



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



FI000117441B

(10) FI 117441 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

13.10.2006

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C08G 65/32 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

962004

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

10.05.1996

(24) Alkupäivä - Löpdag

14.11.1994

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

10.05.1996

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US94/13013

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

12.11.1993 US 151481 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Shearwater Polymers,, Inc., 2130 Memorial Parkway S.W., Huntsville, AL 35801, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Harris,J. Milton, 3119 Highland Plaza, Huntsville, AL 35801, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Vesiliukoisia aktiivisia polyeteeniglykolisulfoneja
Vattenlösliga aktiva polyetenglykolsulfoner

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

WO 93/01498 A1

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee polyeteeniglykolijohdosta, joka on aktivoitu sulfoniosalla, joka soveltuu kytkettäväksi selektiivisesti molekyyleissä ja pinnoilla läsnä oleviin tioliryhmiin. Aktivoitu PEG on vesiliukoinen ja stabiili hydrolyysiä vastaan pitkiä aikoja ja muodostaa hydrolyysinkestäviä sidoksia tioliryhmien kanssa. Sidokset eivät yleensä ole reversiibeleitä pelkistävissä ympäristöissä. PEG-johdos soveltuu aineiden (biologisesti aktiiviset molekyylit ja pinnat mukaan luettuina) ominaisuuksien muuntamiseen niiden tekemiseksi biosopiviksi. Keksintö koskee myös menetelmiä aktiivisen PEG:n valmistamiseksi sekä aktiivisen PEG:n ja muiden aineiden, joihin kuuluvat biologisesti aktiiviset aineet, välisten konjugaattien valmistamiseksi.

Uppfinningen avser ett polyetenglykolderivat, som har aktiverats med en sulfondel för selektiv bindning vid tiolgrupper i molekyler och på ytor. Aktiverad PEG är vattenlöslig och stabil mot hydrolys under långa tider och bildar hydrolytiskt stabila bindningar med tiolgrupper. Bindningarna är i allmänhet inte reversibla i reducerande miljö. PEG-derivatet lämpar sig för modifiering av egenskaperna hos substanser (biologiskt aktiva molekyler och ytor medräknade) för att förläna dem biokompatibilitet. Uppfinningen avser även förfaranden för framställning av aktiv PEG samt för framställning av konjugat av aktiv PEG och andra substanser, bl.a. biologiskt aktiva substanser.

Vesiliukoisia aktiivisia polyeteeniglykolisulfoneja**Keksinnön alue**

5 Tämä keksintö koskee polyeteeniglykolin ja sitä lähellä olevien hydrofiilisten polymeerien aktiivisia johdoksia sekä menetelmiä niiden valmistamiseksi käytettäviksi pintojen ja molekyylien ominaisuuksien muuntamisessa.

Keksinnön tausta

10 Polyeteeniglykolia (PEG) on tutkittu lääkkeissä, tekoimplantaateissa ja muissa sellaisissa sovelluksissa, joissa bio(loginen yhteen)sopivuus on tärkeää, käyttöä ajatellen. On esitetty monenlaisia polyeteeniglykolin johdoksia (PEG-johdoksia), jotka sisältävät aktiivisen osan, jonka tarkoituksena on tehdä mahdolliseksi PEG:n liittämisen lääkkeisiin ja implantaatteihin sekä molekyyliin ja pintoihin tavallisesti molekyylin tai pinnan fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien muuntamiseksi.

15 On esimerkiksi esitetty PEG-johdoksia PEG:n liittämiseksi pintoihin kosteuden, sähköstaattisten kerrostumien ja muuntyyppisten molekyylien, mm. proteiinien tai proteiinitähteiden, kiinnittymisen pintoihin torjumiseksi. Aivan erityisesti PEG-johdoksia on ehdotettu liitettäväksi muovisten piilolinssien pintoihin proteiinien kerrostumisen ja näön sumenemisen vähentämiseksi. PEG-johdoksia on ehdotettu liitettäväksi tekoverisuoniin proteiinien kasaantumisen ja tukoksen vaaran pienentämiseksi. PEG-johdoksia on ehdotettu proteiinien kiinnittämiseen (immobilisointiin) pinnoille, esimerkiksi katalysoitaessa kemiallisia reaktioita entsyymeillä.

20
25
30 Lisäesimerkeissä PEG-johdoksia on vielä ehdotettu liitettäväksi molekyyliin, mm. proteiineihin, molekyylin suojaamiseksi kemialliselta vaikutukselta, molekyylin haitallisten vaikutusten supistamiseksi tai molekyylin koon kasvattamiseksi ja siten mahdollisesti käyttökelpoisten aineiden aikaansaamiseksi, joista on jotakin lääketieteel-

35

listä hyötyä mutta jotka eivät muuten ole käyttökelpoisia tai ovat jopa vahingollisia elävälle organismille. Pienet molekyylit, jotka normaalisti erittyisivät munuaisten kautta, saadaan säilymään verenkierrossa, jos niiden kokoa kasvatetaan liittämällä niihin biosopiva PEG-johdos. Proteiinit ja muut aineet, jotka injektoituina aiheuttavat immuunivasteen, voidaan kätkeä jossakin määrin immuunijärjestelmältä liittämällä proteiiniin PEG-molekyyli.

On myös ehdotettu PEG-johdoksia esimerkiksi entsyymien erottamiseen affiniteetin perusteella solumassasta. Affiniteettiin perustuvassa partitiossa PEG-johdos sisältää funktionaalisen ryhmän, joka soveltuu kytkettäväksi reversiibelisti solumassan sisältämään entsyymiin. PEG-entsyymikonjugaatti erotetaan solumassasta, ja haluttaessa entsyymi erotetaan sitten PEG-johdoksesta.

PEG-johdosten kytkentä proteiineihin havainnollistaa eräitä niistä ongelmista, joita on kohdattu PEG:n liittämisen pintoihin ja molekyyliin. Monien pintojen ja molekyylien tapauksessa kytkentäreaktioihin PEG-johdoksen kanssa käytettävissä olevien asemien lukumäärä on jossakin määrin rajoitettu. Esimerkiksi proteiineissa kytkentään on tyypillisesti käytettävissä rajoitettu määrä reaktiivisia asemia, jotka ovat aivan tiettyä tyyppiä. Vielä ongelmallisempaa on se, että jotkut reaktiivisista asemista saattavat vastata proteiinin biologisesta aktiivisuudesta, kuten on asia entsyymien katalysoidessa tiettyjä kemiallisia reaktioita. Riittävään määrään sellaisia asemia sitoutunut PEG-johdos voisi vaikuttaa haitallisesti proteiinin aktiivisuuteen.

Reaktiiviset asemat, jotka muodostavat PEG-johdosten kiinnittymisen proteiineihin mahdollistavat paikat, määrää proteiinin rakenne. Proteiinit, entsyymit mukaan luettuina, koostuvat erilaisista alfa-aminohapposekvensseistä, joilla α -aminohapoilla on yleinen rakenne $H_2N-CHR-COOH$. Yhden aminohapon α -aminoryhmä (H_2N-) liittyy yhteen

viereisen aminohapon karboksyyli­ryhmän (-COOH) kanssa, jolloin muodostuu amidisidoksia, joita voidaan kuvata kaavalla $-(NH-CHR-CO)_n-$, jossa alaindeksi n voi olla satoja tai tuhansia. R:n edustama osa voi sisältää reaktiivisia asemia, jotka vastaavat proteiinin biologisesta aktiivisuudesta ja soveltuvat PEG-johdosten liittämiseen.

Esimerkiksi lyysiinissä, joka aminohappo muodostaa osan useimpien proteiinien rungosta, esiintyy sekä epsilon- että α -asemassa ryhmä $-NH_2$. $\epsilon-NH_2$ on vapaa reagoimaan emäksisissä olosuhteissa. Suuri osa alan tutkimustyöstä on kohdistunut proteiinin lyysiiniosan $\epsilon-NH_2$ -ryhmään liitettäviksi soveltuvien PEG-johdosten kehittämiseen. Kyseisille PEG-johdoksille on kaikille yhteistä se, että proteiinin lyysiiniaminohappo-osa tavallisesti inaktivoituu, mikä saattaa olla negatiivinen seikka silloin, kun lyysiini on tärkeä proteiinin aktiivisuuden kannalta.

US-patenttijulkaisu 5 122 614 (Zalipsky) paljastaa, että funktionaalisella oksikarbonyyli-N-dikarboksimidiryhmällä aktivoitunut PEG-molekyylit voidaan liittää polypeptidin aminoryhmään uretaanisidoksella vesipitoisissa emäksisissä olosuhteissa. Aktivoitunut PEG-B-sukkiini-imidikarbo­naatin mainitaan muodostavan stabiileja, hydrolyysinkestäviä uretaanisidoksia aminoryhmien kanssa. Aminoryhmä näyttää olevan reaktiivisempi emäksisellä pH-alueella (noin 8,0 - 9,5), ja reaktiivisuus putoaa jyrkästi pH:n laskies­sa. Kytkemättömän PEG-johdoksen hydrolysoituminen lisääntyy kuitenkin myös voimakkaasti pH-alueella 8,0 - 9,5. Zalipsky on välttänyt kytkemättömän PEG-johdoksen ja veden välisen reaktion nopeuden kasvuun liittyvän ongelman käyttämällä proteiinien pintaan sitomisessa ylimäärin PEG-johdosta. Ylimäärää käyttämällä PEG:hen saadaan sidotuksi riittävä määrä reaktiivisia ϵ -aminohapporyhmiä proteiinin muuntamiseksi, ennen kuin PEG-johdos pääsee hydrolysoitumaan ja muuttumaan reaktiokyvottomäksi.

Zalipskyn menetelmä on riittävä proteiinin lysini-
osan liittämiseksi PEG-johdokseen yhteen aktiiviseen ase-
maan. Mikäli PEG-johdoksen hydrolysoitumisnopeus kuitenkin
on merkittävä, voi olla ongelmallista saada aikaan liitty-
minen useampaan kuin yhteen PEG-molekyylin aktiiviseen
5 asemaan, koska pelkkä ylimäärä ei pienennä hydrolysoitu-
misnopeutta.

Esimerkiksi lineaarinen PEG, joka sisältää aktiivi-
sen aseman kummassakin päässä, liittyy proteiiniin toi-
sesta päästään mutta, jos hydrolysoitumisnopeus on merkit-
10 tävä, reagoi toisesta päästään veden kanssa, jolloin siitä
tulee suhteellisen reaktiokyvyttömällä hydroksyyli-
ryhmällä, jonka rakenne voidaan esittää kaavalla -OH, va-
rustettu sen sijaan, että se muodostaisi "koiranluu"-mole-
15 kyytirakenteen kumpaankin päähän sitoutuneiden proteiinien
tai muiden toivottujen ryhmien kanssa. Samankaltainen on-
gelma syntyy, jos pintaan halutaan liittää molekyyli PEG-
kytkentäaineen avulla, koska PEG liittyy ensin pintaan tai
kytketty molekyyliin, ja PEG-johdoksen vastakkaisen pään
20 täytyy säilyä aktiivisena myöhempää reagoitua varten. Jos
ongelmana on hydrolysoituminen, vastakkainen pää tyypilli-
sesti inaktivoituu.

Zalipskyn nimissä olevassa US-patenttijulkaisussa
5 122 614 on myös tuotu esille useita muita PEG-johdoksia
25 aikaisemmista patenttijulkaisuista. PEG-sukkinoyyli-N-hyd-
roksisukkiini-imidiesterin mainitaan muodostavan esterisi-
doksia, joiden stabiilisuus on rajoitettu vettä sisältä-
vissä väliaineissa, mikä on osoitus ikävän lyhyestä puo-
liintumisajasta tämän johdoksen tapauksessa. PEG-syanuuri-
30 happokloridista mainitaan, että sillä on ikävän suuri myr-
kyllisyys ja että se ei kykene reagoimaan spesifisesti
määrättyjen proteiinissa läsnä olevien funktionaalisten
ryhmien kanssa. PEG-syanuurihappokloridijohdoksella saat-
taa siksi olla epätoivottavia sivuvaikutuksia ja se saat-
35 taa vähentää proteiinin aktiivisuutta, koska se liittyy

5 moniin erityyppisiin aminohappoihin erilaisiin reaktiivisiin aseisiin. PEG-fenyylikarbonaatin mainitaan tuottavan myrkyllisiä hydrofobisia fenoliryhmiä, joilla on affiniteettia proteiineja kohtaan. Karbonyylidi-imidatsolilla aktivoidun PEG:n mainitaan olevan liian hidas reagoimaan proteiinien funktionaalisten ryhmien kanssa ja vaativan pitkiä reaktioaikoja, ennen kuin proteiini saadaan muunnetuksi riittävässä määrin.

10 Lisäksi on ehdotettu muita PEG-johdoksia liitettäviksi muihin aminohappojen funktionaalisiin ryhmiin kuin lysiinin ϵ -NH₂-ryhmään. Histidiini sisältää reaktiivisen iminoryhmän, jonka rakenne voidaan esittää kaavalla -N(H)-, mutta monet johdokset, jotka reagoivat ϵ -NH₂-ryhmän kanssa, reagoivat myös ryhmän -N(H)- kanssa. Kysteiini
15 sisältää reaktiivisen tioliryhmän, jonka rakenne voidaan esittää kaavalla -SH, mutta PEG:n maleimidijohdoksella, joka kykenee reagoimaan kyseisen ryhmän kanssa, on taipumus hydrolysoitua.

20 Kuten edellä esitetystä pienestä otannasta voidaan havaita, huomattavia ponnistuksia on uhrattu erilaisten PEG-johdosten kehittämiseen liitettäviksi varsinkin erilaisten proteiinien lysiiniaminohappo-osan NH₂-ryhmään. Monien näiden johdosten valmistus ja käyttö ovat osoittautuneet ongelmallisiksi. Jotkut niistä muodostavat proteiinin kanssa epästabiileja sidoksia, joilla on taipumus hydrolysoitua ja jotka eivät siksi ole pysyviä kovin pitkään vesipitoisissa ympäristöissä, kuten verenkierrossa. Toiset muodostavat stabiilimpia sidoksia, mutta niillä on taipumus hydrolysoitua ennen sidoksen muodostumista, mikä merkitsee sitä, että PEG-johdoksessa läsnä oleva reaktiivinen
30 ryhmä saattaa inaktivoitua, ennen kuin proteiini kyetään liittämään siihen. Eräät ovat jossakin määrin myrkyllisiä ja soveltuvat sen vuoksi melko huonosti käytettäväksi *in vivo*. Jotkut ovat liian hitaita reagoimaan ollakseen käytännössä käyttökelpoisia. Jotkut johtavat proteiinin ak-
35

tiivisuuden häviämiseen sitoutumalla asemiin, jotka vastaavat proteiinin aktiivisuudesta. Jotkut eivät ole spesifisiä niiden asemien suhteen, joihin ne liittyvät, mistä voi myös olla tuloksena toivotun aktiivisuuden menetys ja se, että ei saavuteta toistettavissa olevia tuloksia.

Keksinnön yhteenveto

Keksintö tarjoaa käytettäväksi polyeteeniglykolin (PEG) ja sitä lähellä olevien hydrofiilisten polymeerien vesiliukoisia ja hydrolyysinkestäviä johdoksia, jotka sisältävät yhden tai useamman aktiivisen sulfoniosan. Kyseiset aktiivisia sulfoniosia sisältävät polymeerijohdokset kytkeytyvät hyvin selektiivisesti molekyyलेissä ja pinnoilla läsnä oleviin tioliryhmiin aminoryhmien sijasta, erityisesti noin pH:ssa 9 tai sen alapuolella. Sulfoniosa, polymeerin ja sulfoniosan välinen sidos ja tioliryhmän ja sulfoniosan välinen sidos eivät yleensä ole reversiibelejä pelkistävässä ympäristössä ja ovat stabiileja hydrolyysiä vastaan pitkiä aikoja vesipitoisissa ympäristöissä noin pH:ssa 11 tai sen alapuolella. Monien erilaisten aineiden fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia voidaan siis muuntaa vaativissa vesipitoisissa olosuhteissa polymeerien aktiivisilla sulfonijohdoksilla.

Biologisesti aktiivisten aineiden muuntamisessa käytettävät olosuhteet voidaan esimerkiksi optimoida korkea-asteisen biologisen aktiivisuuden säilyttämiseksi. Lääkkeitä aspiriinista penisilliiniin voidaan muuntaa sopivasti liittämällä niihin polymeerien aktiivisia sulfonijohdoksia, mikäli kyseiset lääkkeet muunnetaan tioliryhmiä sisältäviksi. Myös suurikokoisia proteiineja, jotka sisältävät kysteiiniyksikköjä, joissa esiintyy aktiivisia tioliryhmiä, voidaan muuntaa hyödyllisellä tavalla. Kysteiiniryhmien liittämiseen proteiiniin haluttuihin asemiin voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-tekniikan ("geenitekniikan") menettelytapoja. Kysteiiniryhmiä voidaan liittää polymeerien aktiivisiin sulfonijohdoksiin hydrolyysinkest-

tävien sidosten aikaansaamiseksi erilaisiin proteiineihin, jotka eivät normaalisti sisällä kysteiniyksikköjä.

5 Keksinnön mukaisiin aktivoituihin polymeereihin soveltuvia sulfoniosia ovat nimenomaan sellaiset, jotka sisältävät vähintään kaksi sulfoniryhmään $-SO_2-$ liittynyttä hiiliatomia ja toisessa hiiliatomissa sulfoniryhmästä las-

10 Tarkemmin määriteltynä aktiivisia sulfoniosia ovat vinyylisulfoni, aktiiviset etyyllisulfonit, mukaan luettui-
na halogeenietyyllisulfonit, sekä näiden sulfonien tioli-
spesifiset aktiiviset johdokset. Vinyylisulfoniryhmän ra-
kenne voidaan esittää kaavalla $-SO_2-CH=CH_2$; aktiivisen
15 etyyllisulfoniryhmän rakenne voidaan esittää kaavalla $-SO_2-$
 CH_2-CH_2-Z , jossa Z on halogeeni tai jokin muu poistuva ryh-
mä, joka on korvattavissa tiolilla sulfoni-tiolisidoksen
 $-SO_2-CH_2-CH_2-S-W$ muodostamiseksi, jossa W tarkoittaa biolo-
gisesti aktiivista molekyyliä, pintaa tai jotakin muuta
20 ainetta. Vinyyli- ja etyyllisulfonin johdokset voivat si-
sältää muita substituentteja, kunhan vesiliukoisuus ja
toisessa hiilessä esiintyvän reaktiivisen aseman tiolispe-
sifinen reaktiivisuus säilyvät.

 Keksinnön piiriin kuuluvat tioliryhmiä sisältävien
25 aineiden ja aktiivisia sulfoniosia sisältävien polymeeri-
johdosten väliset hydrolyysinkestävät konjugaatit. Esimer-
kiksi vesiliukoinen, sulfonilla aktivoitu PEG-polymeeri
voidaan kytkeä biologisesti aktiivisen molekyyliin reak-
tiiviseen tioliasemaan. Sidos, jolla PEG ja biologisesti
aktiivinen molekyyli kytketään yhteen, käsittää tioliryh-
30 mään kytkeytyneen sulfoniosan ja sen rakenne on $PEG-SO_2-$
 CH_2-CH_2-S-W , jossa W tarkoittaa biologisesti aktiivista
molekyyliä, olipa sulfoniosa ennen PEG:n kytkentää vinyylisulfoni tai aktiivinen etyyllisulfoni.

 Keksinnön piiriin kuuluvat myös biomateriaalit,
35 jotka käsittävät pinnan, joka sisältää yhden tai useamman

reaktiivisen tioliaseman, ja yhden tai useamman keksinnön mukaisen, vesiliukoisen, sulfonilla aktivoitun polymeerin kytkettynä pintaan sulfoni-tiolisidoksella. Biomateriaalit ja muut aineet voidaan myös kytkeä sulfonilla aktivoituihin polymeerijohdoksiin muulla sidoksella kuin sulfoni-tiolisidoksella, esimerkiksi tavanomaisella amiinisidoksella, jolloin myöhempiin reaktioihin jää käytettäväksi hydrolyysiä vastaan stabiilimpi aktivoiva ryhmä, sulfoni-osa.

10 Keksinnön piiriin kuuluu menetelmä keksinnön mukaisten aktivoitujen polymeerien valmistamiseksi. Rikkiä sisältävä osa sidotaan suoraan polymeerin hiiliatomiin ja muunnetaan sitten aktiiviseksi sulfoniosaksi. Vaihtoehtoisesti sulfoniosa voidaan valmistaa liittämällä tavanomaiseen aktivoituun polymeeriin kytkentäaine, joka sisältää toisessa päässään sulfoniosan, sillä tavalla, että tuloksena olevassa polymeerissa sulfoniosa sijaitsee pääteasemassa.

20 Tarkemmin ilmaistuna vesiliukoinen polymeeri, joka sisältää ainakin yhden aktiivisen hydroksyyli-ryhmän, reagoi ja muuttuu substituoiduksi polymeeriksi, joka sisältää vielä reaktiivisemmän ryhmän. Tuloksena oleva substituoitu polymeeri reagoi edelleen niin, että reaktiivisempi ryhmä korvautuu rikkiä sisältävällä osalla, joka sisältää vähintään kaksi hiiliatomiä, jolloin rikkiä sisältävän osan rikki sitoutuu suoraan polymeerin hiiliatomiin. Rikkiä sisältävä osa osallistuu sitten reaktioihin rikkin (-S-) hapettamiseksi sulfoniryhmäksi (-SO₂-) ja riittävän reaktiivisen aseman aikaansaamiseksi sulfoniryhmän sisältävän osan toiseen hiiliatomiin, jotta se kykenee muodostamaan sidoksia tioliryhmän sisältävien osien kanssa.

30 Vielä tarkemmin määriteltynä menetelmä keksinnön mukaisten aktivoitujen polymeerien valmistamiseksi käsittää polyeteeniglykolin reaktion yhdisteen kanssa, joka aktivoi hydroksyyli-ryhmän, esterin muodostamiseksi tai

35

halogeenia sisältävän johdoksen kanssa halogeenisubstituoidun PEG:n muodostamiseksi. Tuloksena olevan aktivoitun PEG:n annetaan sitten reagoida merkaptoetanolin kanssa esteriosan tai halogenidin korvaamiseksi merkaptoetanoli-
5 ryhmällä. Merkaptoetanoliosan sisältämä rikki hapetetaan sulfoniryhmäksi. Etanolisulfoni aktivoidaan joko aktivoimalla hydroksyyli-ryhmä tai korvaamalla hydroksyyli-ryhmä aktiivisemmalla ryhmällä, kuten halogeenilla. Aktiivinen PEG:n etyylisulfoni voidaan sitten muuntaa vinyylisulfo-
10 niksi, mikäli niin halutaan, lohkaisemalla siitä aktivoitu hydroksyyli-ryhmä tai muu aktiivinen osa ja muodostamalla sulfoniryhmän $-SO_2-$ viereen hiili-hiilikaksoissidos.

Keksinnön piiriin kuuluu myös menetelmä aineen ja polymeerijohdoksen, joka sisältää aktiivisen sulfoniosan, välisen konjugaatin valmistamiseksi. Menetelmä käsittää
15 vaiheen, jossa polymeerijohdoksen ja kyseisen aineen välille muodostetaan sidos, joka voi olla sulfoniosan ja tioliryhmän välinen.

Keksinnön avulla saadaan siis aikaan aktivoituja
20 polymeereja, joilla on spesifinen reaktiivisuus, jotka ovat stabiileja vesipitoisissa ympäristöissä ja jotka muodostavat stabiilimpia sidoksia pintojen ja molekyylien kanssa, biologisesti aktiiviset molekyylit mukaan luettuna, kuin tähän saakka on kyetty saavuttamaan. Aktivoitua polymeeria voidaan käyttää pintojen ja molekyylien ominaisuuksien muuntamiseen silloin, kun biosopivuus on tärkeää. Koska aktivoitu polymeeri on stabiili vesipitoisissa olo-
25 suhteissa ja muodostaa stabiileja sidoksia tioliryhmien kanssa, voidaan valita biologisesti aktiivisten aineiden aktiivisuuden säilyttämisen ja polymeerinkytkeäreaktion nopeuden optimoinnin kannalta edullisimmat reaktio-olosuhteet.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Polyeteeniglykolin ja sitä lähellä olevien polymeeri-
35 rien aktiivisten sulfonien valmistuksessa käytettävä syn-

tetisointitie käsittää vähintään neljä vaihetta, joissa polymeerimolekyyliin liitetään rikkiä, joka muunnetaan sitten sarjalla reaktioita aktiiviseksi funktionaaliseksi sulfoniryhmäksi. Lähtö-PEG-polymeerimolekyyli sisältää
5 ainakin yhden sellaisen hydroksyyli-ryhmän (-OH), joka kykenee osallistumaan kemiallisiin reaktioihin ja jonka katsotaan olevan "aktiivinen" hydroksyyli-ryhmä. PEG-molekyyli voi sisältää useita aktiivisia hydroksyyli-ryhmiä, jotka ovat käytettävissä kemiallisiin reaktioihin, niin kuin
10 jäljempänä on selitetty. Kyseiset aktiiviset hydroksyyli-ryhmät ovat itse asiassa suhteellisen reaktiokyvyttömiä, ja synteessin ensimmäinen vaihe on valmistaa PEG, joka sisältää reaktiivisemmän ryhmän.

Reaktiivisempi ryhmä saadaan tyypillisesti aikaan jommallakummalla kahdesta tavasta, aktivoimalla hydroksyyli-ryhmä tai substituutiolla. Muitakin käyttökelpoisia menetelmiä, joiden pitäisi olla ammattimiehelle selviä, on olemassa, mutta hydroksyyli-ryhmän aktivointi ja substitutio ovat kaksi yleisimmin käytettyä. Aktivoitaessa hydroksyyli-ryhmä ryhmän -OH vetyatomi (-H) korvataan aktiivisemmalla ryhmällä. Tyypillisesti hapon tai happojohdoksen, kuten happohalogenidin, annetaan reagoida PEG:n kanssa reaktiivisen esterin muodostamiseksi, jossa PEG ja happo-osa ovat liittyneet yhteen esterisidoksen välityksellä.
15 Happoryhmä on yleensä reaktiivisempi kuin hydroksyyli-ryhmä. Tyypillisiä estereitä ovat sulfonaatti-, karboksylaatti- ja fosfaattiesterit.
20

Sulfonyylihalogenideihin, jotka ovat sopivia käytettäväksi keksinnön käytännön sovelluksissa, kuuluvat metaanisulfonyylikloridi ja p-tolueenisulfonyylikloridi. Metaanisulfonyylikloridin rakennekaava on $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, ja se tunnetaan myös mesyylikloridina. Metaanisulfonyliestereitä nimitetään toisinaan mesylaateiksi. Tolueenisulfonyylikloridin rakennekaava on $\text{H}_3\text{CC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$, ja se tunnetaan myös
30

tosyylikloridina. Tolueenisulfonyliestereitä nimitetään toisinaan tosylateiksi.

Substituutioreaktiossa koko PEG:n OH-ryhmä korvataan reaktiivisemmalla osalla, tyypillisesti halogeenilla. Esimerkiksi tionyylikloridin, jonka rakennekaava on SOCl_2 , voidaan antaa reagoida PEG:n kanssa reaktiivisemmän kloorisubstituoidun PEG:n muodostamiseksi. Hydroksyyli-ryhmän korvaamista toisella ryhmällä kutsutaan alalla toisinaan hydroksyyli-ryhmän aktivoinniksi. Tässä ilmaisu "hydroksyyli-ryhmän aktivointi" tulisi käsittää niin, että se tarkoittaa sekä korvausta että esteröintiä ja muita menetelmiä hydroksyyli-ryhmän aktivoimiseksi.

Termit "ryhmä", "funktionaalinen ryhmä", "osa", "aktiivinen osa", "reaktiivinen asema" ja "radikaali" ovat kemian alalla jossakin määrin synonyymisiä, ja niitä käytetään alan kirjallisuudessa ja tässä molekyylien erillisistä, rajattavissa olevista osista tai yksiköistä sekä yksiköistä, joilla on tietty tehtävä tai aktiivisuus ja jotka kykenevät reagoimaan muiden molekyylien tai molekyylien osien kanssa. Tässä mielessä proteiinin tai proteiinitähteen voidaan katsoa olevan molekyyli tai funktionaalinen ryhmä tai osa, kun se on kytkeytyneenä polymeeriin.

Termiä "PEG" käytetään alan kirjallisuudessa ja tässä kaikista niistä monista eteeniglykolin kondensaatio-polymeereista, joiden rakennetta kuvaa yleinen kaava $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, joka voidaan esittää myös muodossa $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OH}$. PEG tunnetaan myös polyoksietyleeninä, polyeteenioksidina, polyglykolina ja polyeetteriglykolina. PEG voidaan valmistaa eteenioksidin ja monien muiden monomeerien kopolymeereina.

Polyeteeniglykolia käytetään biologisissa sovelluksissa siksi, että sillä on ominaisuuksia, joita ovat erityyppisiä toivottavia ja yleensä hyviksi todettuja biologisten ja bioteknisten sovellusten kannalta. PEG on tyypillisesti kirkas, väritön, hajuton, veteen liukeneva, kuumennusta

kestävä, inertti monia kemiallisia aineita kohtaan ja myrkytön eikä hydrolysoitu tai hajoa. Polyeteeniglykolia pidetään biosopivana, jolla tarkoitetaan sitä, että PEG voi esiintyä yhdessä elävien kudosten tai organismien kanssa aiheuttamatta vahinkoa. Tarkemmin ilmaistuna PEG ei ole immunogeeninen, ts. PEG:llä ei taipumusta aiheuttaa kehos-
5 sa immuunivastetta. Ollessaan sitoutuneena osaan, jolla on jokin toivottu tehtävä kehossa, PEG yleensä peittää kyseisen osan ja pystyy pienentämään tai eliminoimaan mahdollisen immuunivasteen niin, että organismi voi sietää kyseisen osan läsnäolon. Keksinnön mukaisten, sulfonilla aktivoitujen PEG:ien pitäisi siis olla suurin piirtein myrkyttömiä eikä niillä pitäisi olla taipumusta aiheuttaa immuunivastetta tai koaguloimista tai muita ei-toivottuja vaikutuksia.
10
15

Toinen vaihe synteisissä on rikin liittäminen suoraan polymeerin hiiliatomiin sellaisessa muodossa, että se voidaan muuntaa etyyli-sulfoniksi tai etyyli-sulfonijohdokseksi, jolla on samanlaiset reaktio-ominaisuudet. Termi "etyyli" tarkoittaa osaa, joka käsittää kahdesta toisiinsa liittyneestä hiiliatomista koostuvan, identifioitavissa olevan ryhmän. PEG:n aktiivinen sulfonijohdos edellyttää, että ketjun toinen hiiliatomi sulfoniryhmästä laskettuna tarjoaa reaktiivisen aseman tioliryhmien liittämiseksi sulfoniin. Tähän tulokseen voidaan päästä antamalla edellä mainitussa ensimmäisessä vaiheessa muodostetun aktiivisen osan, joka on tyypillisesti esteri- tai halogenidisubstituoitu PEG, reagoida (substituutioreaktio) alkoholin kanssa, joka sisältää myös reaktiivisen tioliryhmän sitoutuneena etyyli-ryhmään, tioetanoliolosan kanssa. Tioliryhmä hapetetaan sulfoniksi ja etyyli-ryhmän toinen hiiliatomi sulfoniryhmästä laskettuna muunnetaan reaktiiviseksi asemaksi.
20
25
30

Tioliryhmiä (-SH) sisältävät yhdisteet ovat orgaanisia yhdisteitä, jotka muistuttavat alkoholeja, jotka
35

sisältävät hydroksyyliiryhmän (-OH), paitsi että tioleissa ainakin yhden hydroksyyliiryhmän happi on korvautunut rikillä. Ensimmäisessä reaktiossa syntyneen PEG-johdoksen aktivoiva osa, joka on tyypillisesti joko halogenidi tai esterin happo-osa, lohkaistaan polymeerista ja korvataan tioetanoliyhdisteen alkoholiryhmällä. Alkoholien tioliryhmän rikki kytketään suoraan polymeerin hiiliatomiin.

Alkoholien tulisi olla sellainen alkoholi, josta tarjoaa tioetanoliolosan liitettäväksi suoraan polymeeriketjun hiiliatomiin tai joka voidaan muuntaa helposti tioetanoliolosaksi tai substituoiduksi osaksi, jolla on samanlaiset reaktio-ominaisuudet. Esimerkki sellaisesta alkoholista on merkaptioetanolii, jonka rakennekaava on $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ja jota nimitetään toisinaan myös tioetanoliiksi.

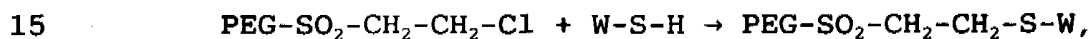
Synteesin kolmannessa vaiheessa hiileen sitoutuneen rikin muuntamiseen sulfoniryhmäksi (-SO₂) käytetään hape-tetta. Sellaisia hapetteita on monia; niihin kuuluvat vetyperoksidi ja natriumperboraatti. Katalyytti, kuten volframihappo, voi olla hyödyllinen. Muodostuva sulfoni ei kuitenkaan ole aktiivisessa muodossa tioliselektiivisiä reaktioita ajatellen, ja toisen vaiheen substituutioreaktiossa liitetyn alkoholien suhteellisen reaktiokyvytön hydroksyyliiryhmä on välttämätöntä poistaa.

Neljännessä vaiheessa toisessa vaiheessa liitetyn alkoholien hydroksyyliiryhmä muunnetaan reaktiivisempaan muotoon joko aktivoimalla kyseinen hydroksyyliiryhmä tai korvaamalla se reaktiivisemmalla ryhmällä, joka on samanlainen kuin reaktiosarjan ensimmäisessä vaiheessa. Korvaus tapahtuu tyypillisesti halogenidilla halogeenietyylisulfonin tai sen sellaisen johdoksen muodostamiseksi, joka sisältää reaktiivisen aseman toisessa hiiliatomissa sulfoniryhmästä laskettuna. Tyypillisesti etyyliiryhmän toinen hiiliatomi aktivoidaan kloorilla tai bromilla. Hydroksyyliiryhmän aktivoinnin tulisi tuottaa tulokseksi reaktiivisuudeltaan samankaltainen asema, kuten sulfonaattiesteri.

Sopivia reaktantteja ovat hapot, happohalogenidit ja muut edellä reaktiosarjan ensimmäisen vaiheen yhteydessä mainitut yhdisteet, erityisesti tionyylikloridi hydroksyyli-ryhmän korvaamiseksi klooriatomilla.

5 Tuloksena oleva polymeerin aktivoitu etyyli-sulfoni on stabiili, eristettävissä ja sopiva tioliselektiivisiin kytkentäreaktioihin. Kuten esimerkeistä ilmenee, PEG-kloorietyyli-sulfoni on stabiili vedessä noin pH:ssa 7 ja sen alapuolella, mutta sitä voidaan silti käyttää hyväksi tioliselektiivisissä kytkentäreaktioissa emäksisissä olosuh-
10 teissa ainakin noin pH-arvoon 9 saakka.

Tioli-kytkentäreaktiossa on mahdollista, että tioli-osa korvaa kloorin, kuten seuraavassa reaktiossa:

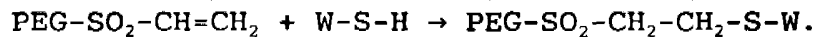


jossa W tarkoittaa osaa, johon tioliryhmä SH on liittynyt ja joka voi olla biologisesti aktiivinen molekyyli, pinta tai jokin muu aine. Havaitun reaktiokinetiikan perusteella, joka ilmenee esimerkistä 3, arvellaan kuitenkin (halu-
20 amatta silti sitoutua teoriaan), että kloorietyyli- ja muut aktivoidut etyyli-sulfonit ja reaktiiviset johdokset muuttuvat PEG-vinyylisulfoniksi ja juuri PEG-vinyylisulfoni tai sen johdos itse asiassa kytkeytyy tioliryhmään. Tu-
25 loksena olevasta sulfoni-tiolisidoksesta ei kuitenkaan kyetä erottamaan, onko se muodostunut aktiivisesta PEG-etyyli-sulfonista vai PEG-vinyylisulfonista, ja niin aktiivista etyyli-sulfonia voidaan käyttää pH-arvon 7 yläpuolella tioliryhmiin kytkennässä.

30 PEG-vinyylisulfoni on myös stabiili ja eristettävissä ja kykenee muodostamaan tioliselektiivisiä, hydrolyysinkestäviä sidoksia, tavallisesti paljon lyhyemmässä ajassa kuin halogeenietyyli-sulfoni tai muu aktivoitu etyyli-sulfoni, mitä selitetään tarkemmin jäljempänä.

Viidennessä vaiheessa, joka voidaan liittää synteesiin, aktivoitun etyyllisulfonin annetaan reagoida jonkin monista eri emäksistä kanssa, kuten natriumhydroksidin tai trietyyliamiinin kanssa, PEG-vinyylisulfonin tai sen aktiivisen johdoksen muodostamiseksi käytettäväksi tioliselektiivisissä kytkentäreaktioissa.

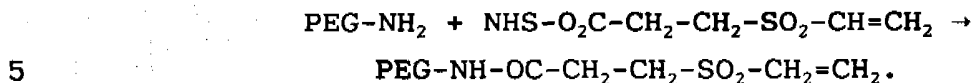
Kuten jäljempänä esitetyistä esimerkeistä, varsinkin esimerkistä 3, ilmenee, PEG-vinyylisulfoni reagoi nopeasti tioliryhmien kanssa ja säilyy hydrolysoitumattomana vedessä noin pH-arvon 11 alapuolella ainakin useita vuorokausia. Reaktio voidaan esittää seuraavasti:



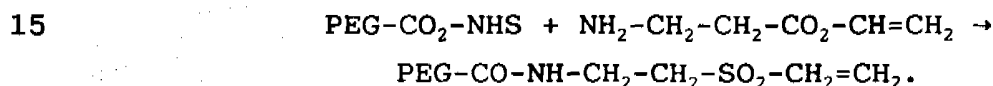
Tioliosan liittymisen (addition) sanotaan tapahtuvan "ylikaksoissidoksen". W-S-ryhmä liittyy kaksoissidoksen pääte-CH₂-ryhmään, joka on toinen hiiliatomi sulfoniryhmästä SO₂ laskettuna. Vety H liittyy kaksoissidoksen CH-osaan. pH:n ollessa korkeampi kuin noin 9 sulfoniosan tioliselektiivisyys kuitenkin pienenee ja sulfoniosan reaktiivisuus aminoryhmien suhteen kasvaa jonkin verran.

Vaihtoehtona edellä kuvatulle synteesille sulfonilla aktivoituja PEG-johdoksia voidaan valmistaa liittämällä PEG:iin, joka on aktivoitu jollakin muulla funktionaalisella ryhmällä, sulfoniryhmän sisältävä kytkentäaine. Esimerkiksi aminoryhmällä aktivoitun PEG:n (PEG-NH₂) annetaan reagoida suotuisissa olosuhteissa (pH noin 9 tai sitä pienempi) pienikokoisen molekyylin kanssa, joka sisältää toisessa päässään aktiivisen sukkiini-imidyyliesteriryhmän (NHS-O₂C-) ja toisessa päässään sulfoniosan, vinyylisulfoniryhmän -SO₂-CH=CH₂. Aminoryhmällä aktivoitu PEG muodostaa stabiilin sidoksen sukkiini-imidyyliesterin kanssa. Tuloksena oleva PEG on pääteasemassa sijaitsevalla vinyylisulfoniryhmällä aktivoitu ja hydrolyysinkestävä. Reaktio ja

tuloksena olevan vinyylisulfonilla aktivoitun PEG:n rakenne voidaan esittää seuraavasti:



Samankaltainen aktivoitu PEG voitaisiin saada aikaan antamalla amiiniaktivoitun PEG:n, kuten aktiivisen PEG-sukkiini-imidyyliesterin (PEG-CO₂-NHS) reagoida pienikokoisen molekyylin kanssa, joka sisältää toisessa päässä aminoryhmän ja toisessa päässä vinyylisulfoniryhmän. Sukkiini-imidyyliesteri muodostaa stabiilin sidoksen aminoryhmän kanssa seuraavalla tavalla:



Keksinnön mukaiset aktiiviset PEG-sulfonit voivat olla moolimassaltaan millaisia tahansa ja voivat olla suoraketjuisia tai haarautuneita sisältäen satoja haaroja. PEG voi olla substituoitu tai substituointon, kunhan substituointiin sulfoniosilla on käytettävissä ainakin yksi reaktiivinen asema. PEG:n keskimääräinen moolimassa on tyypillisesti 200 - 100 000 ja sen biologiset ominaisuudet voivat vaihdella moolimassan sekä haarautumis- ja substituutioasteen mukaan, joten kaikki kyseiset johdot eivät ehkä ole sopivia biologisiin tai bioteknisiin sovelluksiin. Useimpiin biologisiin ja bioteknisiin sovelluksiin voidaan käyttää olennaisilta osiltaan lineaarisista, suoraketjuista PEG:n vinyyli- tai bisvinyylisulfonia tai aktiivista etyyllisulfonia, joka on vinyylisulfoni- tai etyyllisulfoniryhmiä ja lisäksi läsnä olevia muita funktionaalisia ryhmiä, mikäli sellaiset ovat toivottavia, lukuun ottamatta suurin piirtein substituointon. Sopivia substituenteja moniin biologisiin ja bioteknisiin sovelluksiin

olisivat tyypillisesti reaktiokyvyttömät ryhmät, kuten vedyt (H-) ja metyyliiryhmät (CH₃-) ("m-PEG").

PEG:iin voi olla liittynyt useampia kuin yksi vinyylisulfoniosa tai sen esiaste, tai PEG:n toinen pää voi olla peitetty suhteellisen reaktiokyvyttömällä ryhmällä, kuten metyyliiryhmällä (-CH₃). Peiteryhmällä varustettu muoto käyttökelpoinen esimerkiksi silloin, kun halutaan yksinkertaisesti liittää polymeeriketjuja eri tioliasemiin pitkin proteiiniketjua. PEG-molekyylien liittämistä biologisesti aktiiviseen molekyyliin, kuten proteiiniin tai muuhun lääkkeeseen tai pintaan, nimitetään toisinaan "PEGyloinniksi".

Lineaarinen PEG, joka sisältää kummassakin päässään aktiivisen hydroksyyliiryhmän, voidaan aktivoida vinyylisulfonilla tai sen esiasteella tai johdoksilla, joilla on samanlainen reaktiivisuus, niin että niistä tulee bifunktionaalisia. Bifunktionaalista rakennetta, esimerkiksi PEG-bisvinyylisulfonia, nimitetään toisinaan koiranluurakenteeksi ja voidaan käyttää esimerkiksi kytkentäaineena tai välilikkeenä biologisesti aktiivisten aineiden liittämässä pintaan tai useamman kuin yhden sellaisen biologisesti aktiivisen molekyylin liittämässä PEG-molekyyliin. Sulfoniosan hydrolyysinkestävyys tekee siitä erityisen sopivan bifunktionaalisiin tai heterobifunktionaalisiin sovelluksiin.

Toinen sovellus on PEG-vinyylisulfonin ja sen esiasteiden tapauksessa vielä dendriittinen aktivoitu PEG, jossa keskellä olevaan ydinrakenteeseen on liitetty useita PEG-haaroja. Dendriittisillä PEG-rakenteilla voi olla korkea haarautumisaste, ja ne tunnetaan yleisesti "tähti"-molekyyleinä. Tähtimolekyylijä on kuvattu yleisesti US-patenttijulkaisussa 5 171 264 (Merrill), jonka sisältöön tässä viitataan. Sulfoniosia voidaan käyttää aktiivisen funktionaalisen ryhmän aikaansaamiseksi ytimeistä lähtevän

PEG-ketjun päähän ja kytkentäryhminä funktionaalisen ryhmän liittämiseksi tähtimolekyylin haaroihin.

PEG-vinyylisulfony ja sen esiasteet ja johdokset voidaan liittää suoraan pintoihin ja molekyyliin, jotka sisältävät tioliryhmän. Tavallisemmin pintaan tai molekyyliin liitetään kuitenkin heterobifunktionaalinen PEG-johdos, joka sisältää toisessa päässään sulfoniosan ja toisessa päässään toisenlaisen funktionaalisen ryhmän, kyseisen toisenlaisen ryhmän välityksellä. Jollakin muista aktiivisista ryhmistä substituotuna heterobifunktionaalista PEG-koiranluurakennetta voidaan käyttää esimerkiksi kuljettamaan proteiinia tai muuta biologisesti aktiivista molekyyliä toisen pään sulfoniosidoksen ja toisen pään toisenlaisen sidoksen, kuten amiinisidoksen, välityksellä sellaisen molekyylin aikaansaamiseksi, jolla kahdenlaista aktiivisuutta. Heterobifunktionaalinen PEG, joka sisältää toisessa päässään sulfoniosan ja toisessa päässään amiinispesifisen osan, voitaisiin liittää sekä proteiinien kysteini- että lysiiniinosaan. Voidaan saavuttaa stabiili amiinisidos, ja silloin hydrolyysinkestävä reagoimaton sulfoniosa on haluttaessa käytettävissä seuraaviin tiolispesifisiin reaktioihin.

Muina aktiivisina ryhminä, jotka soveltuvat heterobifunktionaalisiin, sulfonilla aktivoituihin PEG:ihin, tulevat kysymykseen monet erilaiset yhdisteet. Biologisiin ja bioteknisiin sovelluksiin sopivina substituentteina tulisivat tyypillisesti kysymykseen reaktiiviset osat, joita PEG-kemiassa tyypillisesti käytetään PEG:n aktivointiin, kuten aldehydit, trifluorietyylisulfonaatti, jota nimitetään toisinaan tresylaatiksi, N-hydroksisukkiinimidi, syanuurihappokloridi, syanuurihappofluoridi, asyyliatsidi, sukkiinaatti, p-diatsobentsyyliiryhmä, 3-(p-diatsofenyylionioksi)-2-hydroksipropylioksiryhmä ja muut.

Esimerkkejä aktiivisista osista, jotka ovat muita kuin sulfoneja, on esitetty US-patenttijulkaisussa

4 179 337 (Davis et al.), US-patenttijulkaisuissa
4 296 097 ja 4 430 260 (Lee et al.), US-patenttijulkaisu-
sa 4 670 417 (Iwasaki et al.), US-patenttijulkaisuissa
4 766 106, 4 917 888 ja 4 931 544 (Katre et al.), US-
5 patenttijulkaisussa 4 791 192 (Nakagawa et al.), US-
patenttijulkaisuissa 4 902 502 ja 5 089 261 (Nitecki et
al.), US-patenttijulkaisussa 5 080 891 (Saifer), US-
patenttijulkaisussa 5 122 614 (Zalipsky), US-patenttijul-
kaisussa 5 153 265 (Shadle et al.), US-patenttijulkaisussa
10 5 162 430 (Rhee et al.), EP-hakemusjulkaisussa 0 247 860
sekä kansainvälisissä PCT-hakemusjulkaisuissa US86/01 252,
GB89/01 261, GB89/01 262, GB89/01 263, US90/03 252,
US90/06 843, US91/06 103, US92/00 432 ja US92/02 047, joi-
den sisältöön tässä viitataan.

15 Ammattimiehelle lienee selvää, että edellä kuvattu-
ja koiranluurakenteita voitaisiin käyttää monia erilaisia
substituentteja ja substituenttien yhdistelmiä sisältävi-
nä. Voidaan muuntaa lääkkeitä, kuten aspiriinia, vitamiini-
neja, penisilliiniä ja muita, jotka ovat liian monilukui-
sia mainittaviksi; polypeptidejä tai proteiineja ja protei-
20 inifragmentteja, jotka sisältävät erilaisia funktionaali-
sia ryhmiä ja voivat olla moolimassaltaan monenlaisia;
erityyppisiä soluja; biomateriaaleihin soveltuvia pintoja;
melkeinpä mitä aineita tahansa. Tulisi käsittää, että ter-
25 mi "proteiini" sulkee tässä käytettynä sisäänsä peptidit
ja polypeptidit, jotka ovat aminohappojen polymeereja.
Termi "biomateriaali" tarkoittaa materiaalia, tyypillises-
ti synteettistä ja joskus muovista valmistettua, joka so-
veltuu istutettavaksi elävään ruumiiseen vahingoittuneen
30 tai sairaan osan korjaamiseksi. Yhden esimerkin biomateri-
aaleista muodostavat tekoverisuonet.

Yhdellä keksinnön mukaisella suoraketjuisella PEG-
johdoksella, joka on sopiva biologisiin ja bioteknisiin
sovelluksiin, on perusrakenne $R-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_n-Y$. PEG:n
35 monomeeriyksikkö OCH_2CH_2 on edullisesti suurin piirtein

substituotun ja haarautumaton polymeerin rungossa. Alaindeksi n voi olla noin 5 - 3 000. Sen tyypillisempi vaihteluväli on noin 5 - 2 200, joka vastaa suunnilleen moolimassa-alueetta 220 - 100 000. Vielä tyypillisempi vaihteluväli on noin 34 - 1 100, joka vastaa suunnilleen moolimassa-alueetta 1 500 - 50 000. Useimmissa sovelluksissa moolimassa on noin 2 000 - 5 000, joka vastaa suunnilleen $n:n$ arvoa 45 - 110.

Edellä esitetyssä rakennekaavassa Y tarkoittaa ryhmää $-SO_2-CH=CH_2$ tai $-SO_2-CH_2-CH_2-X$, jossa X on halogeeni. R tarkoittaa samaa tai eri ryhmää kuin Y . R voi olla ryhmä $HO-$, H_3CO- , $CH_2=CH-SO_2-$, $Cl-CH_2-CH_2-SO_2-$ tai jokin muu polymeerin aktivoiva ryhmä kuin $CH_2=CH-SO_2-$ tai $Cl-CH_2-CH_2-SO_2-$, esimerkiksi sellainen, johon on viitattu edellä mainituissa patenttjulkaisuissa ja hakemusjulkaisuissa.

Nämä aktiiviset polymeerijohdokset ovat vesiliukoisia ja hydrolyysinkestäviä ja muodostavat vesiliukoisia konjugaatteja ja hydrolyysinkestäviä sidoksia tioliryhmien kanssa. Johdosten katsotaan olevan rajattomasti tai lähes rajattomasti veteen liukenevia ja ne voivat saada muuten liukenemattomat molekyylit liukenemaan, kun viimeksi mainitut liitetään sellaiseen johdokseen.

Johdosten hydrolyysinkestävyys tarkoittaa sitä, että polymeerin ja sulfoniosan välinen sidos on stabiili vedessä ja että vinyylisulfoniosa on veden kanssa reagoimaton noin pH-arvon 11 alapuolella pitkään, ainakin useita vuorokausia ja mahdollisesti rajattomasti, kuten jäljempänä esitetystä esimerkistä 3 käy ilmi. Aktivoitu etyyllisulfoni voidaan muuntaa vinyylisulfoniksi emäksisissä olosuhteissa niin, että saavutetaan sama stabiilisuus. Tiolisidoksen hydrolyysinkestävyys tarkoittaa sitä, että aktivoidun polymeerin ja tioliryhmän sisältävän aineen muodostaman konjugaatin sulfoni-tiolisidos on stabiili pitkään vesipitoisissa ympäristöissä pH:n ollessa alempi kuin noin 11. Useimpien proteiinien voidaan odottaa menettävän ak-

tiivisuutensa pH:n ollessa 11 tai sitä korkeampi, joten ammattimiehelle lienee selvää, että monet PEG:n aktiivisten sulfonijohdosten sovellukset tapahtuvat pH-arvon 11 alapuolella riippumatta sulfoniosan stabiilisuudesta korkeammassa pH:ssa.

5 Soveltuakseen proteiinien ja muiden aineiden muuntamiseen sulfonin on ainoastaan oltava stabiili riittävän pitkään, jotta sulfoni ehtii reagoida proteiinissa tai muussa aineessa läsnä olevan reaktiivisen tioliryhmän
10 kanssa. Sulfoniosan ja tiolin välisen reaktion nopeus voi vaihdella pH:n mukaan, kuten jäljempänä esitetystä esimerkistä 2 ilmenee, noin 2 minuutista 30 minuuttiin, joka nopeus on paljon suurempi kuin mahdollisen hydrolyysin nopeus. Vinyylisulfonin voisi sallia reagoida tiolin kanssa paljon hitaamminkin, koska se on stabiili pitkään. Ku-
15 ten jäljempänä esitetystä esimerkistä 3 ilmenee, kloorietyylisulfoni ei hydrolysoitu emäksisissä olosuhteissa vaan muuttuu vinyylisulfoniksi, joka säilyy stabiilina useita päiviä ja on jopa reaktiivisempi tioliryhmien suhteen. Niinpä, kun tarkoituksena on muuntaa aineiden omi-
20 naisuuksia, myös aktiivisten etyyllisulfonien voidaan katsoa säilyvän hydrolysoitumattomina pitkään laajalla pH-alueella.

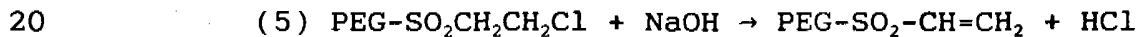
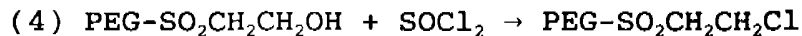
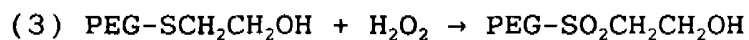
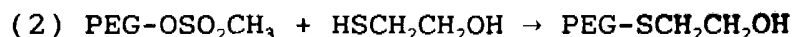
Muidenkin vesiliukoisten polymeerien kuin PEG:n
25 uskotaan soveltuvan samankaltaiseen muuntamiseen ja aktivointiin aktiivisella sulfoniosalla. Sellaisia muita polymeereja ovat polyvinyylialkoholi (PVA); muut polyalkeenioksidit, kuten polypropeeniglykoli (PPG) ja vastaavat; ja poly(oksietyloidut polyolit), kuten poly(oksietyloitu glyseroli), poly(oksietyloitu sorbitoli) ja poly(oksietyloitu glukoosi); sekä vastaavat. Kyseiset polymeerit voivat olla homopolymeereja tai satunnais- tai lohkokopolymeereja tai
30 -terpolymeereja, jotka perustuvat edellä mainittujen polymeerien monomeereihin, suoraketjuisia tai haarautuneita ja substituoituja tai substituoimattomia samalla tavalla kuin
35

PEG mutta sellaisia, että niissä on ainakin yksi aktiivinen asema käytettävissä reaktioon sulfoniosan muodostamiseksi.

5 Seuraava esimerkki 1 kuvaa polyeteeniglykolikloorietyylisulfonin valmistusta, eristystä ja karakterisointia ja polyeteeniglykolivinyylisulfonin valmistamista sen jälkeen polyeteeniglykolikloorietyylisulfonista. Muita polymerisulfoneja, jotka sisältävät reaktiivisen aseman toisessa hiiliatomissa sulfoniryhmästä laskettuna, valmistetaan samalla tavalla ja valmistusvaiheiden pitäisi olla selviä ammattimiehelle alla olevan esimerkin 1 ja edellä lueteltujen polymeerien perusteella.

Esimerkki 1: Synteesi

15 Reaktiovaiheita voidaan kuvata seuraavilla rakennekaavoilla:



Kutakin edellä esitetyistä reaktioista kuvataan alla yksityiskohtaisesti.

Reaktio 1

25 Reaktio 1 kuvaa polyeteeniglykolin metaanisulfonyliesterin valmistusta, jota esteriä voidaan nimittää myös polyeteeniglykolimetaanisulfonaatiksi tai -mesylaatiksi. Tosylaatti ja halogenidit voidaan valmistaa samoilla menetelytavoilla, joiden uskotaan olevan ammattimiehelle selviä.

30 Mesylaatin valmistusta varten PEG (25 g), jonka moolimassa oli 3 400, kuivattiin tislaamalla se atseotrooppisesti tolueenissa (150 ml). Noin puolet tolueenista tislautui pois PEG:n kuivauksessa. Tolueenia ja PEG:a sisältävään liuokseen lisättiin kuivaa dikloorimetaania
35 (40 ml), minkä jälkeen liuos jäähdytettiin jäähauteessa.

Jäähdytettyyn liuokseen lisättiin tislattua metaanisulfonylikloridia (1,230 ml, 1,06 kertaa ekvivalenttimassa suhteessa PEG:n hydroksyyliiryhmiin) ja kuivaa trietyyliamiinia (2,664 ml, 1,3 kertaa ekvivalenttimassa suhteessa PEG:n hydroksyyliiryhmiin). "Ekvivalenttimassa", sellaisena kuin sitä on käytetty edellä, voidaan ajatella "kokonaisuusmassaksi" ja tarkoittaa sitä yhdisteen määrää massayksiköinä, joka reagoi ekvivalenttimassaa vastaavan määrän kanssa PEG:n hydroksyyliiryhmiä.

10 Reaktioseoksen annettiin seistä yön yli, jonka aikana se lämpeni huoneenlämpötilaan. Saostui trietyyliaminihydrokloridia ja sakka poistettiin suodattamalla. Tilavuus pienennettiin sitten pyöröhaihduttamalla 20 ml:ksi. Mesylaatti saostettiin lisäämällä liuos kylmään kuivaan etyylietteriin (100 ml). Ydinmagneettiseen resonanssiin (NMR) perustuva analyysi osoitti, että hydroksyyliiryhmien konversio mesylaattiryhmiksi oli 100 %.

Reaktio 2

20 Reaktio 2 kuvaa polyeteeniglykolimerkaptoetanolin muodostusta antamalla mesylaatin reagoida merkaptoetanolin kanssa. Reaktio saa aikaan PEG:n metaanisulfonaattiryhmän korvautumisen. Merkaptoetanoliryhmän rikki sitoutuu suoraan PEG:n hiili-hiilirungon hiiliatomiin.

25 Reaktiolla 1 valmistettu mesylaatti (20 g) liuotettiin tislattuun veteen (150 ml). Mesylaattia ja vettä sisältävä liuos jäähdytettiin upottamalla se jäähauteeseen. Jäähdytettyyn liuokseen lisättiin merkaptoetanolia (2,366 ml, 3 kertaa ekvivalenttimassa suhteessa PEG:n hydroksyyliiryhmiin). Lisättiin myös 2 N NaOH-emästä (16,86 ml). Reaktioseosta palautusjäähdytettiin 3 tuntia, mikä tarkoittaa sitä, että reaktioseoksesta kohonneita höyryjä jäähdytettiin jatkuvasti ja niiden annettiin valua takaisin reaktioseokseen.

35 Tuotteeksi saatu polyeteeniglykolimerkaptoetanoli uutettiin kolmesti dikloorimetaanilla käyttämällä kullakin

kerralla noin 25 ml dikloorimetaania. Orgaaniset jakeet kerättiin yhteen ja kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaattilla. Tilavuus pienennettiin 20 ml:ksi, ja tuote saostettiin lisäämällä liuos kylmään kuivaan eetteriin (150 ml).

5 NMR-analyysi dimetyylisulfoksidissa (DMSO- d_6) antoi PEG-SCH₂CH₂OH:lle seuraavat piikit: 2,57 ppm, tripletti, -CH₂-S-; 2,65 ppm, tripletti, -S-CH₂-; 3,5 ppm, runkosingletti; ja 4,76 ppm, tripletti, -OH. Hydroksyylihiikki kohdassa 4,76 ppm osoitti substituutioksi 81 %. On havaittu, että hydroksyylihiiput antavat monesti prosentuaaliseksi substituutioksi alhaisia lukuja, ja siksi kohdassa 10 2,65 ppm esiintyvän piikin, joka vastaa ryhmää -S-CH₂-, katsotaan olevan luotettavampi ja vahvistavan substituutioksi 100 %.

15 Reaktio 3

Reaktio 3 kuvaa valmistetun polyeteeniglykolimerkaptoetanolin hapetusta peroksidilla rikin (S) muuntamiseksi sulfoniryhmäksi (SO₂). Saadaan aikaan PEG-etanolisulfo-
20 foni.

PEG-SCH₂CH₂OH (20 g) liuotettiin 0,123 M volframi-
happoliuokseen (30 ml) ja jäähdytettiin jäähauteessa. Volframihappoliuos valmistettiin liuottamalla happo natriumhydroksidiliuokseen, jonka pH oli 11,5, ja säätämällä
25 pH sitten jääetikalla arvoon 5,6. Volframihappoa ja polyeteeniglykolimerkaptoetanolia sisältävään liuokseen lisättiin tislattua vettä (20 ml) ja 30%:ista vetyperoksidia (2,876 ml, 2,5 kertaa ekvivalenttimassa suhteessa hydroksyyli-
ryhmiin), ja reaktioseoksen annettiin lämmetä yön aikana huoneenlämpötilaan.

30 Hapetettu tuote uutettiin kolmesti dikloorimetaanilla käyttämällä kullakin kerralla noin 25 ml dikloorimetaania. Yhteen kerätyt orgaaniset jakeet pestiin natriumvetykarbonaatin laimealla vesiliuoksella ja kuivattiin
35 vedettömällä magnesiumsulfaattilla. Tilavuus pienennettiin

20 ml:ksi: PEG-etanolisulfonituote saostettiin lisäämällä liuos kylmään kuivaan eetteriin.

NMR-analyysi dimetyylisulfoksidissa (DMSO- d_6) antoi PEG-SO₂CH₂CH₂OH:lle seuraavat piikit: 3,25 ppm, tripletti, -CH₂-SO₂-; 3,37 ppm, tripletti, -SO₂-CH₂-; 3,50 ppm, runko; 3,77 ppm, tripletti, -CH₂-OH; 5,04 ppm, tripletti, -OH. Hydroksyylipiikki kohdassa 5,04 ppm osoitti substituutioksi 85 %. Kohdassa 3,37 ppm esiintyvä piikki, joka vastaa ryhmää -SO₂-CH₂-, osoitti kuitenkin substituutioksi 100 % ja sitä pidetään luotettavampana.

Reaktio 4

Reaktio 4 kuvaa synteessin viimeistä vaihetta ja polyeteeniglykolikloorietyylisulfonin eristystä ja karakterisointia.

Tuotteen syntetisoimiseksi polyeteeniglykolistanoli-sulfoni PEG-SO₂CH₂CH₂OH (20 g) liuotettiin vastatislattuun tionyylikloridiin (100 ml) ja liuosta palautusjäähdytettiin yön yli. Tionyylikloridi oli tislattu kinoliinista. Ylimääräinen tionyylikloridi poistettiin tislaamalla. Lisättiin tolueenia (50 ml) ja dikloorimetaania (50 ml) ja ne poistettiin tislaamalla.

Tuotteen eristämiseksi PEG-kloorietyylisulfoni liuotettiin dikloorimetaaniin (20 ml) ja saostettiin lisäämällä liuos kylmään kuivaan etyylietteriin (100 ml). Sakka kiteytettiin uudelleen etyyliasetaatista (50 ml) tuotteen eristämiseksi.

Tuotteen karakterisointiin käytettiin ydinmagneettista resonanssia. PEG-SO₂CH₂CH₂Cl:n NMR-analyysi dimetyylisulfoksidissa (DMSO- d_6) antoi tulokseksi seuraavat piikit: 3,50 ppm, runko; 3,64 ppm, tripletti, -CH₂-SO₂-; 3,80 ppm, tripletti, -SO₂-CH₂-. Kohdassa 3,94 ppm esiintyi pieni hydroksyyliapäpuhtaustripletti. Prosentuaalisen substituution laskeminen tästä spektristä oli vaikeata, koska tärkeät piikit sijaitsevat lähellä hyvin voimakasta runkopiikkiä.

Reaktio 5

Reaktio 5 kuvaa reaktiovaiheessa 4 aikaansaadun polyeteeniglykolikloorietyylisulfonin muuntamista polyeteeniglykolivinyylisulfoniksi ja vinyylisulfonituotteen eristystä ja karakterisointia.

PEG-vinyylisulfoni valmistettiin helposti liuottamalla kiinteä PEG-kloorietyylisulfoni dikloorimetaaniliuotteeseen ja lisäämällä sen jälkeen 2 ekvivalenttia NaOH-emästä. Liuos suodatettiin emäksen poistamiseksi ja liuote haihdutettiin lopputuotteen PEG-SO₂-CH=CH₂, PEG-vinyylisulfonin, eristämiseksi.

PEG-vinyylisulfoni karakterisoitiin NMR-analyysillä dimetyylisulfoksidissa (DMSO-d₆), NMR-analyysi paljasti seuraavat piikit: 3,50 ppm, runko; 3,73 ppm, tripletti, -CH₂-SO₂-; 6,21 ppm, tripletti, =CH₂; 6,97 ppm, kaksoisdubletti, -SO₂-CH-. Kohdassa 6,97 ppm esiintyvä piikki, joka vastaa ryhmää -SO₂-CH-, osoitti substituutioksi 84 %. Kohdassa 6,21 ppm esiintyvä piikki, joka vastaa ryhmää =CH₂, osoitti substituutioksi 94 %. Titraus merkaptotoetanolilla ja 2,2'-ditiopyridiinillä osoitti substituutioksi 95 %.

Esimerkki 2: Tioliselektiivinen reaktiivisuus

Esimerkki osoittaa, että PEG-vinyylisulfoni ja sen esiaste PEG-kloorietyylisulfoni ovat oleellisesti reaktiivisempia tioryhmien (-SH) suhteen kuin aminoryhmien (-NH₂) tai iminoryhmien (-NH-) suhteen. Tioliryhmiä sisältävät yhdisteet ovat orgaanisia yhdisteitä, jotka muistuttavat alkoholeja, jotka sisältävät hydroksyyli ryhmän (-H), paitsi että tioleissa hydroksyyli ryhmän happi on korvautunut rikillä. Tioleja nimitetään toisinaan myös sulfhydryyleiksi tai merkaptaneiksi. PEG-vinyylisulfoni sisältää vinyylisulfoniryhmän -SO₂-CH=CH₂. PEG-kloorietyylisulfoni sisältää kloorietyylisulfoniryhmän -SO₂CH₂CH₂Cl.

Selektiivisyys tiolien suhteen on tärkeää proteiineja muunnettaessa, koska se merkitsee sitä, että muuntaminen voidaan kohdistaa ensisijaisesti kysteiiniyksikköi-

hin (jotka sisältävät ryhmän -SH) lysiiniyksikköjen (jotka sisältävät ryhmän -NH₂) ja histidiiniyksikköjen (jotka sisältävät ryhmän -NH-) sijasta. PEG-vinyylisulfonin selektiivisyys tiolien suhteen merkitsee sitä, että PEG voidaan
5 liittää selektiivisesti kysteiiniyksikköihin ja siten kytetään säilyttämään proteiinin aktiivisuus tiettyjen proteiinien tapauksessa ja säätelemään proteiiniin liitettävien PEG-molekyylien määrää.

PEG-vinyylisulfonin suhteellinen reaktiivisuus tio-
10 li- ja aminoryhmien suhteen määritettiin mittaamalla nopeudet, joilla PEG-vinyylisulfoni reagoi N- α -asetyyliysiinin metyyliesterin ja merkaptoetanolin kanssa. N- α -asetyyliysiinin metyyliesteri on lysiinin malli, joka sisältää aminoryhmän ja josta käytetään lyhennettä Lys-NH₂. Mer-
15 kaptoetanolin toimii kysteiinin mallina, joka sisältää tioliryhmän ja josta käytetään lyhennettä Cys-SH. PEG-kloorietyylisulfonin suhteellinen reaktiivisuus määritettiin samalla tavalla. Viimeksi mainittu molekyyli voi toimia vinyylisulfonin "suojattuna" muotona, koska se on stabiili
20 hapossa mutta muuttuu emästä lisättäessä PEG-vinyylisulfoniksi.

PEG-vinyylisulfonin ja PEG-kloorietyylisulfonin reaktiivisuutta tutkittiin pH:ssa 8,0, pH:ssa 9,0 ja pH:ssa 9,5. Puskurit pH:n kontrolloimiseksi olivat 0,1 M fosfaatti pH:ssa 8,0 ja 0,1 M boraatti pH:ssa 9,0 ja pH:ssa 9,5. Reaktiivisuuden merkaptoetanolin suhteen mit-
25 tausta varten molempiin puskureihin lisättiin etyleenidi-amiinitetraetikkahappoa (EDTA, 5 mmol/l) tiolin muuttumisen disulfidiksi hidastamiseksi.

Keksinnön mukaisten PEG-johdosten ja Lys-NH₂:n välistä reaktiota varten liuokseen, joka sisälsi Lys-NH₂:ta (0,3 mmol/l) asianmukaisessa puskurissa, lisättiin kullakin kolmella emäksisellä pH-tasolla PEG-johdoksen 3 mM liuosta samalla sekoittaen. Reaktiota seurattiin lisäämäl-
35 lä reaktioliuokseen fluoresamiinia fluoresoivan johdoksen

aikaansaamiseksi reaktiolla jäljellä olevien aminoryhmien kanssa. Seurantavaihe toteutettiin lisäämällä reaktioseosta (50 µl) fosfaattipuskuriin (1,950 ml), jonka pH oli 8,0, ja lisäämällä sen jälkeen fluoresamiiniliuosta (1,0 ml) samalla voimakkaasti sekoittaen. Fluoresamiiniliuos sisälsi 0,3 mg fluoresamiinia/ml asetonia.

Fluoresenssi mitattiin 10 minuuttia sekoituksen jälkeen. Eksitaatio ilmeni aallonpituudella 390 nm. Valon emissio tapahtui aallonpituudella 475 nm. Mitään reaktiota ei havaittu 24 tunnin kuluessa PEG-vinyylisulfonin eikä PEG-kloorietyylisulfonin tapauksessa pH:ssa 8,0. pH:ssa 9,5 reaktio oli hidas, mutta kaikki aminoryhmät olivat reagoineet muutaman vuorokauden kuluttua.

PEG-vinyylisulfonin ja sen PEG-kloorietyylisulfoni-esiasteen reaktiota Cys-SH:n kanssa varten liuokseen, joka sisälsi Cys-SH:ta (0,2 mmol/l) asianmukaisessa puskurissa, lisättiin kullakin kolmella emäksisellä pH-tasolla PEG-johdoksen 2 mM liuosta. Reaktiota seurattiin lisäämällä reaktioliuokseen 4-ditiopyridiiniä. 4-ditiopyridiiniyhdiste reagoi Cys-SH:n kanssa tuottaen tulokseksi 4-tiopyridonia, joka absorboi ultraviolettivaloa.

Seurantavaihe toteutettiin lisäämällä reaktioseosta (50 µl) 0,1 M fosfaattipuskuriin (0,950 ml), jonka pH oli 8,0 ja joka sisälsi EDTAa (5 mmol/l), ja lisäämällä sen jälkeen liuosta (1,0 ml), joka sisälsi 4-ditiopyridiiniä (2 mmol/l) samassa puskurissa.

4-tiopyridonin absorbanssi mitattiin aallonpituudella 324 nm. Sekä PEG-vinyylisulfoni että PEG-kloorietyylisulfoni osoittautui reaktiiviseksi Cys-SH:n suhteen; PEG-vinyylisulfonin reaktiivisuus osoittautui suuremmaksi. pH:ssä 9,0 reaktio on ohi 2 minuutissa käytettäessä vinyylisulfonia ja 15 minuutissa käytettäessä kloorietyylisulfonia. Nämä reaktiot olivat kuitenkin liian nopeita tarkkojen nopeusvakioiden määrittämiseksi. pH:ssa 8,0 reaktiot olivat hitaampia mutta menivät silti loppuun tunnissa vi-

nyylisulfonin tapauksessa ja 3 tunnissa kloorietyylisulfonin tapauksessa. Kloorietyylisulfonin muuttuminen vinyylisulfoniksi on oleellisesti hitaampaa kuin vinyylisulfonin reaktio Cys-SH:n kanssa. Kloorietyylisulfonin ja Cys-SH:n välisen reaktion nopeus näyttää siten olevan riippuvainen nopeudesta, jolla kloorietyylisulfoni muuttuu vinyylisulfoniksi. Nämä reaktiot ovat joka tapauksessa vielä paljon nopeampia kuin reaktio Lys-NH₂:n kanssa.

Edellä kuvatut kinetiikkatutkimukset todistavat seuraavat seikat. PEG-vinyylisulfoni on paljon reaktiivisempi tioliryhmien suhteen kuin aminoryhmien suhteen, mikä on osoitus siitä, että PEG-vinyylisulfonin liittyminen proteiinin, joka sisältää sekä kysteiini- että lysiiniryhmiä, tapahtuu ensisijaisesti reaktiolla kysteiinin kanssa. Koska reaktiivisuus aminoryhmien suhteen on samanlainen kuin iminoryhmien suhteen, niin myös reaktiivisuus histidiinialayksikköjen suhteen on paljon pienempi kuin reaktiivisuus kysteiinialayksikköjen suhteen. Selektiivisyys tioliryhmien suhteen myös korostuu alemmilla pH-arvoilla PEG-kloorietyylisulfonin ja PEG-vinyylisulfonin tapauksessa, joskin PEG-kloorietyylisulfonin reaktiot ovat hiukan hitaampia.

Monien PEG-johdosten käyttökelpoisuus on rajoitettu, koska ne reagoivat nopeasti veden kanssa, mikä estää pyrkimykset liittää johdos molekyyliin ja pintoihin vesipitoisissa olosuhteissa. Seuraava esimerkki 3 osoittaa, että PEG-vinyylisulfoni ja PEG-kloorietyylisulfoni ovat stabiileja vedessä.

Esimerkki 3: Hydrolyysinkestävyys

PEG-vinyylisulfoni liuotettiin raskaaseen veteen, deuteriumoksidiin (D₂O), ja sitä seurattiin NMR:n avulla. Reaktiota ei ilmennyt. PEG-kloorietyylisulfonista, joka liuotettiin raskaaseen veteen, joka oli puskuroitu boratilla pH-arvoon 9,0, syntyi PEG-vinyylisulfonia. NMR-seu-

ranta osoitti, että PEG-vinyylisulfoni oli muodostuttuaan stabiili 3 vuorokautta raskaassa vedessä.

PEG-kloorietyylisulfoni on stabiili vedessä, kunnes liuos tulee emäksiseksi, jossa vaiheessa se muuttuu vinyylisulfoniksi. Muuttuminen vinyylisulfoniksi on todistettu liuottamalla PEG-kloorietyylisulfoni veteen pH:ssa 7 ja boraattipuskuriin pH:ssa 9. PEG-johdos uutetaan dikloorimetaaniin. Dikloorimetaanin poisto ja sitä seurannut NMR-analyysi osoittivat, että PEG-kloorietyylisulfoni on stabiili neutraalissa pH:ssa 7,0 ja reagoi emäksen kanssa, jolloin syntyy PEG-vinyylisulfonia.

Vinyylisulfoni on stabiili vedessä useita vuorokausia, jopa emäksisessä pH:ssa. PEG-vinyylisulfonin suuri hydrolyysinkestävyys ja tiolispesifinen reaktiivisuus merkitsevät sitä, että PEG-vinyylisulfoni ja sen esiaste soveltuvat molekyylien ja pintojen muuntamiseen vesipitoisissa olosuhteissa, kuten seuraavasta esimerkistä 4 ilmenee.

Esimerkki 4: Liittäminen proteiiniin

Proteiinien muuntamista havainnollistetaan liittämällä PEG-johdos naudan seerumialbumiiniin (BSA) kahdella eri menetelmällä. Muuntamaton luonnon BSA sisältää kystiiniryhmiä, jotka eivät sisällä tioliryhmiä. Kystiiniyksiköt ovat sitoutuneina disulfididoksiksi (S-S).

Ensimmäisessä menetelmässä m-PEG-vinyylisulfonin, jonka moolimassa oli 5000, annettiin reagoida muuntamattoman BSA:n kanssa 0,1 M boraattipuskurissa pH:ssa 9,5 ja huoneenlämpötilassa 24 tuntia. Liuos sisälsi 1 mg BSA:ta ja 1 mg m-PEG-vinyylisulfonia, jonka moolimassa oli 5000, millilitraa kohden liuosta. Esimerkin 2 malliyhdisteillä saadut tulokset olivat osoittaneet, että lysiinialayksiköt (ja mahdollisesti histidiinialayksiköt) muuntuisivat näissä suhteellisen emäksisissä olosuhteissa ja reaktioon käytettävissä olevien vapaiden tioliryhmien puuttuessa.

Liittyminen lysiinialayksikköihin osoitettiin kahdella tavalla. Ensinnäkin kokoekskluusiokromatografia osoitti proteiinin moolimassan kasvaneen noin 50 % ja siis noin 20 PEG-molekyylin liittyneen proteiiniin. Toiseksi
5 fluoresenssianalyysi osoitti lysiiniryhmien lukumäärän BSA-molekyyliässä pienentyneen noin kymmenellä.

Toisessa menetelmässä BSA käsiteltiin tributyyli-
fosfiinilla disulfididisidosten (S-S) pelkistämiseksi reaktioon käytettävissä oleviksi tioliryhmiksi (-SH). Muunnet-
10 tua BSA:ta käsiteltiin sitten PEG-kloorietyylisulfonilla 0,1 M boraattipuskurissa pH:ssa 8,0 ja huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Liuos sisälsi 1 mg BSA:ta ja 1 mg m-PEG-kloorietyylisulfonia, jonka moolimassa oli 5000, millilitraa kohden liuosta. Tulokset osoittivat, että lysiiniryh-
15 mät olivat reaktiokyvttömiä näissä olosuhteissa. Tioliryhmät olivat kuitenkin reaktiivisia.

PEG:n liittyminen proteiiniin osoitettiin kokoekskluusiokromatografialla, joka osoitti proteiinin moolimassan kasvaneen noin 25 %. Fluoresamiinianalyysi ei osoittanut mitään muutosta proteiinin lysiinialayksikköjen määrässä ja vahvisti siten, että PEG:n liittyminen ei tapahtunut lysiinialayksikköihin. Tämä vahvisti substituution tapahtuneen tioliryhmissä.

Tässä esitettyjen patenttivaatimusten kohteena olevaa keksintöä on kuvattu käsittelemällä tiettyjä esimerk-
25 keinä esitettyjä suoritusmuotoja. Edellä esitetyn kuvauksen ei ole kuitenkaan tarkoitus rajoittaa keksintöä kyseisiin esimerkkisuoritusmuotoihin ja ammattimiehen pitäisi käsittää, että voidaan tehdä muutoksia, jotka ovat edellä esitettyssä selityksessä kuvatun keksinnön hengen mukaisia ja kuuluvat sen piiriin. Päinvastoin keksintö kattaa kaikki vaihtoehdot, muunnelmat ja vastineet, joiden voidaan katsoa olevan keksinnön todellisen hengen mukaisia ja kuuluvan sen suoja-alan piiriin, jonka määrittelevät oheiset
30 patenttivaatimukset.
35

Patenttivaatimukset

1. Vesiliukoinen ja eristettävissä oleva aktivoitu polymeeri, joka on hydrolyysinkestävä, tunnettu siitä, että polymeeri on polyalkeenioksidi, poly(oksietyloitu polyoli) tai poly(olefiininen alkoholi) ja sisältää ainakin yhden aktiivisen sulfoniosan, jossa on vähintään kaksi hiiliatomiä liittyneenä sulfoniryhmään $-SO_2-$ ja reaktiivinen kohta tiolille spesifiseen kytkentään, joka reaktiivinen kohta sijaitsee toisessa hiiliatomissa sulfoniryhmästä laskettuna.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että mainittuna ainakin yhtenä aktiivisena sulfoniosana tulevat kysymykseen vinyylisulfoni, aktiivinen etyylisulfoni, vinyylisulfonin ja etyylisulfonin aktiiviset johdokset sekä niiden yhdistelmät.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeeri on polyeteeniglykoli ja mainittu ainakin yksi aktiivinen sulfoniosa on vinyylisulfoni tai halogeenietyylisulfoni.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeeri on polyeteeniglykolivinyylisulfoni.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeerina tulevat kysymykseen polyeteeniglykoli, polypropeeniglykoli, poly(oksietyloitu glyseroli), poly(oksietyloitu sorbitoli), poly(oksietyloitu glukoosi) ja polyvinyylialkoholi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeeri on polyeteeniglykoli.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeeri on suoraketjuinen polymeeri.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että suoraketjuinen polymeeri ei sisällä muita substituentteja kuin aktiivisia sulfoniosia.

5 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeeri on satunnais- tai blokkikopolymeeri tai -terpolymeeri.

10 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeeri on koiranluurakenne, joka sisältää ainakin polymeerirungon toisessa päässä mainitun aktiivisen osan ja polymeerirungon vastakkaisessa päässä aktiivisen osan, joka voi olla sama tai eri kuin ensin mainittu aktiivinen osa.

15 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että se sisältää polymeerirungon vastakkaisessa päässä erilaisen aktiivisen osan, joka on reaktiivinen aminoryhmien suhteen.

20 12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että polymeeri käsittää haarautuneen molekyyllirakenteen ainakin yhden haaran.

25 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että haarautunut molekyyllirakenne on dendriittinen.

30 14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että mainittu ainakin yksi aktiivinen sulfoniosa muodostaa sidoksen pinnalla tai molekyylissä läsnä olevan reaktiivisen ryhmän kanssa.

35 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että reaktiivinen ryhmä on tioliryhmä.

40 16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että mainittu aktiivinen sulfoniosa on liittynyt polymeeriin sidoksella, joka sisältää kytkentäosan, ja että polymeeri sisältää toisen aktiivisen osan, joka on erilainen kuin mainittu aktiivinen sulfoniosa ja soveltuu liitettäväksi mainittuun kytkentäosaan.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että mainittu toinen aktiivinen osa on amiinispesifinen ja kytkentäosa sisältää aktiivisen aminoryhmän.

5 18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että aktivoitu polymeeri on polyeteeniglykoli, mainittu toinen aktiivinen osa on aminoryhmä, kytkentäosan rakenne on $\text{NHS-O}_2\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$, jolloin $\text{NHS-O}_2\text{C}$ tarkoittaa sukkiini-imidyyliesteriryhmää, ja aktivoitun polymeerin rakenne on
10 $\text{PEG-NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$.

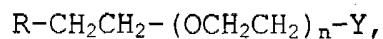
19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että aktivoitu polymeeri on stabiili vesipitoisissa ympäristöissä pH:n ollessa 11 tai
15 alempi.

20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että aktivoitu polymeeri kykenee reagoimaan selektiivisesti tioliryhmien kanssa olosuhteissa, joissa pH on noin 9 tai alempi.

21. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että aktivoitu polymeeri on stabiili useimmissa pelkistävässä ympäristöissä.

22. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että aktivoitu polymeeri liukenee rajattomasti veteen.
25

23. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polymeeri, jolla on rakenne



30 jossa n on 5 - 3 000, Y on ryhmä $-\text{SO}_2\text{-CH=CH}_2$ tai $-\text{SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$, jossa X on halogeeni, tai niiden johdos ja R on sama tai eri ryhmä kuin Y.

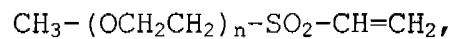
24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että n on noin 5 - 2 200.
35

25. Patenttivaatimuksen 23 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että n on noin 34 - 1 100.

26. Patenttivaatimuksen 23 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että n on noin 45 - 110.

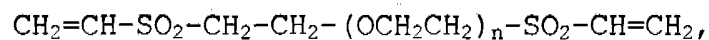
5 27. Patenttivaatimuksen 23 mukainen aktivoitu polymeeri, tunnettu siitä, että R on ryhmä HO-, H₃CO-, CH₂=CH-SO₂-, X-CH₂-CH₂-SO₂- tai niiden johdos tai jokin muu polyeteeniglykolin aktivoiva ryhmä kuin CH₂=CH-SO₂- tai X-CH₂-CH₂-SO₂- tai niiden johdos.

10 28. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polyeteeniglykolijohdos, jonka rakenne on



jossa n on 5 - 3 000.

15 29. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aktivoitu polyeteeniglykolijohdos, jonka rakenne on



20 jossa n on 5 - 3 000.

30. Ei-terapeuttinen biomateriaali, tunnettu siitä, että se käsittää pinnan ja ainakin yhden vesiliukoisesta polymeerijohdoksen kytkettynä mainittuun pintaan, joka polymeerijohdos on polyalkeenioksidi, poly(oksietyloitu polyoli) tai poly(olefiininen alkoholi) ja sisältää ainakin yhden aktiivisen sulfoniosan, jossa on vähintään kaksi hiiliatomia liittyneenä sulfoniryhmään -SO₂- ja reaktiivinen kohta tiolille spesifiseen kytkentään, joka reaktiivinen kohta sijaitsee toisessa hiiliatomissa sulfoniryhmästä laskettuna.

35 31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen ei-terapeuttinen biomateriaali, tunnettu siitä, että mainitulla pinnalla esiintyy ainakin yksi reaktiivinen ryhmä ja polymeerijohdos on heterobifunktionaalinen koiranluurakenne, joka sisältää toisessa päässään osan, joka on liittynyt

mainitulla pinnalla läsnä olevaan reaktiiviseen ryhmään, ja vastakkaisessa päässään aktiivisen sulfoniosan.

5 32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen ei-terapeuttinen biomateriaali, tunnettu siitä, että reaktiivinen ryhmä on aminoryhmä ja polymeerijohdoksen osa, joka on liittyneenä mainittuun aminoryhmään, on amiiniselektiivinen osa.

10 33. Patenttivaatimuksen 30 mukainen ei-terapeuttinen biomateriaali, tunnettu siitä, että aktiivinen sulfoniosa on vinyylisulfonyyli, aktiivinen etyyylisulfonyyli tai niiden johdos.

34. Patenttivaatimuksen 30 mukainen ei-terapeuttinen biomateriaali, tunnettu siitä, että polymeerijohdos sisältää PEG-polymeerin.

15 35. Menetelmä eristettävissä olevan, vesiliukoisen, aktivoitun, orgaanisen polymeerin valmistamiseksi, joka sisältää aktiivisen sulfoniosan ja jossa polymeerin ja sulfoniosan välinen sidos on hydrolyysinkestävä, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää rikkiä sisältävän osan liittämisen polymeerin hiiliatomiin ja tämän osan muuntamisen sitten aktiiviseksi sulfoniosaksi, jossa on vähintään kaksi hiiliatomia liittyneenä sulfoniryhmään $-SO_2-$ ja reaktiivinen kohta tiolille spesifiseen kytkentään, joka reaktiivinen kohta sijaitsee toisessa hiiliatomissa sulfoniryhmästä laskettuna.

25 36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että se käsittää lisäksi mainitun aktivoitun polymeerin, joka sisältää aktiivisen sulfoni-osan, eristämisen.

30 37. Patenttivaatimuksen 35 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittu rikkiä sisältävän osan liittäminen suoraan polymeerin hiiliatomiin käsittää ainakin yhden polymeerissa esiintyvän, aktivoitavissa olevan hydroksyyli-ryhmän aktivoinnin ja tuloksena olevan yhdisteen saattamisen reagoimaan alkoholin kanssa, joka sisältää tio-

35

liryhmän, jotta rikki saadaan kytketyksi suoraan polymeerin hiili-hiiliketjuun.

5 38. Patenttivaatimuksen 37 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittu ainakin yhden polymeerissa läsnä olevan, aktivoitavissa olevan hydroksyylliryhmän aktivointi käsittää hydroksyylliryhmän substituution tai hydroksyylliryhmän vedyn korvaamisen reaktiivisemmalla ryhmällä.

10 39. Patenttivaatimuksen 37 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että tioliryhmän sisältävä alkoholi on merkptoetanoli.

15 40. Patenttivaatimuksen 37 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että tioliryhmän sisältävä alkoholi muunnetaan aktiiviseksi sulfoniosaksi hapettamalla rikkiä sisältävän osan rikki sulfoniksi ja antamalla tuotteen reagoida hydroksyylliryhmän aktivoivan tai korvaavan ryhmän kanssa.

20 41. Patenttivaatimuksen 37 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sulfoni on aktiivinen etyyllisulfoni ja menetelmä käsittää lisäksi vinyylisulfoniryhmän muodostamisen polymeeriin antamalla aktiivisen etyyllisulfonin reagoida vahvan emäksen kanssa.

25 42. Patenttivaatimuksen 35 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että

(a) polyeteeniglykolin, joka sisältää ainakin yhden aktiivisen hydroksyylliryhmän, annetaan reagoida yhdisteen kanssa joko esterillä tai halogenidilla substituoidun polyeteeniglykolin muodostamiseksi;

30 (b) vaiheessa (a) aikaansaadun esterillä tai halogenidilla substituoidun polyeteeniglykolin annetaan reagoida merkptoetanolin kanssa esteritai halogenidiosan korvaamiseksi merkptoetanoliryhmällä;

35 (c) vaiheessa (b) aikaansaadun merkptoetanolilla substituoidun polyeteeniglykolin annetaan reagoida hapetusaineen kanssa merkptoetanoliosan sisältämän rikin hapettamiseksi sulfoniksi;

(d) vaiheessa (c) aikaansaadun sulfonin annetaan reagoida yhdisteen kanssa merkaptetanoliosan hydroksyyli-ryhmän muuntamiseksi esteritai halogenidiosaksi;

5 (e) vaiheessa (d) saadun etyyllisulfonin annetaan reagoida emäksen kanssa polyeteeniglykolivinyylisulfonin muodostamiseksi.

43. Patenttivaatimuksen 42 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että se käsittää lisäksi polyeteeniglykolivinyylisulfonin eristyksen.

10 44. Patenttivaatimuksen 42 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa (d) halogeeni on kloori ja vaiheen (d) tuote on polyeteeniglykolikloorietyyllisulfoni ja että menetelmä käsittää lisäksi polyeteeniglykolikloorietyyllisulfonin eristämisen liuottamalla kloorietyyllisulfoni dikloorimetaaniin, saostamalla kloorietyyllisulfoni
15 lisäämällä liuos etyylietteriin ja kiteyttämällä sakka uudelleen etyyliasetaatista.

45. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että se käsittää lisäksi polyeteeniglykolikloorietyyllisulfonikiteiden liuottamisen orgaaniseen liuotteeseen ennen reaktiota emäksen kanssa polyeteeniglykolivinyylisulfonin muodostamiseksi ja polyeteeniglykolivinyylisulfonituotteen eristämisen suodattamalla emäksen
20 poistamiseksi ja haihduttamalla liuote.

25 46. Menetelmä eristettävissä olevan, vesiliukoisen, aktivoitun, orgaanisen polymeerin valmistamiseksi, joka sisältää aktiivisen sulfoniosan ja jossa polymeerin ja sulfoniosan välinen sidos on hydrolyysinkestävä, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää kytkentäosan, joka sisältää
30 aktiivisen sulfoniosan ja toisen aktiivisen osan, liittämisen polymeerijohdokseen, joka on polyalkeenioksidi, poly(oksietyloitu polyoli) tai poly(olefiininen alkoholi), joka sisältää muun funktionaalisen ryhmän kuin sulfoniryhmän ja jossa funktionaalinen ryhmä on selektiivinen mainitun kytkentäosan toisen aktiivisen osan suhteen, jolloin edellä
35 mainittu aktiivinen sulfoniosa käsittää vähintään kaksi

hiiliatomia liittyneenä sulfoniryhmään $-SO_2-$ ja reaktiivinen kohta tiolille spesifiseen kytkentään, joka reaktiivinen kohta sijaitsee toisessa hiiliatomissa sulfoniryhmästä laskettuna.

5 47. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polymeerijohdoksen sisältämä funktionaalinen ryhmä kykenee reagoimaan selektiivisesti aminoryhmien kanssa ja kytkentäosan toinen aktiivinen osa sisältää aktiivisen aminoryhmän.

10 48. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polymeerijohdos on aktiivinen PEG-sukkiini-imidyyliesteri ja kytkentäosan rakenne on $NH_2-CH_2-CH_2-SO_2-CH=CH_2$.

15 49. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että se käsittää lisäksi polymeerijohdoksen valmistamisen, joka on polyeteeniglykoli, polypropeeniglykoli, poly(oksietyloitu glyseroli), poly(oksietyloitu sorbitoli), poly(oksietyloitu glukooosi) tai polyvinyylialkoholi, joka sisältää aminoryhmien suhteen selektiivisen funktionaalisen ryhmän; kytkentäosan valmistamisen, joka sisältää aminoryhmän ja sulfoniosan; ja kytkentäosan aminoryhmän liittämisen polymeerijohdoksen sisältämään aminoselektiiviseen osaan.

25 50. Menetelmä aineen ja vesiliukoisen aktivoituneen polymeerin, joka on polyalkeenioksidi, poly(oksietyloitu polyoli) tai poly(olefiininen alkoholi), joka polymeeri sisältää ainakin yhden sulfoniosan, muodostaman konjugaatin valmistamiseksi, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää mainitun aineen saattamisen reagoimaan aktivoituneen polymeerin kanssa, joka sisältää aktiivisen sulfoniosan, ja sidoksen muodostamisen mainitun aineen ja polymeerijohdoksen välille.

30 51. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittu aine sisältää aktiivisen tioliryhmän ja sidos on tioliryhmän ja sulfoniosan välinen.

35

52. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittu aine sisältää aktiivisen aminoryhmän, polymeerijohdos sisältää aminoselektiivisen osan ja sidos muodostetaan aminoryhmän ja aminoselektiivisen osan välille.

53. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että aktivoitu polymeeri on polyeteeniglykoli, polypropeeniglykoli, poly(oksietyloitu glyseroli), poly(oksietyloitu sorbitoli), poly(oksietyloitu glukoosi) tai polyvinyylialkoholi.

54. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittuna aineena tulevat kysymykseen biomateriaaleiksi soveltuvat synteettiset aineet, proteiinit, lääkkeet, solut ja vitamiinit.

55. Menetelmä biologisesti aktiivisen molekyylin ja polyeteeniglykolin aktiivisen johdoksen muodostaman konjugatin valmistamiseksi, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää biologisesti aktiivisen molekyylin, joka sisältää reaktiivisen tioliryhmän, saattamisen reagoimaan polyeteeniglykolijohdoksen kanssa, joka sisältää aktiivisen sulfoniosan, ja sidoksen muodostamisen tioliryhmän ja aktiivisen sulfoniosan välille.

56. Patenttivaatimuksen 55 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että biologisesti aktiivisen molekyylin reaktio polyeteeniglykolijohdoksen kanssa toteutetaan olosuhteissa, joissa pH on alempi kuin noin 11.

57. Patenttivaatimuksen 55 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että biologisesti aktiivisen molekyylin reaktio polyeteeniglykolijohdoksen kanssa toteutetaan noin pH:ssa 9 tai sen alapuolella.

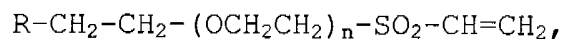
58. Patenttivaatimuksen 55 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että aktiivinen sulfoniosa on vinyylisulfoni, aktiivinen etyyli-sulfoni tai niiden aktiivinen johdos.

59. Menetelmä ainakin yhden biologisesti aktiivisen molekyylin, jonka rakenne on W-SH, jossa W- on biologisesti aktiivinen osa ja -SH on reaktiivinen tioliryhmä, ja aktiivoidun polyeteeniglykolijohdoksen, joka sisältää ainakin yhden aktiivisen sulfoniosan ja jonka rakenne on R-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)_n-Y, jossa n on 5 - 3 000, Y on ryhmä -SO₂-CH=CH₂ ja R on ryhmä HO-, H₃CO-, X-CH₂-CH₂-SO₂-, jossa X on halogeeni, tai CH₂=CH-SO₂; muodostaman biologisesti aktiivisen konjugaatin valmistamiseksi, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää biologisesti aktiivisen molekyylin saattamisen reagoimaan aktiivoidun polyeteeniglykolijohdoksen kanssa ja sidoksen muodostamisen aktiivisen tioliryhmän ja polyeteeniglykolijohdoksen ainakin yhden aktiivisen sulfoniosan välille.

60. Patenttivaatimuksen 59 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että W on proteiini.

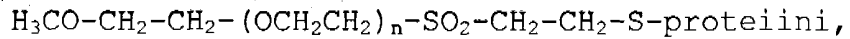
61. Patenttivaatimuksen 60 mukainen menetelmä, jolloin biologisesti aktiivisella konjugaatilla on rakenne proteiini-S-CH₂-CH₂-SO₂-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)_n-SO₂-CH₂-CH₂-S-proteiini,

jossa n on 5 - 3 000, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää (1) ainakin yhden proteiinin, joka sisältää aktiivisen tioliryhmän, saattamisen reagoimaan sulfonilla aktiivoidun polyeteeniglykolijohdoksen kanssa, jonka rakenne on



jossa R on ryhmä CH₂=CH-SO₂- tai X-CH₂-CH₂-SO₂-, jossa X on halogeeni, ja (2) sidoksen muodostamisen proteiinin aktiivisen tioliryhmän ja aktiivoidun polymeerin aktiivisten sulfoniosien välille.

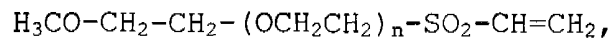
62. Patenttivaatimuksen 60 mukainen menetelmä, jol-
loin biologisesti aktiivisella konjugaatilla on rakenne



5

jossa n on 5 - 3 000, tunnettu siitä, että menetelmä
käsittää (1) proteiinin, joka sisältää aktiivisen tioliryh-
män, saattamisen reagoimaan aktivoituneen polyeteeniglykoli-
johdoksen kanssa, jonka rakenne on

10



ja (2) sidoksen muodostamisen proteiinin aktiivisen tioli-
ryhmän ja aktivoituneen polymeerin aktiivisen sulfoniosan vä-
lille.

15



Patentkrav

1. Vattenlöslig och isoleringsbar aktiverad polymer som är stabil mot hydrolysering, kännetecknad av, att
5 polymeren är polyalkenoxid, poly(oxietylerad polyol) eller poly(olefinisk alkohol) och innehåller åtminstone en aktiv sulfondel med åtminstone två kolatomer kopplade till sulfongruppen $-SO_2-$ och en reaktiv del för specifik koppling till en tiol, där den reaktiva delen finns på den andra
10 kolatomen räknat från sulfongruppen.

2. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att nämnda åtminstone en aktiv sulfondel är vinylsulfonaktiv etylsulfon, aktiva derivat av vinylsulfon och etylsulfon eller en kombination av dessa.

15 3. Aktiverad polymer enligt patentkrav 2, kännetecknad av att polymeren är polyetenglykol och nämnda åtminstone en aktiv sulfondel är vinylsulfon eller halogenetylsulfon.

20 4. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att polymeren är polyetenglykolvinylsulfon.

25 5. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att polymeren är polyetenglykol, polypropenglykol, poly(oxietylerad glycerol), poly(oxietylerad sorbitol), poly(oxietylerad glukos) eller polyvinylalkohol.

6. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att polymeren är polyetenglykol.

30 7. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att polymeren är en lineärkedjad polymer.

8. Aktiverad polymer enligt patentkrav 7, kännetecknad av att den lineärkedjade polymeren ej innehåller andra substituenten än aktiva sulfoner.

35 9. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av, att polymeren är slumpartad- eller segmentsam-polymer eller -terpolymer.

10. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att polymeren är en hundbenspolymer, som innehåller åtminstone i polymerstammens ena enda nämnda aktiva del och i polymerstammens motsatta enda en aktiv del, som kan vara lik eller olik den först nämnda aktiva delen.

11. Aktiverad polymer enligt patentkrav 10, kännetecknad av att den innehåller i nämnda polymerstammens motsatta enda en olik aktiv del, som är reaktiv mot aminogrunder.

12. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att polymeren omfattar åtminstone en förgrening av en förgrenad molekylstruktur.

13. Aktiverad polymer enligt patentkrav 12, kännetecknad av att den förgrenade molekylstrukturen är dendritisk.

14. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att nämnda åtminstone en aktiv sulfondel bildar en bindning med en reaktiv grupp som finns på en yta eller i en molekyl.

15. Aktiverad polymer enligt patentkrav 14, kännetecknad av att nämnda reaktiva grupp är en tiolgrupp.

16. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att nämnda aktiva sulfondel är bunden till polymeren med en bindning, som innehåller en bindningsdel, och att polymeren innehåller en annan aktiv del, som är olik nämnda aktiva sulfondel för bindning till bindningsdelen.

17. Aktiverad polymer enligt patentkrav 16, kännetecknad av att den nämnda andra aktiva delen är aminospecifik och bindningsdelen innehåller en aktiv aminogrupp.

18. Aktiverad polymer enligt patentkrav 16, kännetecknad av att den aktiva polymeren är polyetenglykol, den nämnda andra aktiva delen är en aminogrupp, bind-

ningsdelens struktur är $\text{NHS-O}_2\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH}_2\text{=CH}_2$, varvid $\text{NHS-O}_2\text{C}$ anger en succinimidylestergrupp, och den aktiverade polymerens struktur är $\text{PEG-NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$.

5 19. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den aktiverade polymeren är stabil i en vattenhaltig miljö med pH som är 11 eller lägre.

10 20. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den aktiverade polymeren förmår reagera selektivt med tiolgrupper i förhållanden med ungefär pH 9 eller lägre.

21. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den aktiverade polymeren är stabil i de flesta reducerande miljöer.

15 22. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den aktiverade polymeren löser sig oändligt i vatten.

23. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, som har följande struktur

20
$$\text{R-CH}_2\text{CH}_2\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-Y,}$$

i vilken n är 5 - 3 000, Y är en grupp $\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$ eller $\text{-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$, i vilken X är halogen eller derivat därav och R är samma eller annan grupp som Y.

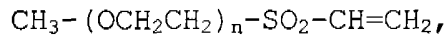
25 24. Aktiverad polymer enligt patentkrav 23, kännetecknad av att n är ungefär 5 - 2 200.

25. Aktiverad polymer enligt patentkrav 23, kännetecknad av att n är ungefär 34 - 1 100.

30 26. Aktiverad polymer enligt patentkrav 23, kännetecknad av att n är ungefär 45 - 110.

35 27. Aktiverad polymer enligt patentkrav 23, kännetecknad av att R är gruppen HO- , $\text{H}_3\text{CO-}$, $\text{CH}_2\text{=CH-SO}_2\text{-}$, $\text{X-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-}$ eller ett derivat av dessa eller någon annan polyetenglykol aktiverande grupp än $\text{CH}_2\text{=CH-SO}_2$ eller $\text{X-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2$ eller derivat av dessa.

28. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, som har följande struktur

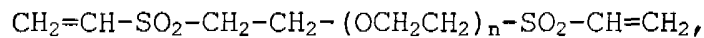


5

i vilken n är 5 - 3 000.

29. Aktiverad polymer enligt patentkrav 1, som har följande struktur

10



i vilken n är 5 - 3 000.

30. Icke-terapeutiskt biomaterial, kännetecknat av att det omfattar en yta och åtminstone en vattenlöslig polymerderivat som är kopplad till nämnda yta, där polymerderivatet är polyalkenoxid, poly(oxietylerad polyol) eller poly(olefinisk alkohol) och innehåller åtminstone en aktiv sulfondel med åtminstone två kolatomer kopplade till sulfongruppen $-\text{SO}_2-$ och en reaktiv del för specifik koppling till en tiol, där den reaktiva delen finns på den andra kolatomen räknat från sulfongruppen.

20

31. Icke-terapeutiskt biomaterial enligt patentkrav 30, kännetecknat av att det förekommer åtminstone en reaktiv grupp på den nämnda ytan och polymerderivatet är heterobfunktionalisk hundbensstruktur, som innehåller i sin ena enda en del, till vilken har kopplats en grupp som är närvarande på nämnda yta, och i sin motsatta enda har en aktiv sulfondel.

25

32. Icke-terapeutiskt biomaterial enligt patentkrav 31, kännetecknat av att den reaktiva gruppen är en aminogrupp och polymerdelen som kopplas till nämnda reaktiva aminogrupp är en aminselektiv del.

30

33. Icke-terapeutiskt biomaterial enligt patentkrav 30, kännetecknat av att aktiva sulfondelen är vinylsulfon, aktiv etylsulfon eller derivat av dessa.

35

34. Icke-terapeutiskt biomaterial enligt patentkrav 30, kännetecknat av att polymerderivatet innehåller PEG-polymer.

5 35. Förfarande för framställning av en isoleringsbar, vattenlöslig, aktiverad, organisk polymer som innehåller en aktiv sulfondel och där bindningen mellan polymeren och sulfondelen är hydrolysbeständig, kännetecknad av att förfarandet omfattar kopplandet av en svavelinnehållande del till polymerens kolatom och sedan förändring av denna del till en aktiv sulfondel, i vilken åtminstone två kolatomer är kopplade till sulfongruppen $-SO_2-$ och en reaktiv del för specifik koppling till en tiol, där den reaktiva delen finns på den andra kolatomen räknat från sulfongruppen.

10

15 36. Förfarande enligt patentkrav 35, kännetecknat av att det ytterligare omfattar isolering av nämnda aktiverade polymer som innehåller en aktiv sulfondel.

20 37. Förfarande enligt patentkrav 35, kännetecknat av att kopplandet av nämnda svavelinnehållande del direkt till polymerens kolatom omfattar åtminstone en i polymeren befinnande aktiverbar hydroxylgrupps aktivering och reagerande av den resulterande föreningen med en alkohol, som innehåller en tiolgrupp, så att svavel kan kopplas direkt till polymerens kol-kolkedja.

25

30 38. Förfarande enligt patentkrav 37, kännetecknat av att nämnda åtminstone en aktiverbar hydroxylgrupps aktivering omfattar substituering av hydroxylgruppen eller ersättning av hydroxylgruppens väte med en reaktivare grupp.

35 39. Förfarande enligt patentkrav 37, kännetecknat av att alkoholen som innehåller en tiolgrupp är merkaptoetanol.

40. Förfarande enligt patentkrav 37, kännetecknat av att alkoholen som innehåller en tiolgrupp förändras till en aktiv sulfondel genom att oxidera den

svavelinnehållande gruppens svavel till sulfon och genom att låta produkten reagera med en grupp som aktiverar hydroxylgruppen eller en ersättande grupp.

5 41. Förfarande enligt patentkrav 37, kännetecknat av att sulfonen är aktiv etylsulfon och förfarandet omfattar ytterligare bildande av en vinylsulfongrupp i polymeren genom att låta aktiv etylsulfon reagera med en stark bas.

10 42. Förfarande enligt patentkrav 35, kännetecknat av att

(a) polyetenglykol som innehåller åtminstone en aktiv hydroxylgrupp omsätts med en förening för att bilda en med endera ester eller halogenid substituerad polyetenglykol;

15 (b) i skede a) erhållna med ester eller halogenid substituerade polyetenglykol omsätts med merkaptoetanol för att ersätta ester- eller halogenidgruppen med en merkaptoetanolgrupp;

20 (c) i skede b) erhållna med merkaptoetanol substituerade polyetenglykol omsätts med oxideringsmedel för att oxidera merkaptoetanolens svavel till sulfon;

(d) i skede c) erhållna sulfon omsätts med en förening för att förändra merkaptoetanolens hydroxyldel till en ester- eller halogeniddel;

25 (e) i skede d) erhållna etylsulfon omsätts med en bas för att bilda polyetenglykolvinyllsulfon.

43. Förfarande enligt patentkrav 42, kännetecknat av att det ytterligare omfattar isolering av polyetenglykolvinyllsulfonet.

30 44. Förfarande enligt patentkrav 42, kännetecknat av att i skede d) är halogenen klor och i skede d) är produkten polyetenglykolkloretylsulfon och att förfarandet omfattar ytterligare isolering av polyetenglykolkloretylsulfon genom att lösa upp kloretylsulfon i diklormetan, fälla ut kloretylsulfon genom att tillägga lös-

35

ningen i etyleter och kristallisera fällningen ur etylacetat.

5 45. Förfarande enligt patentkrav 43, kännetecknat av att det omfattar ytterligare upplösning av polyetenglykolkloretylsulfonkristallerna i organiskt lösningsmedel före reaktionen med en bas för att bilda polyetenglykolvinylsulfon och att polyetenglykolvinylsulfonprodukten isoleras genom filtrering för att avlägsna basen och avdunstning av lösningsmedlet.

10 46. Förfarande för framställning av en isolerbar, vattenlöslig, aktiverad, organisk polymer som innehåller en aktiv sulfondel och vars bindning mellan polymeren och sulfondelen är hydrolysbeständig, kännetecknat av att förfarandet omfattar kopplandet av en bindningsdel, som
15 innehåller en aktiv sulfondel och en annan aktiv del, med polymerderivatet, som är polyalkenoxid, poly(oxietylerad polyol) eller poly(olefiinisk alkohol), som innehåller en annan funktionell grupp än en sulfongrupp och där den funktionella gruppen är selektiv vad beträffar kopplingen
20 till den andra aktiva delen, varvid tidigare nämnda aktiva sulfondel omfattar åtminstone två kolatomer som är kopplade till sulfongruppen $-SO_2-$ och en reaktiv del för specifik koppling till en tiol, där den reaktiva delen finns på den andra kolatomen räknat från sulfongruppen.

25 47. Förfarande enligt patentkrav 46, kännetecknat av att polymerderivatets funktionella grupp kan reagera selektivt med aminogrupeer och kopplingsdelens andra aktiva del innehåller en aktiv aminogrupp.

30 48. Förfarande enligt patentkrav 46, kännetecknat av att polymerderivatet är en aktiv PEG-suckinimidylester och kopplingsdelens struktur är $NH_2-CH_2-CH_2-SO_2-CH=CH_2$.

35 49. Förfarande enligt patentkrav 46, kännetecknat av att det ytterligare omfattar framställning av ett polymerderivat, som är polyetenglykol, polypropenglykol, poly(oxietylerad glycerol), poly(oxietylerad sor-

bitol), poly(oxietylerad glukos) eller polyvinylalkohol, som innehåller en funktionell grupp som är selektiv mot aminogrupper; framställning av en kopplingsdel, som innehåller en aminogrupp och en sulfondel; och koppling av
5 kopplingsdelens aminogrupp med den aktiva delen av polymerderivatets aminoselektiva del.

50 Förfarande för framställning av ett konjugat av ett ämne och en vattenlöslig aktiverad polymer, som är polyalkenoxid, poly(oxietylerad polyol) eller poly(olefinisk alkohol), vars polymer innehåller åtminstone en sulfondel,
10 kännetecknat av att förfarandet omfattar omsättning av nämnda ämne med den aktiverade polymeren som innehåller en sulfondel, och bildande av en bindning mellan nämnda ämne och polymerderivatet.

15 51. Förfarande enligt patentkrav 50, kännetecknat av att nämnda ämne innehåller en aktiv tiolgrupp och bindningen är mellan tiolgruppen och sulfonden.

20 52. Förfarande enligt patentkrav 50, kännetecknat av att nämnda ämne innehåller en aktiv aminogrupp, polymerderivatet innehåller en aminoselektivgrupp, och att bindning bildas mellan aminogruppen och aminoselektivagrupper.

25 53. Förfarande enligt patentkrav 50, kännetecknat av att den aktiverade polymeren är polyetenglykol, polypropenglykol, poly(oxietylerad glycerol), poly(oxietylerad sorbitol), poly(oxietylerad glukos) eller polyvinylalkohol.

30 54. Förfarande enligt patentkrav 50, kännetecknat av att nämnda ämne är syntetiska ämnen som lämpar sig för biomaterial, proteiner, läkemedel, celler eller vitaminer.

35 55. Förfarande för framställning av ett konjugat av en biologiskt aktiv molekyl och ett aktivt derivat av polyetenglykol, kännetecknat av att förfarandet omfattar omsättande av den biologiskt aktiva molekylen, som

innehåller en reaktiv tiolgrupp, med polyetenglykolderivatet, som innehåller en aktiv sulfondel, för att bilda en bindning mellan tiolgruppen och den aktiva sulfondelen.

5 56. Förfarande enligt patentkrav 55, kännetecknat av att reaktionen mellan den biologiskt aktiva molekylens och polyetenglykolderivatet sker i förhållanden där pH är lägre än ungefär 11.

10 57. Förfarande enligt patentkrav 55, kännetecknat av att reaktionen mellan den biologiskt aktiva molekylens och polyetenglykolderivatet utförs i ungefär pH 9 eller under det.

58. Förfarande enligt patentkrav 55, kännetecknat av att den aktiva sulfondelen är vinylsulfon, aktiv etylsulfon eller ett aktivt derivat av dessa.

15 59. Förfarande för framställning av ett biologiskt aktivt konjugat av åtminstone en biologiskt aktiv molekyl, vars struktur är W-SH, i vilken W- är den biologiskt aktiva delen och -SH är en reaktiv tiolgrupp, och ett aktiverat polyetenglykolderivat som innehåller åtminstone en aktiv sulfondel och vars struktur är $R-CH_2-CH_2-(OCH_2CH_2)_n-Y$, i vilken n är 5 - 3 000, Y är gruppen $-SO_2-CH=CH_2$ och R är gruppen HO-, H_3CO- , $X-CH_2-CH_2-SO_2-$, i vilken X är halogen, eller $CH_2=CH-SO_2$, kännetecknat av att förfarandet omfattar omsättning av den biologiskt aktiva molekylens med det aktiverade polyetenglykolderivatet och bildande av en bindning mellan den aktiva tiolgruppen och åtminstone en av polyetenglykolderivatets aktiva sulfondelar.

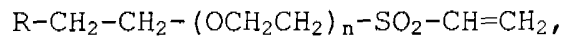
20 60. Förfarande enligt patentkrav 59, kännetecknat av att W är protein.

30 61. Förfarande enligt patentkrav 60, varvid det biologiskt aktiva konjugatet har strukturen

protein-S- $CH_2-CH_2-SO_2-CH_2-CH_2-(OCH_2CH_2)_n-SO_2-CH_2-CH_2-S$ -protein

35 i vilken, n är 5 - 3 000, kännetecknat av, att förfarandet omfattar (1) omsättande av åtminstone ett protein, som in-

nehåller en aktiv tiolgrupp med ett med sulfon aktiverat polyetenglykolderivat, vars struktur är

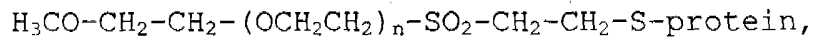


5

i vilken R är gruppen $CH_2=CH-SO_2-$ eller $X-CH_2-CH_2-SO_2$, i vilken X är halogen, och (2) bildande av en bindning mellan proteinets aktiva tiolgrupp och den aktiverade polymerens aktiva sulfondel.

10

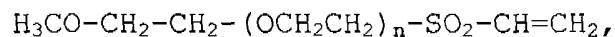
62. Förfarande enligt patentkrav 60, varvid det biologiskt aktiva konjugatet har strukturen



15

i vilken n är 5 - 3 000, kännetecknat av att förfarandet omfattar (1) omsättning av ett protein som innehåller en aktiv tiolgrupp, med ett aktiverat polyetenglykolderivat, vars struktur är

20



och (2) bildandet av en bindning mellan proteinets aktiva tiolgrupp och den aktiverade polymerens aktiva sulfondel.