM PEG 衍生物溶液。向反应溶液中添加 4-二硫代吡啶,用来监控这一反应。4-二硫代吡啶化合物与 Cys-SH 起反应生成 4-硫代吡啶酮,此物吸收紫外线。

监控步骤的实行是向 0.950mL 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH8.0 并含有 5mM EDTA)中添加 50 μ L 反应混合物,接着添加 1mL 2mM 4-二硫代吡啶在同样缓冲液中。

在 324nm 处测量 4-硫代吡啶酮的吸光度。PEG 乙烯基砒和 PEG 氯乙基砒都显示对 Cys-SH 的反应性,PEG 乙烯基砒的反应性较强。在 pH9.0 下,使用乙烯基砒,反应在 2 分钟内完成;使用氯乙基砒,反应在 15 分钟内完成。但是,就测定准确的速度常数而论,上述反应进行太快。pH8.0 下反应进行较慢,但仍分别在 1 小时(乙烯基砒)和 3 小时(氯乙基砒)内完成。氯乙基砒转化成乙烯基砒的反应速度明显慢于乙烯基砒与 Cys-SH 的反应。因而氯乙基砒与 Cys-SH 的反应速率可以认为是取决于氯乙基砒转化成乙烯基砒的速率。尽管如此,这些反应速率仍然大大快于与 Lys-NH₂ 起反应的速率。

上述动力学研究证明下列各点。PEG 乙烯基砒与巯羟基起反应,比与氨基起反应容易得多,这表明,PEG 乙烯基砒与一种既含半胱氨酸又含赖氨酸基团的蛋白质的连接方法主要是按与半胱氨酸起反应的方式进行的。由于与氨基的反应性类似于与亚氨基,那末组

氨酸亚单元的反应性也将比与半胱氨酸亚单元的反应性低得多。同样,对 PEG 氯乙基砜和 PEG 乙烯基砜而言对巯基的选择性强调在低 pH 值下,尽管 PEG 氯乙基砜的反应略慢一些。

许多 PEG 衍生物的实用受到限制,因为它们迅速与水起反应,从而妨碍在含水条件下将 PEG 衍生物连接到分子和表面的尝试。下列实施例 3 表明,PEG 乙烯基砜和 PEG 氯乙基砜在水中是稳定的。

实施例 3:水解稳定性

使 PEG 乙烯基砜溶解在重水(D_2O)中,用 NMR 监控。反应没有发生。PEG 氯乙基砜溶液在用硼酸盐缓冲到 pH9.0 的重水中生成 PEG 乙烯基砜。用 NMR 监控表明,PEG 乙烯基砜在生成以后,能在重水中稳定三天。

PEG 氯乙基砜在水中是稳定的直到溶液变成碱性为止,此时它转化成乙烯基砜。将 PEG 氯乙基砜溶解于水(pH7)和溶解于硼酸盐缓冲液(pH9)的实验说明了它向乙烯基砜的转化。将 PEG 衍生物萃取到二氯甲烷中。除去二氯甲烷,继之以 NMR 分析表明,PEG 氯乙基砜在中性的 pH7.0 下是稳定的,与碱反应生成 PEG 乙烯基砜。

乙烯基砜在水中,即使在碱性的 pH 下能够稳定若干天。PEG 乙烯基砜的广范围的水解稳定性和巯基特定反应性意味着,PEG 乙烯基砜及其前体可用于在含水条件下分子和表面的改性,如下列实施例 4 所示。

实施例 4:蛋白质的结合物

用两种不同方法将 PEG 衍生物连接到牛血清蛋白(BSA)上,以

实验说明蛋白质的改性。BSA 是一种蛋白质。天然未改性的 BSA 含有胱氨酸(不带巯基)基。胱氨酸单元连起来成二硫化物键, S-S。

在第一种方法中,使 m-PEG 乙烯基砒(分子量 5000)在室温下与溶于 0.1M 硼酸盐缓冲液(pH9.5)中的未改性 BSA 反应 24 小时。每 ml 该溶液含 1mg BSA 和 1mg m-PEG 乙烯基砒(分子量 5000)。实施例 2 模型化合物的实验结果已表明,赖氨酸亚单元(或许还有组氨酸亚单元)在上述较碱性的条件和没有可供反应的游离巯基的情况下将会得到改性。

连接到赖氨酸亚单元的反应可用两种方式加以实验说明。第一,体积排阻色谱法表明,蛋白质的分子量已经增大约 50%,从而表示约有 10 个 PEG 连接到蛋白质上。第二,荧光胺分析表明,BSA 分子中赖氨酸基团的数目已经减少到约 10。

在第二种方法中,用三丁膦处理 BSA,使二硫化物键 S-S 还原成巯基, -SH, 该基可供反应之用。然后用 PEG 氯乙基砒的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH8.0)在室温下处理改性 BSA 达 1 小时。每 ml 该溶液含 1mg 改性 BSA 和 1mg m-PEG 氯乙基砒(分子量 5,000)。实验结果表明,赖氨酸基团在此条件下是不起反应的。但是,巯基是可起反应的。

PEG 连接到蛋白质上的反应已用体积排阻色谱法加以实验说明,表明蛋白质的分子量已经增大约 25%。荧光胺分析表明蛋白质中的赖氨酸亚单元数目没有变化,从而确认,赖氨酸亚单元上没有发生 PEG 连接。由此确认取代在巯基上。

在这里要求保护的发明已就特定的示范实施方案作了描述。但

是,以上描述的意图不是想把本发明局限于该示范实施方案本身。本行业的人应该认识到,在上面说明书中所述本发明的精神和范围之内是可以作出变动的。恰恰相反,本发明包括所有可供选择的方案、变化以及等效部分,它们均包括在下文权利要求书界定的本发明的精神和范围之内。