



[12] 发明专利申请公开说明书

[11] CN 87 1 04249 A

CN 87 1 04249 A

3) 公开日 1987 年 12 月 9 日

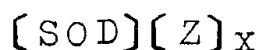
21) 申请号 87 1 04249 22) 申请日 87.5.16 30) 优先权 (32)86.5.16 (33)JP (31)113095/86 (32)87.2.27 (33)JP (31)45666/87 71) 申请人 井上正康 地址 日本熊本县 共同申请人 可乐丽股份有限公司 72) 发明人 井上正康 荻野哲也 森野能昌 广田昌彦	(74) 专利代理机构 中国专利代理有限公司 代理人 杨 钢
---	--

(54) 发明名称 超氧化物歧化酶衍生物制备方法及医学上的应用

(57) 摘要

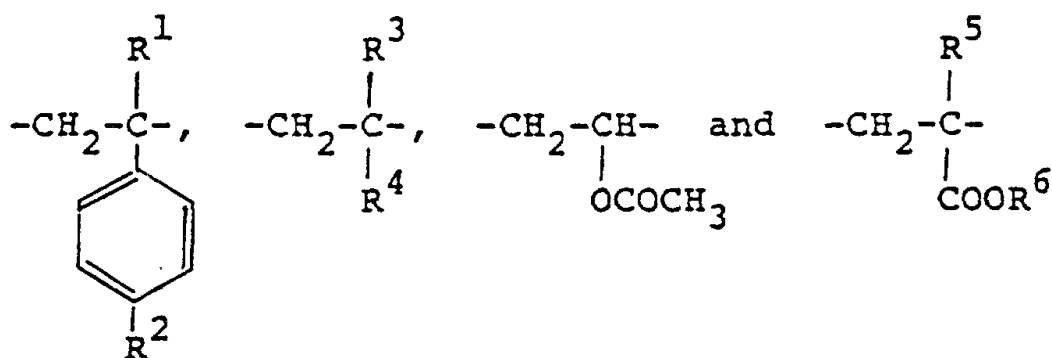
一种新的超氧化物歧化酶衍生物, 这种衍生物具有分解超氧化物的酶活力, 超氧化物是对机体有害的物质。本发明所提供的超氧化物歧化酶衍生物在血浆中的半寿期大大长于超氧化物酶本身, 而且保留大部分酶活力。这种物质有药理学的活性, 例如具有对炎症、局部出血损伤、大脑水肿等的保护作用。本发明还提供了制造这种超氧化物歧化酶衍生物的一种方法及其在医疗上的应用。

1、具有如下通式的超氧化歧化酶衍生物，



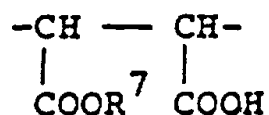
其中 [SOD] 是超氧化歧化酶残基，此残基含 1 - 6 个基团，每个基团是由氨基衍生的，通过在相应的氨基上除去一个氢原子后所衍生的，[Z] 是一个单价共聚物残基，由以下组份单位组成：

(a) 从下列组成的基团中选择的一种基团：



其中 R^1 , R^3 和 R^5 是氢原子或甲基， R^2 是氢原子、氯原子、溴原子或甲基， R^4 是氢原子或含 1 - 5 个碳原子的烷基， R^6 是甲基或乙基；

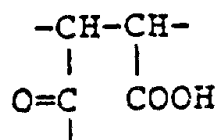
(b) 具有如下通式的基团：



其中 R^7 是氢原子或含 1 - 4 个碳原子的链烷醇残基、乙二醇单烷醚

(其烷基含1—4个碳原子)或甘油二烷醚(其每个烷基含1—4个碳原子)作为除去羟基后生成的产物;

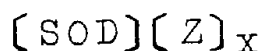
(c)具有如下通式的基团:



其中羰基碳原子通过〔SOD〕的一个氨基氮原子结合到〔SOD〕上;

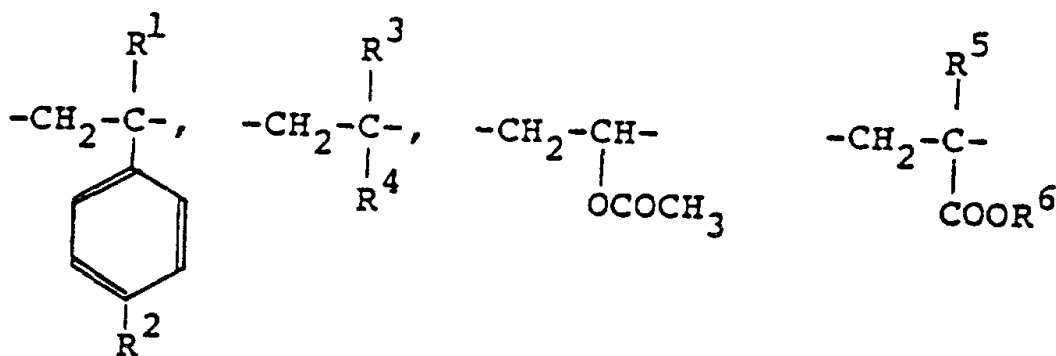
共聚物残基具有平均分子量800—20,000, X是1—6的整数,相当于〔SOD〕基团的数目,每个SOD基团是通过氨基上除去一个氢原子后所衍生的。

2、生产具有下列通式的超氧化物歧化酶衍生物的方法,



其中〔SOD〕是超氧化物歧化酶残基,含1—6个基团,每个基团是在相应的氨基上除去一个氢原子后衍生的,〔Z〕是一个单价的共聚物残基,由以下组份单位组成:

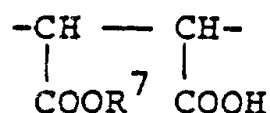
(a)从以下组成的基团中选择的一种基团:



其中 R^1 , R^3 和 R^5 各为氢原子或甲基, R^2 是氢原子、氯原子、

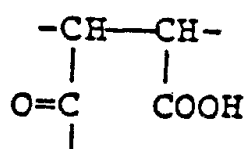
溴原子或甲基， R^4 是氢原子或含 1—5 个碳原子的烷基， R^6 是甲基或乙基；

(b) 具有以下通式的基团



其中 R^7 是氢原子或含 1—4 个碳原子的链烷醇残基、乙二醇单烷醚（其烷基含 1—4 个碳原子）或甘油二烷醚（其每个烷基含 1—4 个碳原子）作为除去羟基后生成的产物；以及

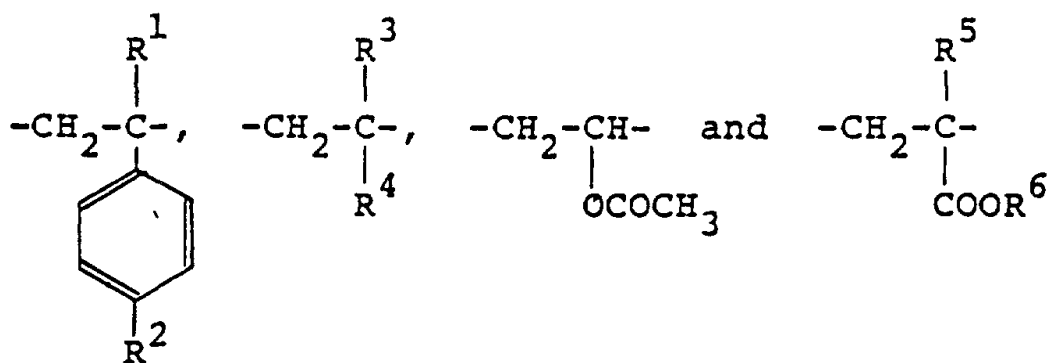
(c) 具有以下通式的基团：



其中羰基碳原子通过〔SOD〕的一个氨基氮原子结合到〔SOD〕上，

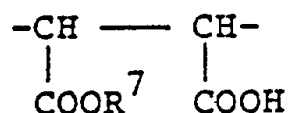
共聚物残基具有平均分子量 800—20,000， X 是 1—6 的整数，相当于〔SOD〕基团的数目，每个 SOD 残基是通过在氨基上除去一个氢原子后衍生的，它包括超氧化物歧化酶与由下列组份单位所组成的共聚物（其平均分子量为 800—20000），在碱性水溶液中 PH 为 7—11 起反应，组份单位如下：

(a) 从下列通式组成的基团中选择一种基团，



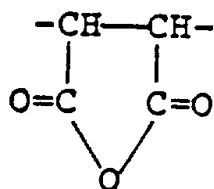
其中 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 和 R^6 如上所规定,

(b) 具有以下通式的基团:



其中 R^7 是按如上所规定, 以及

(c) 具有以下通式的基团:



3、根据权利要求2的方法, 其中超氧化物歧化酶是人型超氧化物歧化酶或牛型超氧化物歧化酶。

4、根据权利要求2的方法, 其中超氧化物歧化酶是人红血球超氧化物歧化酶或牛红血球超氧化物歧化酶。

5、根据权利要求2的方法, 其中多聚物是选自下列部分水解后的基团, 苯乙烯-、对-氯苯乙烯-、对-溴苯乙烯-或 α -甲基苯乙烯-马来酸酐共聚物; 部分半酯化的苯乙烯-、对-氯苯乙烯-、对-溴苯乙烯或 α -甲基苯乙烯-马来酸酐共聚物; 部分水解的乙

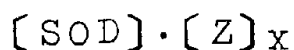
烯-、丙烯-、 α -丁烯-、异丁烯-、1-戊烯-、2-甲基-1-丁烯-、1-己烯-、1-庚烯-马来酸酐共聚物；部分半酯化的乙烯-、丙烯-、 α -丁烯-、异丁烯-、1-戊烯-、2-甲基-1-丁烯-、1-己烯-、或1-庚烯-马来酸酐共聚物；部分被水解的醋酸乙烯酯-马来酸酐共聚物、部分半酯化的醋酸乙烯酯-马来酸酐共聚物；部分水解的(甲基)丙烯酸甲酯-马来酸酐共聚物；部分半酯化的(甲基)丙烯酸甲酯-马来酸酐共聚物；部分水解的(甲基)丙烯酸乙酯-马来酸酐共聚物；部分半酯化的(甲基)丙烯酸乙酯-马来酸酐共聚物。

6、根据权利要求2的方法，其中共聚物的量为每摩尔超氧化物歧化酶含约0.5摩尔到30摩尔。

7、根据权利要求2的方法，其中PH 7-11的碱性水溶液是指碳酸钠、碳酸氢钠、醋酸钠或磷酸钠溶液。

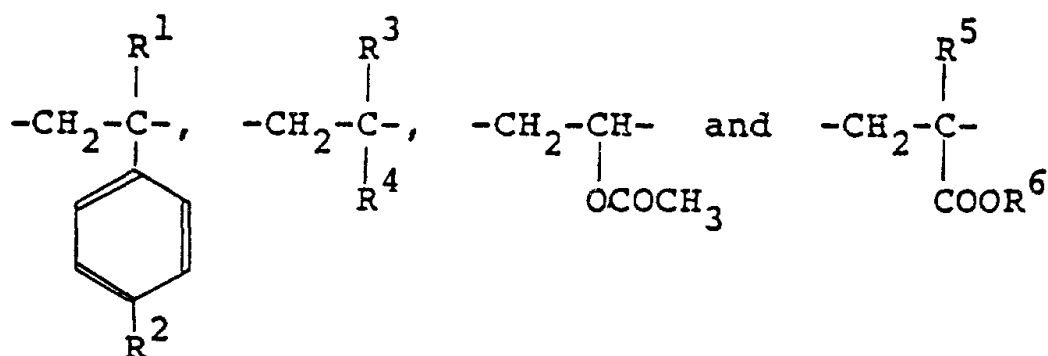
8、根据权利要求2的方法，其中反应温度范围大约为3-50℃。

9、含通式如下的超氧化物歧化酶衍生物的药物，其通式为：



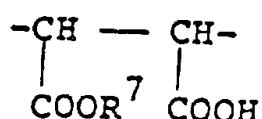
其中[SOD]是超氧化物歧化酶残基，它含1-6基团，分别由相应的氨基上除去一个氢原子后衍生的，[Z]是单价的共聚物残基，由以下组份单位组成的：

(a) 从下列组成的基团中选择的一种基团：



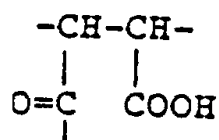
其中 R^1 , R^3 和 R^5 各是氢原子或甲基, R^2 是氢原子、氯原子、溴原子或甲基, R^4 是氢原子或含 1 - 5 碳原子的烷基, R^6 是甲基或乙基;

(b) 具有以下通式的基团:



其中 R^7 是氢原子或含 1 - 4 碳原子的链烷醇残基、乙二醇单烷醚 (其烷基含 1 - 6 个碳原子) 或甘油二烷醚 (其烷基含 1 - 4 个碳原子) 作为除去羟基后生成的产物;

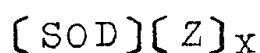
(c) 具有如下通式的基团:



其中羰基的碳原子通过 [S O D] 氨基氮原子结合到 [S O D] 上,

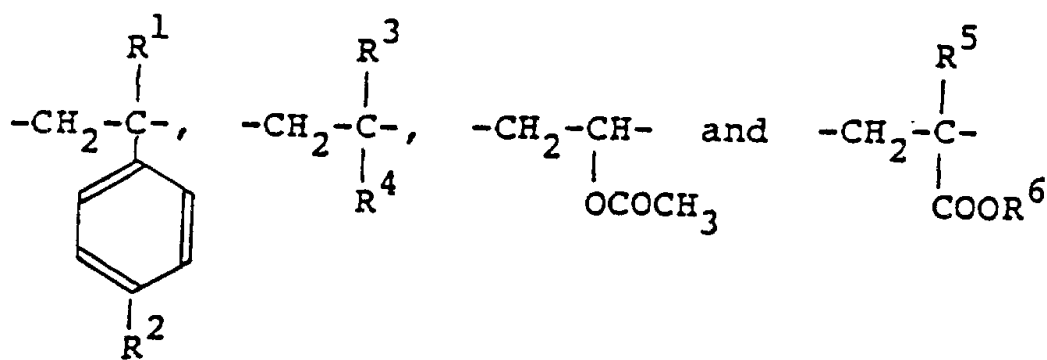
共聚物残基具有平均分子量 8000-20000，X 是 1-6 的整数，相当于〔SOD〕的基团数，每个〔SOD〕基团是通过氨基上除去一个氢原子后所衍生的。

10、用于预防和治疗炎症和/或局部出血症的一种药物组合物，此组合物包含对于预防或治疗炎症和/或局部出血症有效量的超氧化物歧化酶衍生物以及一种药理上可接受的稀释剂或载体，此超氧化物歧化酶通式为：



此式中〔SOD〕是一超氧化物歧化酶的残基，含 1-⑤ 个基团，每个基团从相应的氨基上除去一个氢原子后所衍生的，〔Z〕是单价的共聚物残基，由下列组份单位组成：

(a) 从以下组成的基团中选择一个基团：



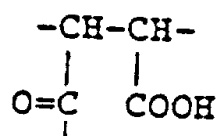
其中 R^1 ， R^3 和 R^5 各为氢原子或甲基， R^2 是氢原子、氯原子、溴原子或甲基， R^4 为氢原子或含 1-5 碳原子的烷基， R^6 为甲基或乙基；

(b) 具有以下通式的基团：



其中 R^7 是氢原子或含 1 - 4 个碳原子的链烷醇残基，乙二醇单烷醚（其烷基含 1 - 4 个碳原子）或甘油二烷醚（其烷基各含 1 - 4 个碳原子）作为除去羟基后生成的产物；

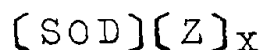
(c) 具有以下通式的基团：



其中羰基的碳原子通过〔SOD〕的氨基的氮原子结合到〔SOD〕上，

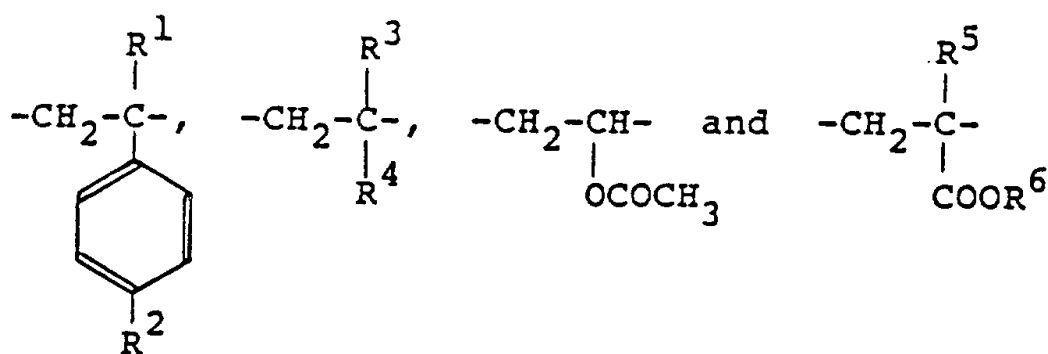
共聚物残基具有平均分子量 800 - 20000，X 为 1 - 6 的整数，相当于〔SOD〕基团数目，每个 SOD 基团是通过氨基上除去一个氢原子后衍生的。

1 1、预防和治疗炎症和/或局部出血症的方法，此方法包括给予预防和/或治疗炎症和/或局部出血症有效量的超氧化物歧化酶衍生物，其通式为：



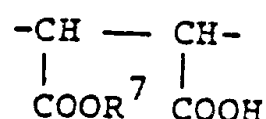
式中〔SOD〕是超氧化物歧化酶残基，含 1 - 6 个基团，每个基团从相应的氨基上除去一个氢原子后所衍生的，〔Z〕是单价的共聚物残基，由以下组份单位组成：

(a) 从以下组成的基团中选择一个基团



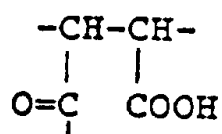
其中 R^1 , R^3 和 R^5 各是氢原子或甲基, R^2 是氢原子、氯原子、溴原子或甲基, R^4 是氢原子或含 1 - 5 个碳原子的烷基, R^6 是甲基或乙基;

(b) 具有以下通式的基团:



其中 R^7 是氢原子或含 1 - 4 个碳原子的链烷醇残基、乙二醇单烷醚 (其烷基含 1 - 4 个碳原子) 或甘油二烷醚 (其烷基各含 1 - 4 个碳原子) 作为除去羟基后生成的产物; 以及

(c) 具有以下通式的基团:



其中羰基的碳原子通过 [S O D] 的氨基氮原子结合到 [S O D] 上, 共聚物残基具有平均分子量 800 - 20,000, X 是 1 - 6 的整数, 相当于 [S O D] 基团的数目, [S O D] 基团是通过氨基上除去一个氢原子后衍生的。

超氧化物歧化酶衍生物制备方法及医学上的应用

本发明涉及超氧化物歧化酶衍生物，制备方法及医学上的应用。

超氧化物歧化酶（在下文中缩写为SOD）一直被认为广泛存在于生物体中的一种酶，如动物、植物和微生物中都有，具有分解超氧化物的能力，超氧化物是一种对有机体有害的化合物。最近，人们试图利用被分离的SOD作为抗炎症药物〔Farumashia, 17, 411(1981); Current Therapeutic Research, 16, 706(1974)〕。SOD用在对难治疗的辐射引起的结肠炎或在预防和治疗胃溃疡病方面已有研究〔Jikken Igaku (Experimental Medicine), 4(12), 39(1986)〕。

从下面叙述的实验结果很清楚，人型SOD实际上缺乏抗炎症的活性，而且抗溃疡的活性很弱。

据说，当静脉给予SOD在血浆中的半寿期仅4—6分钟；SOD迅速被代谢并排泄到尿中。为延长SOD在血浆中的半寿期，试图用聚蔗糖，聚乙二醇或大鼠清蛋白进行修饰，将SOD转变为大分子。但是，利用聚蔗糖或聚乙二醇修饰的SOD，酶活力大大降低，而大鼠清蛋白修饰的SOD有抗原性。曾报导，菊粉修饰的SOD跟未修饰的SOD比，降低了SOD的活力，却大大延长了它在血浆中半寿期〔Japanese Kokai Tokkyo Koho No.58-32826〕。但是，这些修饰的SOD或由于上述原因或由于其分子体积增大，使在组织中的穿透力降低，在实际应用中均有问题。

本发明的目的是提供新的超氧化物歧化酶衍生物，这种衍生物在

血浆中半寿期比S O D大大延长，保留绝大部分S O D的酶活力，不增加S O D的分子大小。

本发明的另一个目的是提供新的、安全的超氧化物歧化酶衍生物，它具有药理学活性，如抗炎症，防止局部出血损伤，预防大脑水肿等作用。

本发明的第三个目的是提供生产上述超氧化物歧化酶衍生物的方法。

本发明的第四个目的是提供此超氧化物歧化酶衍生物作为药物的应用，例如作为抗炎症药物，抗局部出血损伤的保护剂以及用于治疗大脑水肿的药物。

本发明中的这些目的及其他目的和优点，将在下面详述中使本专业技术人员更清楚地了解。

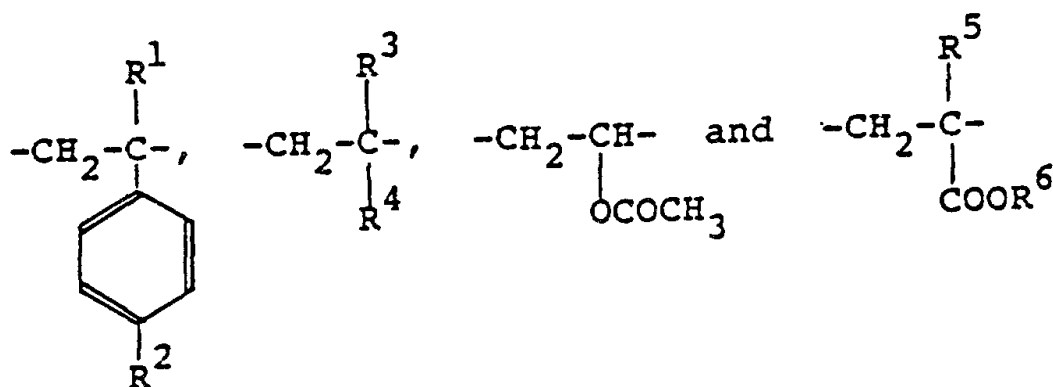
本发明提供具有如下通式的超氧化物歧化酶衍生物：



式中[S O D]是超氧化物歧化酶残基，含1—6个基团，每个基团是从氨基衍生的，通过在相应的氨基上除去一个氢原子后所衍生的，

[Z]是由下列组份单位组成的一价共聚物残基：

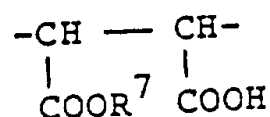
(a) 从下列组成的基团中选择的一种基团：



其中R¹，R³和R⁵分别是氢原子或甲基；R²是氢原子、氯原子、

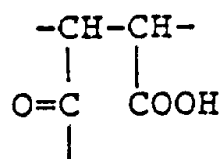
溴原子或甲基； R^4 是氢原子或含 1—5 个碳原子的烷基； R^6 是甲基或乙基。

(b) 具有如下通式的基团：



其中 R^7 是氢原子或含 1—4 个碳原子的链烷醇，乙二醇单烷基醚（其烷基含 1—4 个碳原子）或是甘油二烷基醚（其烷基各含 1—4 个碳原子），作为除去羟基后生成的产物。

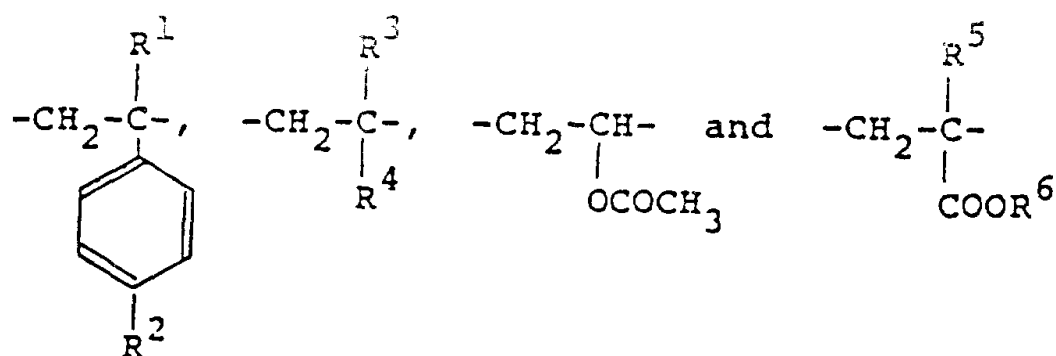
(c) 具有如下通式的基团：



其中羰基的碳原子通过〔SOD〕氨基的氮原子结合到〔SOD〕上，共聚物残基具有平均分子量为 800—20,000 和 X 是 1—6 的整数，相当于 SOD 的基团数目，每个 SOD 基团是由除去一个氢原子后的氨基衍生来的〔在下文中超氧化物歧化酶衍生物称为 SOD 衍生物〕。

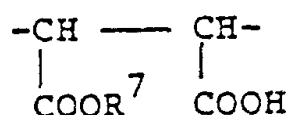
本发明也提供了生产上述 SOD 衍生物的方法，此方法包括使 SOD 与下列组份单位组成的共聚物（其平均分子量为 800—20000）在碱性水溶液中 pH 为 7—11 相反应，组份单位如下：

(a) 从下列组成基团中选择的基团，



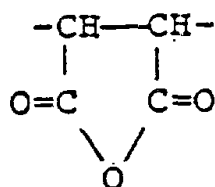
其中 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 如上所规定 ;

(b) 具有如下通式的基团 :



其中 R^7 如上所规定 ;

(c) 具有如下通式的基团 :



本发明进一步提供以 S O D 衍生物作为主要成份的药剂和药用组合物。

在附图中 ,

图 1 表明在 S O D 和 B u -SMA(部分半丁 酯化的苯乙烯 - 马来酸酐共聚物 ; 在下文中将同样使用) 反应的情况下 , S O D 中所含 T N B S - 可滴定氨基减少的百分数和反应时间的关系。 B u -SMA 将在合成例 3 中叙述 ;

图 2 表明合成例 1 和合成例 2 中分别所得的 S O D 衍生物和起始材料 S O D 的紫外吸收光谱；

图 3 表明在实验例 5 所得的反应混合物中 B u - S M A 浓度和所得的 S O D 衍生物中 T N B S - 可滴定氨基含量之间的关系，以及此 B u - S M A 浓度和 S O D 衍生物中 S O D 活性之间的关系；

图 4(1)表明人红血球 S O D 的红外光谱；

图 4(2)表明牛红血球 S O D 的红外光谱；

图 5、图 6、图 7 分别显示了在合成例 7 - 1，7 - 2，7 - 3 中分别所得的 S O D 衍生物的红外光谱；

图 8 表明合成例 1 用⁵¹ C r 标记后所合成的 S O D 衍生物，按给定的 P H 和放射性下等电聚焦的实验结果；

图 9 表明在合成例 2 中用⁵¹ C r 标记后所得 S O D 衍生物按给定的 P H 和放射性下等电聚焦的实验结果；

图 1 0 表明按合成例 2 所得的 S O D 衍生物和开始材料的 S O D 经牛血清清蛋白 - 琼脂糖凝胶柱亲和层析的结果；

图 1 1 表明按合成例 2 所得的 S O D 衍生物和起始材料 S O D 本身耐各种蛋白酶水解的比较；

图 1 2 表明按合成例 2 所得的 S O D 衍生物和起始材料 S O D 大鼠静脉给药后，在血浆中的浓度随时间变化的过程；

图 1 3 表明 S O D 衍生物和 B u - S M A 静脉给药后，小鼠股骨肌中不同时间的蓄积过程，预先将 0.2ml 的 HEPES 缓冲液 (P H 6.0) 肌肉注射到小鼠左侧股骨肌 (酸性侧面)，0.2ml 生理盐水注射到右侧股骨肌 (对照侧面)；

图 1 4 表明 S O D 衍生物对大鼠强制性浸水形成急性胃粘膜损伤

的抵抗能力的实验中所得的溃疡指数 (mm/组织) 和浸水时间之间的关系；

图 1 5(1)表明 S O D 衍生物在诱导产生水肿的大鼠右侧大脑半球 (损伤侧面)，左侧大脑半球 (完整侧面或对照侧面) 以及血浆中的蓄积；

图 1 5(2)表明 B u - S M A 在上述相同大鼠的损伤侧面、完整侧面和血浆中的蓄积；

图 1 6 表明小鼠用农药百草枯处理后，给 S O D 衍生物和仅用百草枯处理不给 S O D 衍生物 (对照组)，处理时间和血浆中 G O T 水平的关系。

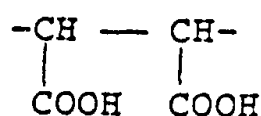
现就按本发明产生 S O D 衍生物的方法作详细说明。

S O D 与共聚物的反应一般按以下方法进行，将 S O D 溶解在一种盐的水溶液中，这种盐可以是碳酸钠、碳酸氢钠、醋酸钠、磷酸钠等，再加入共聚物，可以粉末状或溶于有机溶剂 (如二甲亚砜等) 的形式加入。反应期间，溶液 P H 维持在 7 - 11。P H 低时，共聚物溶解度降低，反应不能进行。当 P H 高于 11 时，S O D 的酶活力丧失，得不到本发明中的 S O D 衍生物。反应温度选在 3° - 50℃ 为宜，最好在 3 - 40℃。反应时间取决于温度和共聚物加入的方式，但一般为 10 分钟至 3 小时。共聚物的所用量是每摩尔 S O D 约 0.5 - 30 摩尔。共聚物结合到每个 S O D 分子上的分子数目，可以通过在上述范围内改变共聚物的量加以调节。

如此所得的反应混合物中，含有 S O D 衍生物、未反应的 S O D 及共聚物等。将此反应混合物过滤，滤液经过凝胶过滤。如必要，所得的含 S O D 衍生物的洗脱液再进行疏水层析，再超滤浓缩。冻干得

固体 S O D 衍生物。

在上述反应中，S O D 的氨基和共聚物的马来酸酐环起反应，形成 S O D 衍生物。例如，人型 Cu.Zn-S O D 每分子含 22 个氨基（在人红血球的 S O D，或利用基因工程通过酵母产生人型 S O D 的情况下）或每分子含 24 个氨基（在用基因工程方法通过大肠杆菌产生人型 S O D 的情况下）。上述反应中 S O D 的任何一个氨基，都能和共聚物的马来酸酐环起反应，生成的 S O D 衍生物中，每个 S O D 分子结合 1—6 个共聚物分子。每个起始原料的共聚物平均含 0.5 至 2 个马来酸酐环。当一个马来酸酐环和 S O D 的氨基反应时，其余的马来酸酐环几乎不和另外的 S O D 氨基反应，而倾向于与水反应，由于水解，生成马来酸衍生基团：



因此，上述的 S O D 衍生物的组份单位 (b) 也包括了上述基团，此基团中 R⁷ 是氢原子。当以部分半酯化的共聚物作为起始材料时，此组分单位 (b) 不仅包括半酯化的马来酸衍生物的基团，而且也包含小部分马来酸衍生物基团。有可能一分子共聚物和多个 S O D 分子反应生成副产物，其中共聚物的多个马来酸酐环各与每个 S O D 分子中的一个氨基反应并结合。即使有少量的这种副产物杂质，按本发明合成的 S O D 衍生物也能作医疗上使用，根据本发明没有任何特殊的困难。然而，考虑到现时的情况，作为医药的有效成份的化合物，最好具有确定的单一化学结构。就 S O D 衍生物论，当含有相当量的上述副产物时，可采用凝胶过滤或某些其他处理方法，来除去这种副产物，

用这样纯化了的的产品作为医疗上的有效成份的化合物将更为理想。上述反应所得的SOD衍生物是SOD—共聚物偶联产物的混合物，这种偶联产物每分子SOD结合的共聚物分子的数量不等。因此，在前面表达本发明所提供的SOD衍生物的分子式中，X数目表示与每个SOD分子偶联的共聚物分子的平均数。当每个SOD分子偶联的共聚物分子，在数目上为均一的SOD衍生物时，作为有效成分化合物是所希望的。通过上述凝胶过滤或某些其他适当的处理，有可能得到这样的SOD衍生物。在上述反应及以后的处理步骤中，SOD衍生物的羧基可能形成碱金属盐或铵盐。本发明中的SOD衍生物也含有从盐的形式构成的羧基。

随着每个SOD分子中共聚物分子的增加，SOD衍生物的酶活力倾向于逐渐降低。每个SOD分子中含7个或更多共聚物分子的SOD衍生物，其酶活力太低，因此不适合于用作医疗有效成份。每分子SOD含1—4共聚物分子的SOD衍生物较为适宜。因为它保留高水平的酶活力及其他有利的性能，如延长在血液循环中的半寿期。每分子SOD上结合2分子共聚物的SOD衍生物是最理想的。

起始材料SOD是得自下列生物体来源的提取物，如动物（人，牛等）、植物、微生物，通过已知的方法或采用基因工程的技术进行生产。SOD的化学结构（有关配位金属，分子量，氨基酸顺序等）在一定程度上已被阐明。现在已把SOD分为三类，即Fe-SOD，Mn-SOD和Cu·Zn-SOD，分子量30,000—80,000之间，其分子量大小取决于品种和亚细胞间格。三种不同的SOD氨基酸顺序彼此不同。有关这方面细节参阅Yoshihiko Oyanagi: “超氧化物和医学”，74—90页，Kyoritsu Shuppan

5月25日, 1981发表; Journal of Biological Chemistry, 246, 2875-2880(1971); 同一杂志, 250, 6107-6112(1975); Proceedings of the National Academy of Science, 70, 3725-3729(1973), 及 Archives of Biochemistry and Biophysics, 179, 243-256(1977)等。最符合要求作为起始材料的SOD是人型Cu·Zn-SOD。其分子量为33,000, 分子中含22或24个氨基。例如将人血经加热处理、离子交换和凝胶过滤这样的程序, 或采用基因工程技术能够得到人型SOD。

通过相应于上述组分单位(a)中一种单体的共聚物部分水解, 及马来酸酐的部分水解〔上述部分水解是指水解进行到这样程度, 即小量(每分子平均0.5-2)马来酸酐环仍然保留, 而其余的环已被水解〕; 或通过这种共聚物和乙醇的部分半酯化作用〔上述部分半酯化作用进行到这样程度, 即小量(平均每分子0.5-2)马来酸酐环被保留, 而其余的环已被半酯化〕可得到这种初始材料的共聚物。按上述方法得到的共聚物的例子有: 部分水解的苯乙烯-、对-氯苯乙烯-、对-溴苯乙烯-或 α -甲基苯乙烯-马来酸酐共聚物; 部分半酯化的苯乙烯-、对-氯苯乙烯-、对-溴苯乙烯-或 α -甲基苯乙烯-马来酸酐共聚物(甲酯、乙酯、丙酯、正丁酯、甲氧基乙酯、乙氧基乙酯、丙氧基乙酯、正丁氧基乙酯、1,3-二甲氧基-2-丙酯、2,3-二甲氧基-1-丙酯、1,3-二氧基-2-丙酯、2-乙氧基-3-甲氧基-1-丙酯、1,3-二丙氧基-2-丙酯、1,3-一二丁氧基-2-丙酯, 等等); 部分水解的乙烯-、丙烯-、 α -丁烯-、异丁烯-、1-戊烯-、2-甲基-1-丁烯-、1-己烯-

或 1-庚烯-马来酸酐共聚物；部分半酯化的乙烯-、丙烯-、 α -丁烯-、异丁烯-、1-戊烯-、2-甲基-1-丁烯-、1-己烯-或 1-庚烯-马来酸酐共聚物（如上述例子中所列的同样的酯）；部分水解的醋酸乙烯酯-马来酸酐共聚物；部分半酯化的醋酸乙烯酯-马来酸酐共聚物；部分水解的（甲基）丙烯酸甲酯-马来酸酐共聚物；部分半酯化的（甲基）丙烯酸甲酯-马来酸酐共聚物；部分水解的（甲基）丙烯酸乙酯-马来酸酐共聚物；部分半酯化的（甲基）丙烯酸乙酯-马来酸酐共聚物；等等。

所有这些共聚物都含疏水基和亲水基，因此有适当的疏水性。同时，含有极性羧基。因此含此共聚物的 SOD 衍生物能可逆地和血清蛋白及生物膜结合，从而延长了在血液循环中的半寿期以及改善向器官的转移。其他 SOD 衍生物中，含苯乙烯衍生物作为组分单位 (a) 和含半酯化基团作为组分单位 (b) 的 SOD 衍生物，产生这些作用更好，因为它们有相对高的疏水性。

在共聚物中组分单位 (a) 对组分单位 (b) 和 (c) 的比，即 $[(a) / \{ (b) + (c) \}]$ ，大约 1~1.3 是最好的。此比例通常等于 1。克分子比例低于 1 的共聚物，用相应于组分单位 (a) 的一个单体和马来酸酐共聚合作用很难获得。克分子比例高于 1.3 的共聚物，当组分单位 (b) 是一个半酯化的单体时，得到的产物不理想，因为它们在含盐水溶液中的溶解度不好，不易和 SOD 反应。

所有上述共聚物在技术上是众所周知的。所得产物的平均分子量范围在 800-20,000。从这些共聚物所得的 SOD 衍生物向有效部位转移的观点看，共聚物分子量最好不大于 3,000。共聚物的分子量在分布上没有特殊的限制。因此，通过相应于上述组分单

位 (a) 的单体和马来酸酐 (共聚物重均分子量 / 数均分子量之比约为 2 . 0 或更高) 的自由基引发共聚作用所产生的共聚物 , 可以用作原料。此共聚物可不通过分级分离而进行部分水解或部分半酯化以用作原料 ; 或通过分级分离 , 以获得分子量分布较窄的产物 , 接着再进行部分水解或部分半酯化 , 以用作原料。

下列试验例子说明根据本发明制备的 S O D 衍生物的药理学特性。

试验例 1

S O D 衍生物在局部 P H 降低的组织中特异蓄积

体重约 2 0 克小鼠分别肌肉注射 0 . 2ml 0 . 15M HEPES 缓冲液 (P H 6 . 0) 和 0 . 2ml 生理盐水于左和右股骨肌 , 然后立即用合成例 2 中所述步骤 , 制备¹²⁵I 标记的 S O D 衍生物 (14n mol) , 或在合成例 2 中使用的相应于 Bu-SMA 的 ³H- 标记的 Bu-SMA (0 . 22 μmol) , 作静脉注射 , 在所指的间隔内测量蓄积在左右股骨肌中的放射性 , 结果如图 1 3 所示。在左股骨肌中 (酸侧面) 放射性显著高于右股骨肌 (对照侧面) , 表明通过 S O D 与 Bu-SMA 偶联 , 按照合成例 2 的 S O D 衍生物 , 选择性地吸收进入酸性组织中 (在炎症一侧 P H 较低) 。

试验例 2

局部出血的抑制作用和抗炎作用

方法

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (体重约 2 0 0 克) 饥饿过夜 , 放入强制性笼中 , 6 只动物为一组 , 将笼子浸入 2 2 ℃ 水中至动物剑突水平作紧张负载试验。众所周知 , 这种类型的紧张负载降低了大鼠

胃粘膜的血液流动，诱导局部出血，触发急性炎症，导致溃疡。紧张负载2，4，6小时后，试验动物从水中取出，杀死动物。摘取胃，分离的胃注入10%甲醛以固定。固定后统计线状溃疡长度、溃疡指标以长度总和表示。

在强制水浸之前，立即将试验化合物以静脉给药，对照组大鼠接受0.5ml 生理盐水，试验组大鼠接受0.5ml SOD生理盐水溶液或从合成例2中制备的SOD衍生物（1mg/鼠）。

结果

图14表示溃疡指数（mm/组织）对水浸持续时间作图，在图14中〔○〕表示对照组的数据，（△）表示SOD衍生物组的数据。顺便一提，SOD组的结果省略了，因为它实际上与对照组结果是完全相同的。

从图14很清楚看到，SOD组表明没有抗溃疡作用的迹象，而在SOD衍生物组表明有明显的溃疡抑制作用。

因此，很清楚，对伴随局部组织PH降低的疾病，SOD衍生物是个极好的预防局部出血损伤的抗炎剂。

试验例3

大脑水肿的预防作用

大鼠（体重约200克）右侧大脑半球用液氮处理30秒钟，引起显著的单侧大脑水肿，同一大鼠予以静脉注射如试验例1中所用的 $0.2\mu\text{mol } ^3\text{H}$ 标记Bu-SMA，放射性特异地蓄积在注射一侧，该侧局部PH降低〔图15(2)〕。当同一大脑水肿的大鼠静脉给予 27nmol 如试验例1所用相同的 ^{125}I -标记的SOD衍生物，放射性特异地蓄积在注射一侧〔图15(2)〕，因此很明显，按照合成例2

与 Bu-SMA 偶联的 SOD 衍生物完全蓄积在受损害的大脑组织中。这种 SOD 衍生物的蓄积使水肿显著减少。

试验例 4

氧中毒的预防作用

200mg/kg 百草枯注射到小鼠的腹膜内（体重约 20 克）诱导超氧化物阴离子自由基 $[O_2^-]$ 的形成， $[O_2^-]$ 引起肝细胞的损伤，依次引起血浆 GOT 显著升高。腹腔注射 20mg/kg 上述相同的 SOD 衍生物于百草枯处理的小鼠，对血浆 GOT 水平升高，产生显著的抑制作用（图 16）。

未修饰的 SOD 没有这种保护作用。因此血浆 GOT 水平与对照组没有差别。

而且，毒理学研究已表明，SOD 衍生物是低毒性的。

从以上结果很清楚，SOD 衍生物对各种与超氧化阴离子自由基有关的疾病是有效的，且能用作抗炎剂、局部出血的拮抗剂、抗脑水肿剂、百草枯中毒对抗剂等，以及作为胃溃疡和由于胃肠粘膜炎症引起的其他胃肠疾病的预防剂。

而且，SOD 衍生物作为局部出血心脏病的治疗药，或作为药物，减轻由抗癌药物引起的与超氧化阴离子自由基有关的副作用是有价值的。

SOD 衍生物的剂量随疾病种类、疾病严重程度、病人的耐受性及其他因素而定。但是，对成人通常每日剂量为 0.1—500mg，最好是 0.5—100mg，可以一次给药，也可以分几次给药。

SOD 衍生物可以不同剂型提供，以适合于各个给药途径。

因此，SOD 衍生物能通过已确立的药物学的步骤配方和制备。所以，本发明包括了至少包含一种 SOD 衍生物作为活性成份的各种

药物组合物。这种药物组合物能应用药理学可接受的载体、赋形剂以及在药物生产中普遍使用的其他辅助物质来制造。

当这种药物组合物打算口服时，它们最好以适于消化道能吸收的剂型提供。口服的单一剂型的片剂或胶囊，可含有粘合剂，如糖浆、阿拉伯胶、果胶、山梨醇、黄 胶、聚乙烯吡咯烷酮等，赋形剂如乳糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨醇、甘氨酸等；润滑剂如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇、硅石等，崩解剂如马铃薯淀粉等，药理学可接受的湿润剂如十二烷基硫酸钠等等。片剂可用众所周知的方式包衣。口服的液体制剂可以是水剂或乳剂、溶液、糖浆、酏剂（甘香酒剂）等或可以冰冻干燥，用水或其他合适的赋形剂重新配制。这种液体制剂可含通常的添加剂，包括悬浮剂如山梨醇、糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝胶、氢化食用油和脂肪等；乳化剂如卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯、阿拉伯胶等；非水赋形剂如杏仁油、分馏的椰子油、油脂、丙二醇、乙醇等；防腐剂如对一羟基苯甲酸甲酯、对一羟基苯甲酸丙酯、山梨酸等等。

为制备注射剂，将 S O D 衍生物溶解在适当的溶剂中，如生理盐水、注射用葡萄糖溶液等。S O D 衍生物的浓度按常规方法调至 2 — 20 m g / 每 2 — 10 m l 溶剂，配制后便于皮下肌肉或静脉注射。在制备上述注射剂时，如必要，水溶液中可加入 P H 调节剂、缓冲液、稳定剂、防腐剂、加溶剂等等。

上述药物复合物可根据其剂型及其他因素控制 S O D 衍生物在所选的浓度范围内，通常浓度约 0.01 % 至 50 %（重量），最好是大约 0.1 — 20 %（重量）。

下列实例是对本发明的进一步说明，而决不是对本发明的限制。

参考实例 1

苯乙烯—马来酸酐共聚物的合成

马来酸酐 (383 g, 3.9 mol.) 加入 3.7 L 枯烯 (异丙基苯), 混合物在回流下搅拌, 在超过 40 分钟时间里滴加 16.3 g (60 L.mol.) 二枯基过氧化物溶液以及在 1.7 L 枯烯中溶解的 203 g (1.95 mol.) 苯乙烯。滴完后继续加热, 搅拌 1 小时。所得的反应混合物放置过夜, 除去上清液, 粘附在反应容器上的粘性产物溶于丙酮, 减压蒸去丙酮得到 353 g 苯乙烯—马来酸酐共聚物 (以后简称为 S M A)。

S M A 的分级分离

取 120 g 通过上述方式所得的 S M A 溶于 3 L 丙酮中。滴加 4.9 L 正己烷, 搅拌 1 小时以上。不透明的产物, 丙酮正己烷混合物转入另一容器中, 搅拌 1.5 小时以上, 滴加 9.74 L 正己烷。粘附在容器壁上的粘性物质溶于丙酮来回收, 回收液减压蒸去丙酮, 剩余物在 70℃—80℃ 真空干燥过夜, 获得 49.2 g S M A 分级沉淀物。

取 40 g 上面获得的 S M A, 溶于 1 L 丙酮, 加入 3.8 kg 表面用硅烷处理的玻璃珠 (平均颗粒大小 0.1 mm), 丙酮蒸发后玻璃珠表面涂有 S M A。

涂有 S M A 玻璃珠连同 1.4 L, 丙酮正己烷混合物 (25℃ 体积比为 24 : 76) 一起装填入长 80 cm、内径 80 mm 的柱子内和保持柱体系温度 25℃。两个不同体积比例的丙酮—正己烷混合物, 即 (1) 1.6 L 丙酮正己烷混合物, 25℃ 时体积比为 24 : 76。 (11) 6.0 L 丙酮正己烷混合物 25℃ 时体积比 37 : 63; 依次

从顶部滴加入柱体系中，接着再滴加 3.0 L 丙酮，收集相当于上述 37:63 (体积计) 丙酮正己烷混合物洗脱部分。减压除去低沸点部分。剩余物在 70—80℃ 下真空干燥过夜。从而获得所要的 SMA 产量 31.8 g。它的重均分子量 $\bar{M}_w$ 和数均分子量 ($\bar{M}_n$) 用凝胶透析层检测定 (以下简称 GPC)，四氢呋喃洗脱，聚苯乙烯为标准。结果为 $\bar{M}_w$ 1340， $\bar{M}_n$ 1220 ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1.10$)。 $\bar{M}_n$ 用蒸汽压渗透压力计测定为 1210。用电位滴定测定分级的 SMA—马来酸酐的含量为 47.3% (摩尔)。

分级的 SMA 的部分半丁酯化作用

装有磁力搅拌约 40 ml 安瓿中装入 10.0 g 经上述分级的 SMA，2.20 g 正丁醇，0.10 g 无水乙酸锂以及 20 ml 二噁烷，封口。安瓿的内容物在 90℃ 加热搅拌 20 小时。取出小量反应混合物，用气相色谱分析，乙基溶纤剂为内标，测定未反应的正丁醇。共聚物中马来酸酐半丁酯化程度，以加入的正丁醇的转化来计算，测得为 62%。然后反应混合物用 20 ml 二噁烷稀释，稀释液滴加 400 ml 正己烷使之再沉淀，收集沉淀，并在 60℃ 真空干燥过夜，获得 11.5 g 所要的部分半丁酯化的苯乙烯—马来酸酐共聚物 (Bu—SMA)。在这共聚物中剩余马来酸酐环的含量基于红外吸收光谱在 1780 cm^{-1} 和 700 cm^{-1} 波数吸收强度来测定 (傅里叶变换红外光谱 (FT—IR)，KBr 压片法)，发现为 30.3% (摩尔)，(平均每分子 Bu—SMA 的马来酸酐环数为 1.8)。用 GPC 测定 $\bar{M}_w$ 和 $\bar{M}_n$ ，分别为 1530 和 1440 ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1.06$)。

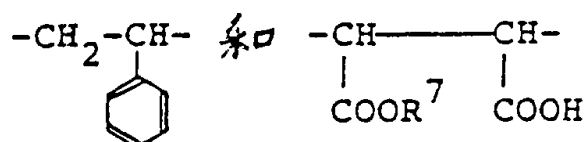
合成例 1

10 ml 0.1 M 碳酸氢钠 (PH 8.0) 水溶液, 在 37°C 搅拌下溶解 50 mg (1.5×10^{-6} M.) 人红血球 SOD (3000 单位/mg), 再加入 80 mg (5 mM, 这浓度是反应混合物中最终 Bu-SMA 的浓度, 在下文中应用也相同) 部分半丁酯化的苯乙烯-马来酸酐共聚物固体粉末 [$\bar{M}_w = 1600$; 酯化程度 = 60% (摩尔); 马来酸酐环含量 = 25% (摩尔) (平均每分子马来酸酐环数目是 1.6)] , 苯乙烯-马来酸酐共聚物分子通过部分半丁酯化作用得到 [用二枯基过氧化物作为起始物自由基聚合作用的产物; 在产物中苯乙烯-马来酸酐摩尔比 = 1:1; $\bar{M}_w = 1280$; 分子量的分布: $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ 不大于 1.20], 反应进行 1 小时。

在人红血球 SOD 氨基与 Bu-SMA 反应过程中, 剩余氨基的含量用三硝基苯磺酸钠 (TNBS) 测定, 在这个实例中所用人红血球 SOD 的品种, 每个分子含有 22 个氨基, 约 10—11 氨基能用 TNBS 法测定, 这证实在上述反应条件下, 人红血球 SOD 氨基的 20% (摩尔) (相当于可滴定氨基的 44% (摩尔)) 已与 Bu-SMA 发生反应。过滤反应混合物, 滤液注入 K50/30 柱 (商标, 瑞典 Pharmacia 精细化学公司产品), 柱中装填交联葡聚糖 (Sephadex) G-100 (商标, 瑞典 Pharmacia 精细化学公司产品) 进行凝胶过滤。用 20 mM 碳酸氢铵和碳酸铵混合液洗脱, 洗脱部分在 280 nm 测量, 收集有吸收部分。用超滤膜进行浓缩 (Sartorius SM145-39), 冻干后得 52 mg 白色粉末。所得粉末的紫外吸收光谱 [图 2 中 SOD 衍生物 (I)], 起始材料 SOD 及 Bu-SMA 的紫外吸收光谱在 PH 7.4 磷酸缓冲液中测

量。光谱见图 2 所示。用同一方式制备的 $5 \mu\text{l } ^{51}\text{Cr}$ - 标记的样品 (反应产物) 在两性电解质 (Ampholine) 中进行等电聚焦 (PH $1.5 - 6.0$, 700 mV , 通电 12 小时; 分部收集 1 ml / 份)。随后测量 PH 和放射性, 所得的结果见图 8 所示。获得的粉末等电点为 2.0 , 白色粉末的蛋白质含量用 Lowry 法测定为 80% 。基于这些结果, 测定了每个 SOD 分子中 Bu-SMA 分子数目。

以上面的数据为基础, 所得的白色粉末鉴定为 SOD 衍生物, 每个 SOD 分子平均结合 5 分子 Bu-SMA (用 SOD 的氨基与 Bu-SMA 一个马来酸酐环反应), (



摩尔比 = $1:1$; 丁酯化程度 = 60% ; $\bar{M}_w = 1600$)。

合成例 2

$10 \text{ ml } 0.1 \text{ M}$ 碳酸氢钠 (PH 8.0) 水溶液在 30°C 搅拌下溶解 50 mg 人红血球 SOD (3000 单位 / mg)。再加入 30 mg (1.9 mM) 合成例 1 中所用的 Bu-SMA, Bu-SMA 与人红血球 SOD 用合成例 1 相同方式进行反应。反应混合物同合成例 1 同样方式作处理, 获得 45 mg 白色粉末。用合成例 1 同样的方式测量的紫外吸收光谱如图 2 所示 [SOD 衍生物 (II)]。等电聚焦后 PH 及放射性测量的结果见图 9 所示。所得的粉末等电点为 4.4 。用 TNBS 法分析剩余氨基酸的含量, 证实在起始材料 SOD 中氨基的 9% (摩尔) (相应于可滴定氨基约 20% (摩尔)) 已与 Bu-SMA 反应。

根据以上数据, 所得的白色粉末鉴定为 SOD 衍生物, 每个 SOD

分子平均与 2 分子 Bu-SMA 结合。

合成例 3

5 mg ($1.5 \times 10^{-7} M$) 人红血球 SOD (3000 单位/mg) 溶于 1 ml 0.1 M 碳酸氢钠水溶液中 (PH 8.0) 加入 4 mg (2.5 mM) 与合成例 1 同样的 Bu-SMA, 以同那方式在 37°C 下进行反应。SOD 中氨基含量和反应时间的关系见图 1 所示。氨基的分析采用 TNBS 方法。在所用的人红血球 SOD 中, 每个分子含有 22 个氨基, 其中约 10—11 可用 TNBS 法分析。这证实在上述反应条件下, 在 1 小时内, 38% (摩尔) 可滴定氨基已与 Bu-SMA 发生反应, 可获得每个 SOD 分子结合 4 个 Bu-SMA 分子的 SOD 衍生物。反应 2 小时后, 反应混合物中再加入相同量的 Bu-SMA, 在这种情况下氨基含量如图 1 (---•---) 所表明的进一步减少。这清楚地表明 Bu-SMA 结合于 SOD 分子的量可通过反应中加入不同量的 Bu-SMA 来控制。

合成例 4

10 mg ($3.0 \times 10^{-7} M$) 人红血球 SOD (3000 单位/mg) 溶于 1 ml 0.1 M 碳酸氢钠水溶液 (PH 8.0) 中, 加入一份部分水解的或部分半酯化的苯乙烯—马来酸酐共聚物, 按表 1 所列使最终浓度为 2.5 mM (在反应混合物中)。反应在 37°C 下进行 1 小时。SOD 中剩余氨基的含量用 TNBS 法测定。在每种情况下证实, 氨基的损失相当于 15—25% (摩尔) 可滴定氨基。在每种情况下, 获得了每个 SOD 分子平均结合 1.7—2.8 个苯乙烯—马来酸酐共聚物分子的 SOD 衍生物。

表 1

编 号	酯化反应 (是或否) 及种类	酯化程度 (%(摩尔))	马来酸酐环 的含量(环 数/分子)	$\bar{M}_w$
4-1	是(丁酯)	60	1.3	1200
4-2	是(丁酯)	40	2.0	1600
4-3	是(丁酯)	70	1.5	1600
4-4	是(丁酯)	60	1.9	2000
4-5	是(甲酯)	60	1.3	1600
4-6	是(乙酯)	60	1.7	1600
4-7	是(甲氧乙酯)	60	1.3	1600
4-8	是(2-丙氧乙酯)	60	1.7	1600
4-9	是(1,3-二甲氧- 2-丙酯)	60	1.4	1600
4-10	是(1,3-二丁氧- 2-丙酯)	60	1.3	1600
4-11	否	—	2.3	1400

合成例 5

除部分水解的异丁烯-马来酸酐共聚物($\bar{M}_w = 2500$, 马来酸酐环含量 = 3.0 环/分子)代替合成例 4 中所用的苯乙烯-马来酸酐共聚物外, 反应和分离步骤以与合成例 4 相同方式进行, 获得具有每个 SOD 分子与大约 4 个异丁烯-马来酸酐共聚物结合的 SOD 衍生物。

合成例 6

除用表 2 中所用的共聚物之一代替合成例 4 中苯乙烯—马来酸酐共聚物外，反应与分离步骤以与合成例 4 完全相同的方式进行。这样获得相应的 S O D 衍生物。

表 2

编号	共聚物种类	酯化作用 (是或否) 及种类	酯化程度 (%(摩尔))	$\bar{M}_w$
6-1	对—氯苯乙烯—马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	1800
6-2	对—溴苯乙烯—马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	1900
6-3	α —甲基苯乙烯—马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	1800
6-4	乙烯—马来酸酐共聚物	非	—	2500
6-5	乙烯—马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	3000
6-6	丙烯—马来酸酐共聚物	非	—	2000
6-7	丙烯—马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2500
6-8	异丁烯—马来酸酐共聚物	是(乙酯)	60	2800

表 2 (续)

编号	共聚物种类	酯化作用 (是或否) 及种类	酯化程度 (%(摩尔))	$\bar{M}_w$
6-9	异丁烯-马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	3000
6-10	α -丁烯-马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2800
6-11	1-戊烯-马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2800
6-12	2-甲基-1-丁烯-马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2500
6-13	1-己烯-马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2500
6-14	1-庚烯-马来酸酐共聚物	非	—	2000
6-15	1-庚烯-马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2000
6-16	醋酸乙烯酯-马来酸酐共聚物	非	—	2500
6-17	同上	是(丁酯)	60	2500
6-18	丙烯酸甲酯-马来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2500

表 2 (续)

编号	共聚物种类	酯化作用 (是或否) 及种类	酯化程度 (%(摩尔))	$\bar{M}_w$
6-19	丙烯酸乙酯-马来 酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2600
6-20	异丁烯酸甲酯-马 来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2000
6-21	异丁烯酸乙酯-马 来酸酐共聚物	是(丁酯)	60	2200

(每个共聚物中马来酸酐环含量为 1.5 环/分子)

合成例 7

按规定量(表 3)人红血球 S O D (Sigma 制造)溶于 0.1M 碳酸氢钠水溶液(PH 8.0)使之浓度为 5 mg/ml, 加入规定量的部分水解的苯乙烯-马来酸酐共聚物(分子量约 1400; 马来酸酐环含量约 1.0 环/分子); 部分水解的对-溴苯乙烯-马来酸酐共聚物(分子量约 1600; 马来酸酐环含量约 1.5 环/分子), 部分水解的 α -甲基苯乙烯-马来酸酐共聚物(分子量约 1600; 马来酸酐环含量约 3.3 环/分子)或部分水解的异丁烯-马来酸酐共聚物(分子量 2500; 马来酸酐环含量约 3.5 环/分子)在 25℃ 下反应进行 1 小时, 反应混合物注入装有 Sephadex G-75 超细颗粒(商标, Pharmacia 精细化学公司制造)的 K 26/40 (商标; 同上公司制造)中进行凝胶过滤, 用 10 mM 碳酸氢铵和碳

酸铵混合溶液洗脱。洗脱液在 280 nm 和 254 nm 测量，收集与未处理的共聚物吸收不同的部份，冰冻干燥，得到白色粉末状 SOD 衍生物。所获的结果列于表 3。在 SOD 中反应的氨基，用 TNBS 法测定。在所用的人红血球 SOD 品种中每分子含 22 个氨基，其中约 10—11 氨基可用 TNBS 方法滴定。

表 3

编号	SOD (mg)	部分水解 的共聚物 (mg)	SOD 中已反应 氨基的近似数目	SOD 衍生物 产量 (mg)
7-1	19	苯乙烯—马来酸酐 共聚物 15	3	15
7-2	19	对—溴苯乙烯—马 来酸酐共聚物 16	3	18
7-3	18	α —甲基苯乙烯— 马来酸酐共聚物 11	3	17
7-4	17	异丁烯—马来酸酐 共聚物 9	2	10

人红血球 SOD 和牛红血球 SOD 的红外吸收光谱 (FT-IR, KBr 片法) 分别见图 4(1)和图 4(2)所示。表 3 所列 SOD 衍生物编

号 7-1, 编号 7-2 和编号 7-3 的红外吸收光谱 (FT-IR, KBr 片法) 分别见图 5, 图 6 和图 7 所示。

图 5-7 图中, 除人红血球 SOD 的吸收光谱外亦能观察到共聚物的吸收 (箭头所指)。在这些图中的吸收光谱表明每个共聚物是与 SOD 结合的。

用牛红血球 SOD 代替人红血球 SOD 进行与上同样的反应及分离步骤, 以产生相应的 SOD 衍生物, 每个都有类似于图 5-7 中所示的红外吸收光谱。

试验例 5

人红血球 SOD (5 mg/ml) 与各种浓度 (0.14, 0.37, 0.75, 1.5, 3.6 及 12 mM) Bu-SMA, 在 37℃, PH 8.0 时反应 1 小时。用这种方法制备了 Bu-SMA 与 SOD 不同结合量的各种 SOD 衍生物。研究了 SOD 衍生物 Bu-SMA 的结合量和酶活力之间的关系。酶活力的测量按 Journal of Biological Chemistry, 244, 6049-6055 (1965) 所述方法进行。在反应混合物中, Bu-SMA 浓度和所得的 SOD 衍生物中剩余氨基含量间的关系 (用 TNBS 法测定), 以及 Bu-SMA 浓度和酶活力的关系见图 3 中所示。图 3 中数据表明当 Bu-SMA 浓度是 6 mM 时, 所得的 SOD 衍生物中约 50% TNBS 可滴定的氨基保持完整 (如上所述, 这意味着, 存在于起始材料 SOD 每个分子中的 22 个氨基, 大约有 10-11 个氨基与 TNBS 反应, 在这种情况下有 5 个氨基参与了反应、有 17 个氨基保持未反应), 保持了原先酶活力的 50%, 而且当 Bu-SMA 结合量增大时, 酶活力就低于原先的 50%。因此, SOD 用共聚物过分地化学修饰对保持酶活

力是不合适的，而限制共聚物分子与每个 S O D 分子结合数在 6 或以下是必需的。如图 3 所示，每个 S O D 分子结合 2 个 B u - S M A 分子的 S O D 衍生物，保持了 S O D 原始酶活力的 80 %。

在合成例 2 中所得的 S O D 衍生物与起始材料 S O D 比较其对蛋白酶的敏感性。反应在 37 °C P H 7 . 4 下进行。浓度为 15 单位 / m l (5 μ g / m l) 的 S O D 衍生物和 S O D ，与各 0 . 1 m g / m l 胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶（糜蛋白酶）或木瓜蛋白酶反应，所得的结果见图 11 所示。在木瓜蛋白酶作用下两者酶活力都减少，但对其他种蛋白酶作用是比较稳定的，没有明显的失活。因此可以得出结论：S O D 用共聚物修饰，不改变 S O D 酶的稳定性。

试验例 6

在合成例 2 中所得的 S O D 衍生物及开始材料 S O D 进行牛血清白蛋白—琼脂糖凝胶柱亲和层析，见图 10 所示。起始 S O D 不与白蛋白结合，全部通过亲和柱。而 S O D 衍生物 95 % 以上与白蛋白柱结合，柱用 0 . 1 % 十二烷基硫酸钠（S D S）处理，使相当一部分的 S O D 衍生物洗脱。但在这种条件下，约 30 % S O D 衍生物仍然保持与柱结合。柱子相继用盐酸胍作变性处理，导致 S O D 衍生物完全洗脱。当 S D S 浓度为 0 . 5 % 时，S O D 衍生物几乎全部从白蛋白柱上洗脱下来。这些事实指出，用 B u - S M A 结合于 S O D 的 S O D 衍生物不象开始材料 S O D ，对白蛋白有强的亲合性。

在合成例 2 中所得的 S O D 衍生物或起始材料 S O D 静脉注射给予大鼠。血浆中 S O D 衍生物的浓度和 S O D 的浓度变化作了跟踪，所得结果见图 12 所示。从图 12 很清楚看到，S O D 衍生物在血浆的浓度在很长时期中保持高水平（半寿期 = 6 小时），而起始材料

SOD的血浆浓度在很短时期中就降低(半寿期=5分钟)。这可能是由于SOD衍生物与血浆白蛋白牢固结合,由于Bu-SMA存在。

合成例4、5和6所得的SOD衍生物,按上述同样方式,也进行牛血清白蛋白-琼脂糖凝胶柱亲和层析。对每个SOD衍生物,至少有90%与白蛋白相结合,从那里洗脱下来需要用十二烷基硫酸钠(SDS)处理。这表明每个SOD衍生物是牢固的与白蛋白结合的。这种结合恐怕是由于与SOD偶联的共聚物中存在一个疏水基和羧基。

除用牛红血球SOD代替合成例2中得到的人红血球SOD外,以合成例2的反应与分离步骤相同的方式作了重复。这样得到了SOD衍生物,每个牛红血球SOD分子结合2个Bu-SMA分子。用这个SOD衍生物也获得了与上述试验相同的结果。因而人红血球SOD和牛红血球SOD之间没有观察到有差别。

试验例7

在合成例2中得到的SOD衍生物与大鼠血清混合,混合物进行凝胶过滤(Sephacryl S-200; Sprague-Dawley 大鼠血清0.2ml;样品0.2mg)。观察到了SOD衍生物以血清蛋白结合(主要白蛋白结合)的形式的洗脱。另一方面,起始材料SOD和大鼠血清混合物以上述同样方式进行凝胶过滤。SOD不与血清蛋白相互作用,但相应于它原先分子量(大约33000)的部分被洗脱。

在进一步的试验中,上述SOD衍生物与白蛋白缺乏症大鼠血清混合。混合物与上述同样方式进行凝胶过滤,相当一部分SOD衍生物以血清蛋白结合形式(于非白蛋白部分)被洗脱下来。因此,可以考虑,当血浆白蛋白浓度低时、SOD衍生物表现出与血清蛋白中另外种蛋白结合的形式。这就表明,SOD衍生物能有效地治疗血清白

蛋白浓度降低的疾病。

试验例 8

将按照合成例 2 制备的 ^{51}Cr —标记的 S O D 衍生物。合成例 2 所用的相应于 B u—S M A 的 ^3H 标记 B u—S M A 以及 S O D，分别静脉注射给予大鼠（体重约 200 g），剂量 200,000 cpm / 大鼠。1 小时后测量各种器官中放射性的水平，结果如表 4 所列。很明显，S O D 衍生物由尿排泄显著地被抑制了，S O D 衍生物于血浆的半寿期延长了，S O D 衍生物以高浓度在器官中分布。

表 4
放射性 S O D 在组织中的分布

器 官	c p m / 器官		
	S O D	S O D 衍生物	B u—S M A
血液 (c p m / m l)	47	4400	7045
脑	27	262	230
肺	190	849	454
心	127	262	383
肝	261	11667	832
肾	16200	33720	434
尿	89725	67	248
脾	80	496	385
胃	120	271	363
小肠 (c p m / 2 g)	160	1300	159
肌肉 (50 g)	3250	11778	11900

从上面各种试验结果明显看出，S O D衍生物有接近于S O D的酶活力，与S O D比，有明显地延长在血浆的半寿期，而且由于S O D衍生物经受与血清蛋白的可逆相互作用，这种性质对S O D易位到作用的器官和部位是十分有助的、大家公认在炎症和局部出血损伤处P H是低的，质子化羧基化合物有选择性地蓄积在这种区域。由于S O D衍生物含有羧基，可以预料这些羧基在体内被质子化，从而有效地蓄积在炎症和局部出血损伤的部位。因此，S O D衍生物作为预防和治疗药，对溃疡和其他肌肉炎症有关的疾病及对出血症起到极好的作用。

含有合成例2所得到的S O D衍生物的某些剂型实例，以及按本发明的S O D衍生物作为活性成分的一个典型实例如下所示。

剂型例1

以下列成份用常规的方法制备肠衣胶囊：

合成例2所得的S O D衍生物	20mg
乳糖	46mg
玉米淀粉	16mg
结晶纤维素	12mg
纤维素羟乙酸酯	5mg
山梨醇	10mg

总计（每胶囊）

109mg

以上胶囊的服法：通常成人每日三次，每次二丸，饭后服用。

剂型例 2

用下列成份按常规方法制备肠衣片：

合成例 2 中所得的 S O D 衍生物	20mg
乳糖	79mg
玉米淀粉	45.5mg
硬脂酸镁	0.5mg
总计 (每片)	145mg

以上片剂服法，通常成人每天服三次，每次二片，饭后服用。

剂型例 3

用下列方式制备注射剂：10mg 合成例 2 中所得的 S O D 衍生物溶于生理盐水，制成体积为 5ml 的溶液，通过灭菌的微孔滤器过滤，滤液在无菌的红棕色玻璃瓶 (1 型，3ml) 中封住。

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说明书	1	13	仅4-6	仅约4-6
	3	11	有平均	有重均
		16	其平均	其重均
	6	15	pH低时，	pH低于 7时，
		17	在 3 · -5℃	在约 3 · -50℃
	8	6-7	衍生物…是所希望的。	衍生物是所希望的有效成分化合物时，
		14	为适宜。	为适宜，
	9	4	Academg	Academy
		5	Biochemishy	Biochemistry
		6	最附合	最符合
		21	1,3-二氧基-	1,3-二乙氧基-
	11	11	(14n mol)，	(14 nmol)，
	14	5	黄 胶、	黄著胶、
		11	山梨醇、糖浆、	山梨醇糖浆、甲基纤维素、糖浆、
	15	20	连同1.4L，丙醇	连同1.4L丙酮
	17	16	(相当于	(约相当于
	18	13	在30℃	在37℃
		21	的9%	的约9%
	19	10	结合 4个	结合约 4个
	20	12	是(2-丙氧	是(2-丁氧
	25	11	3.6及	3,6 及
	27	8	中得到	中所用
权利要求书		21	相当	相当大的
	2	7	有平均	有重均
	3	12	有平均	有重均
		15	其平均	其重均
	4	12	,其中多聚	,其中共聚
	6	8	含1-6 个	含1-4 个
	7	1	有平均	有重均
		9	,含1-5 个	,含1-6 个
	8	9	有平均	有重均
	9	13	有平均	有重均

图 1

SOD中TNBS可
滴定氨基减少的百
分数

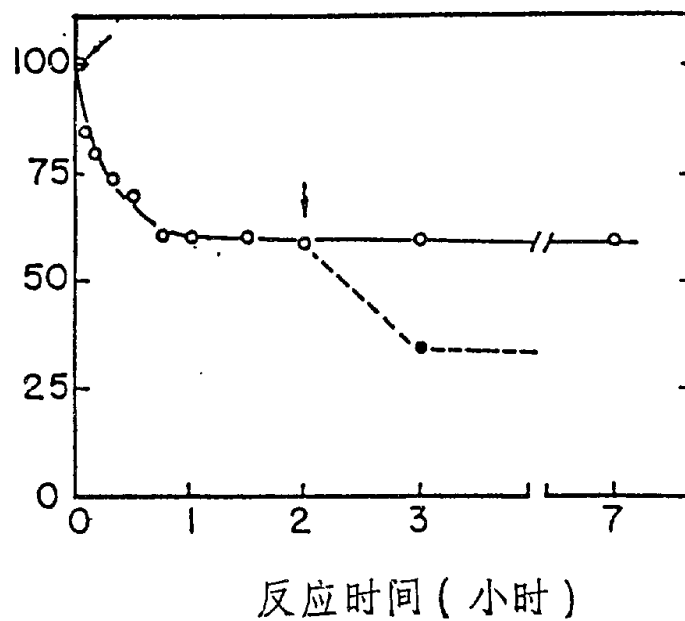


图 2

吸收度

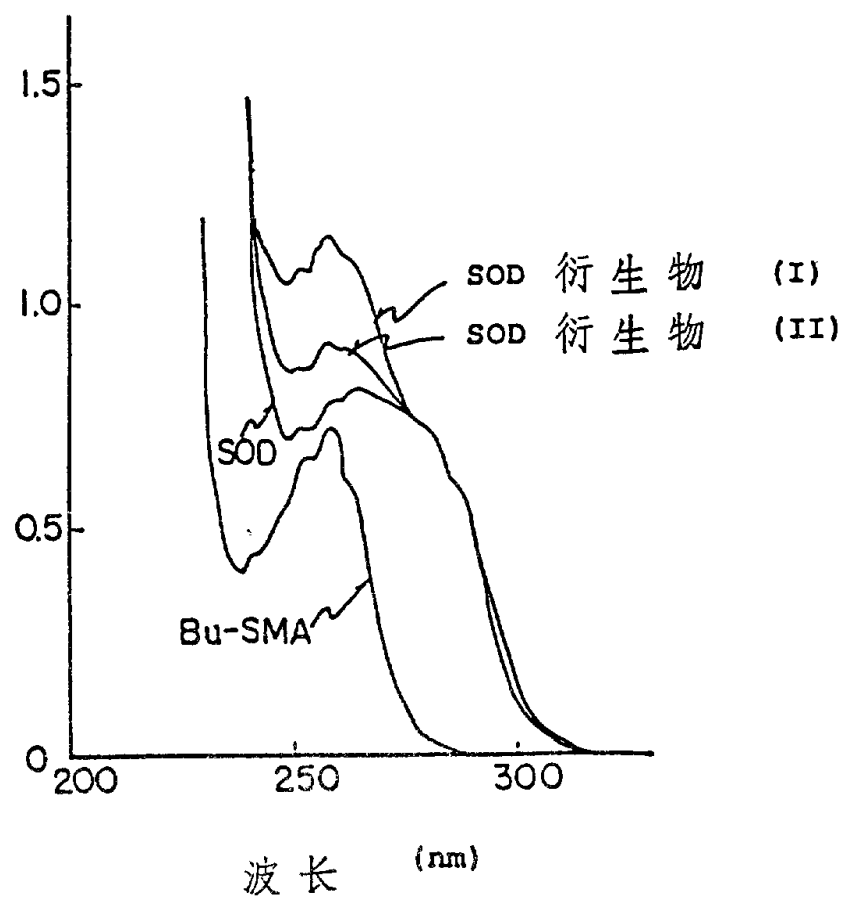


图 3

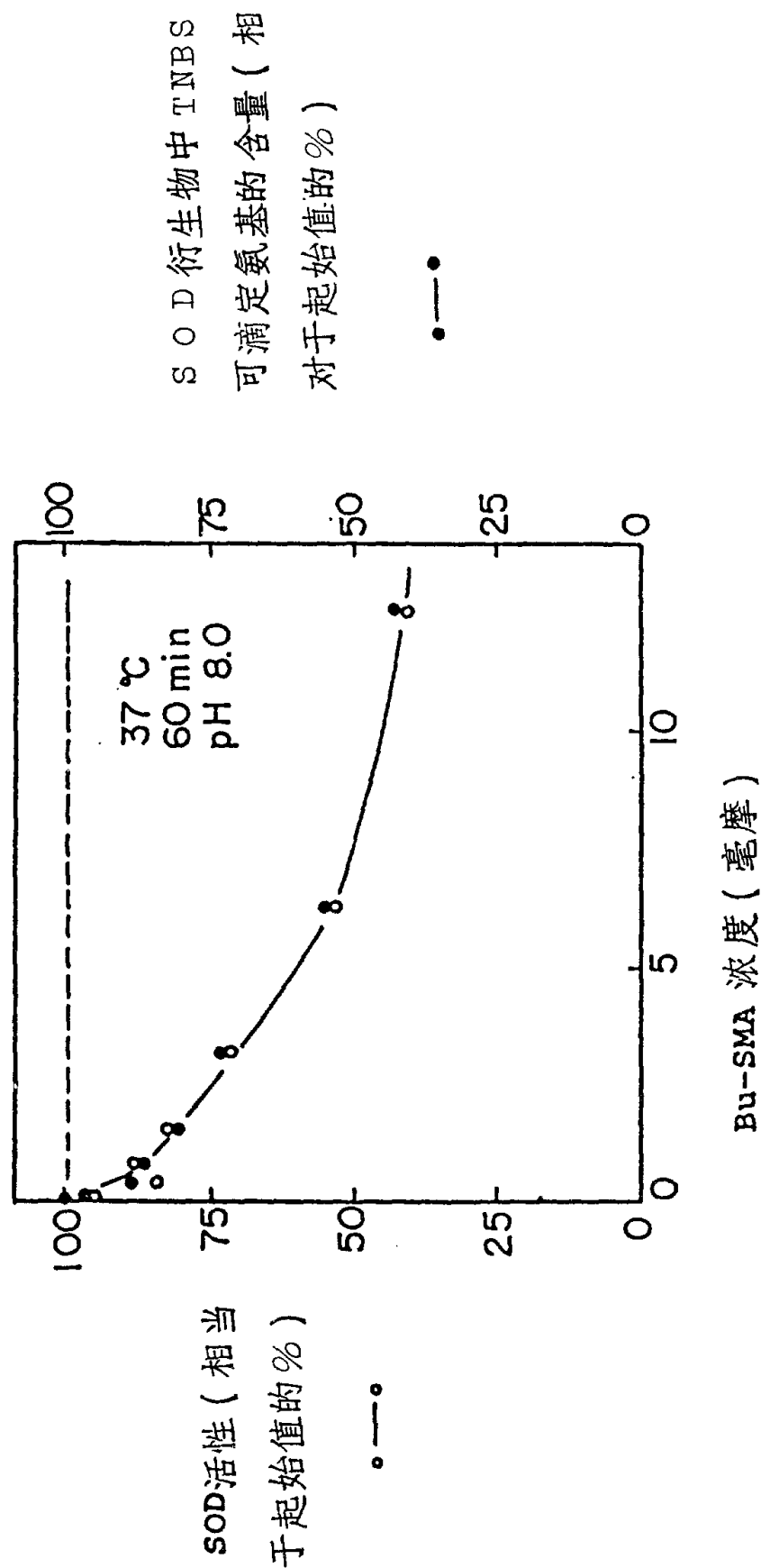


图 4(1)

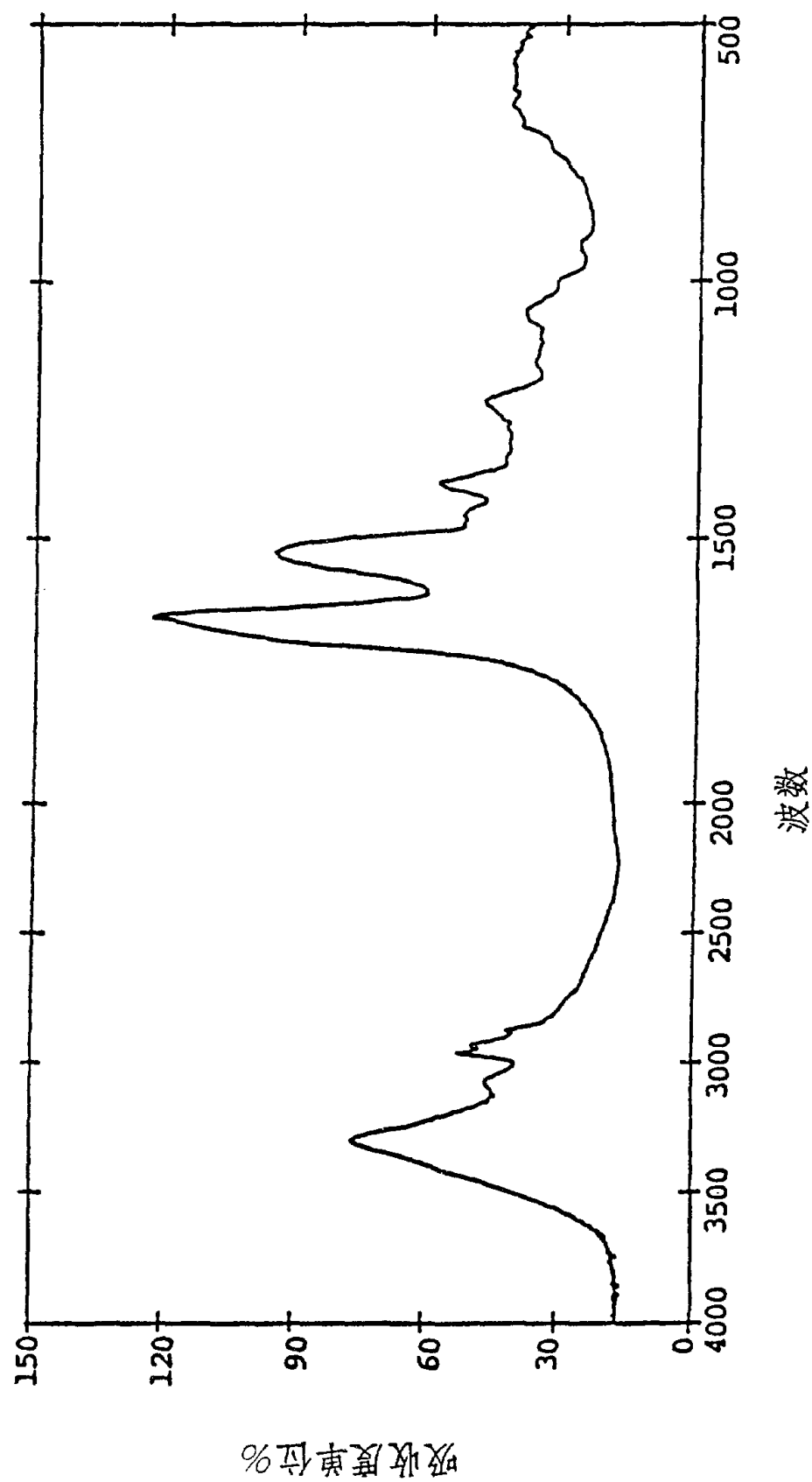


图 4(2)

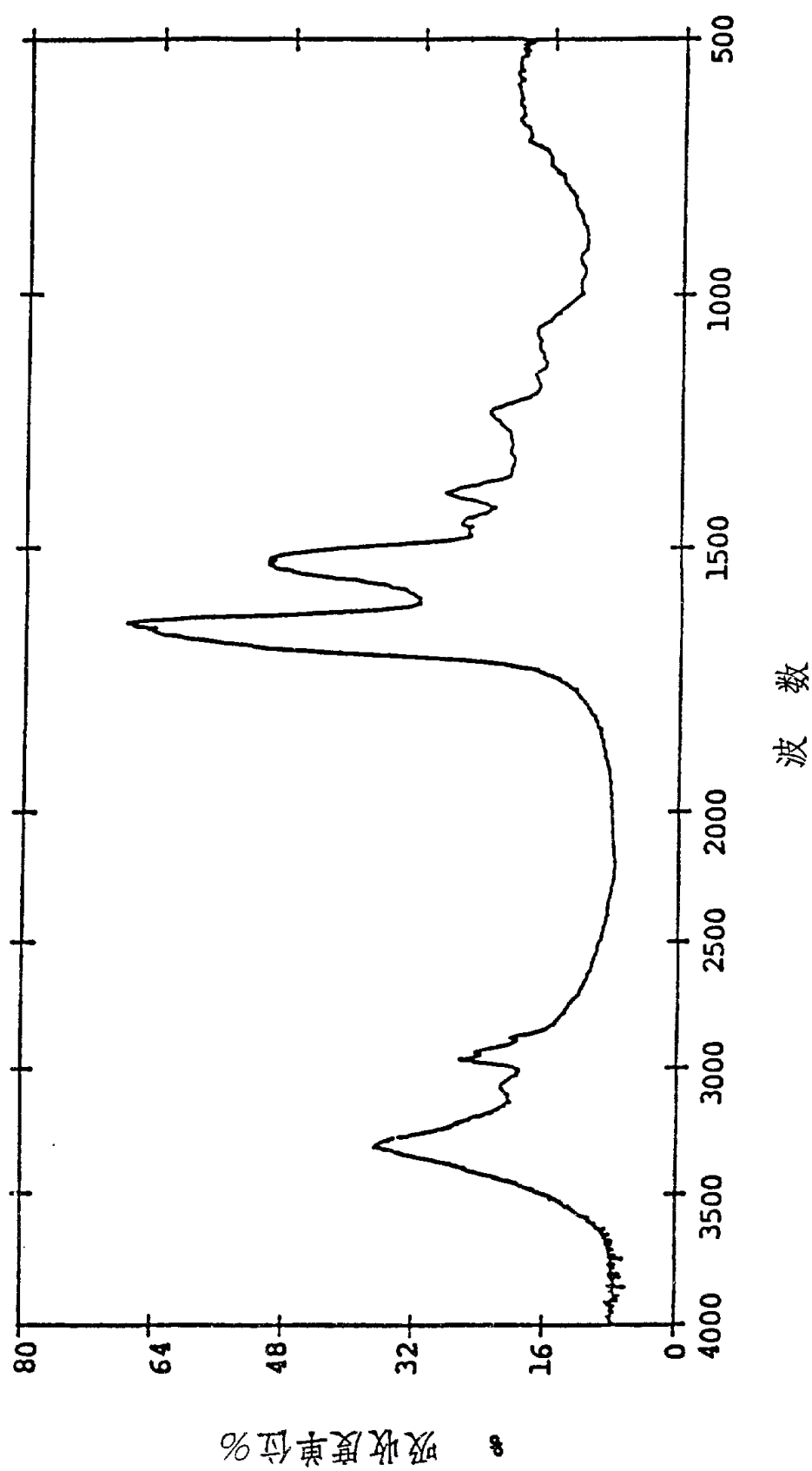


图 5

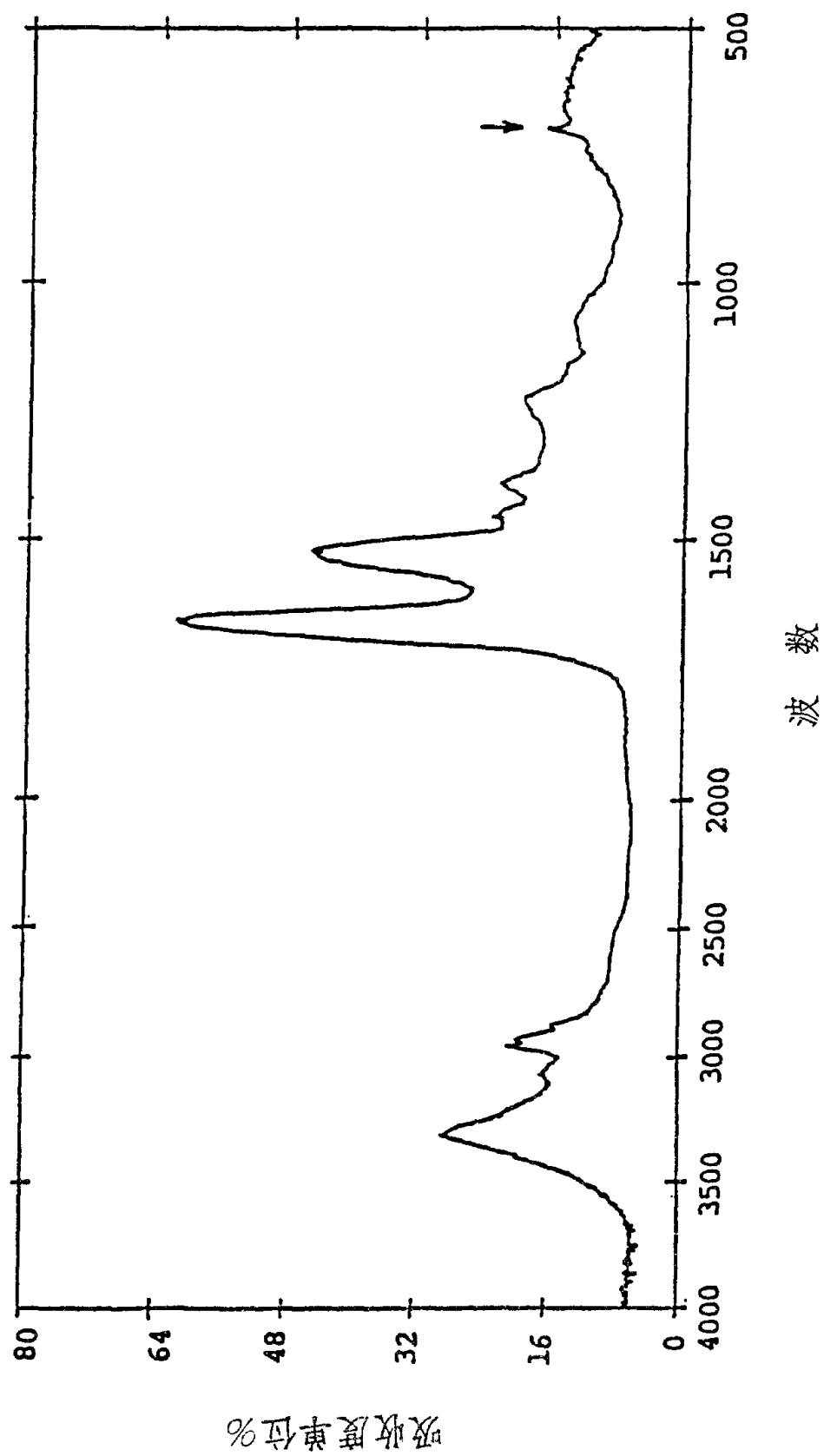


图 6

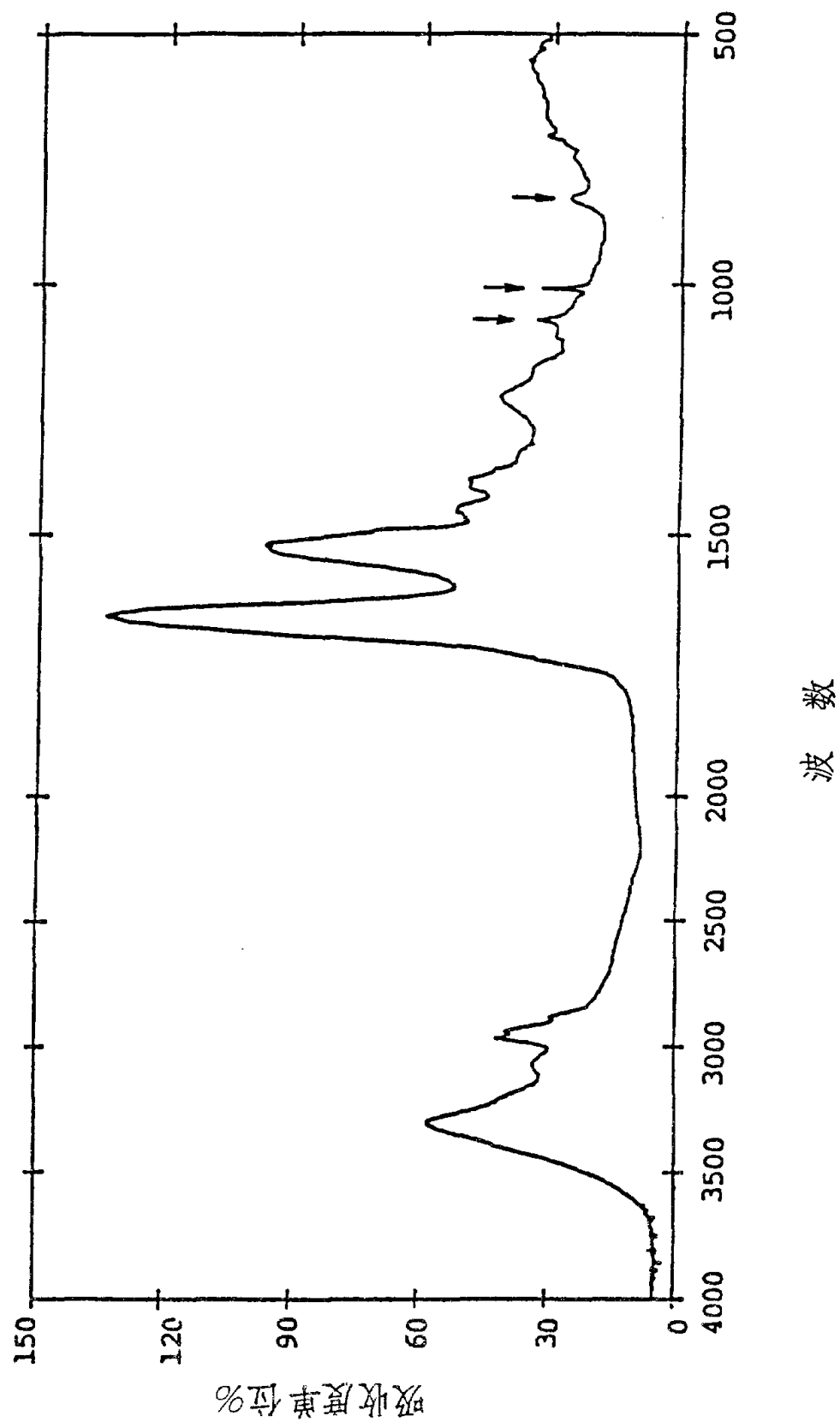
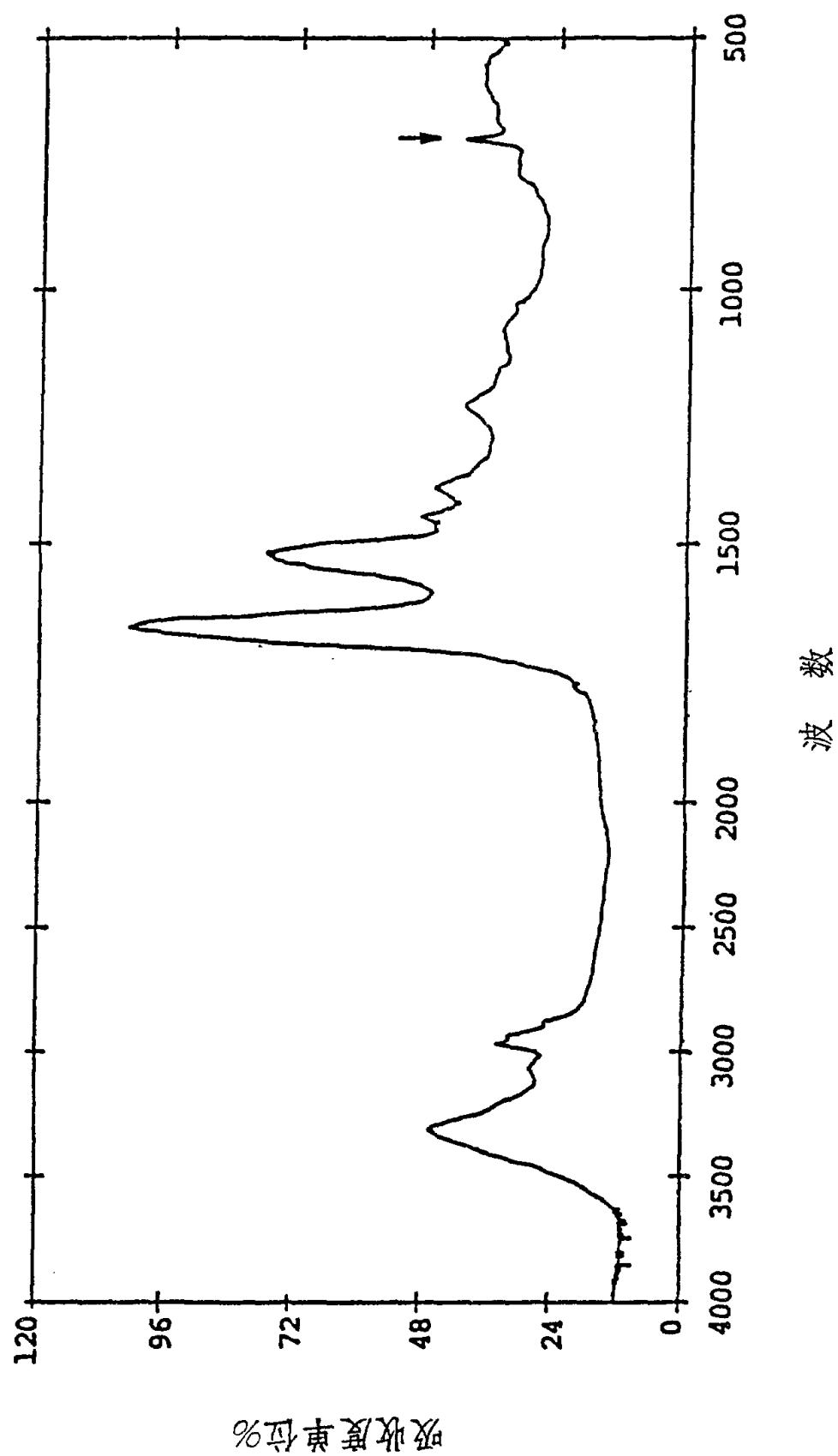


图 7



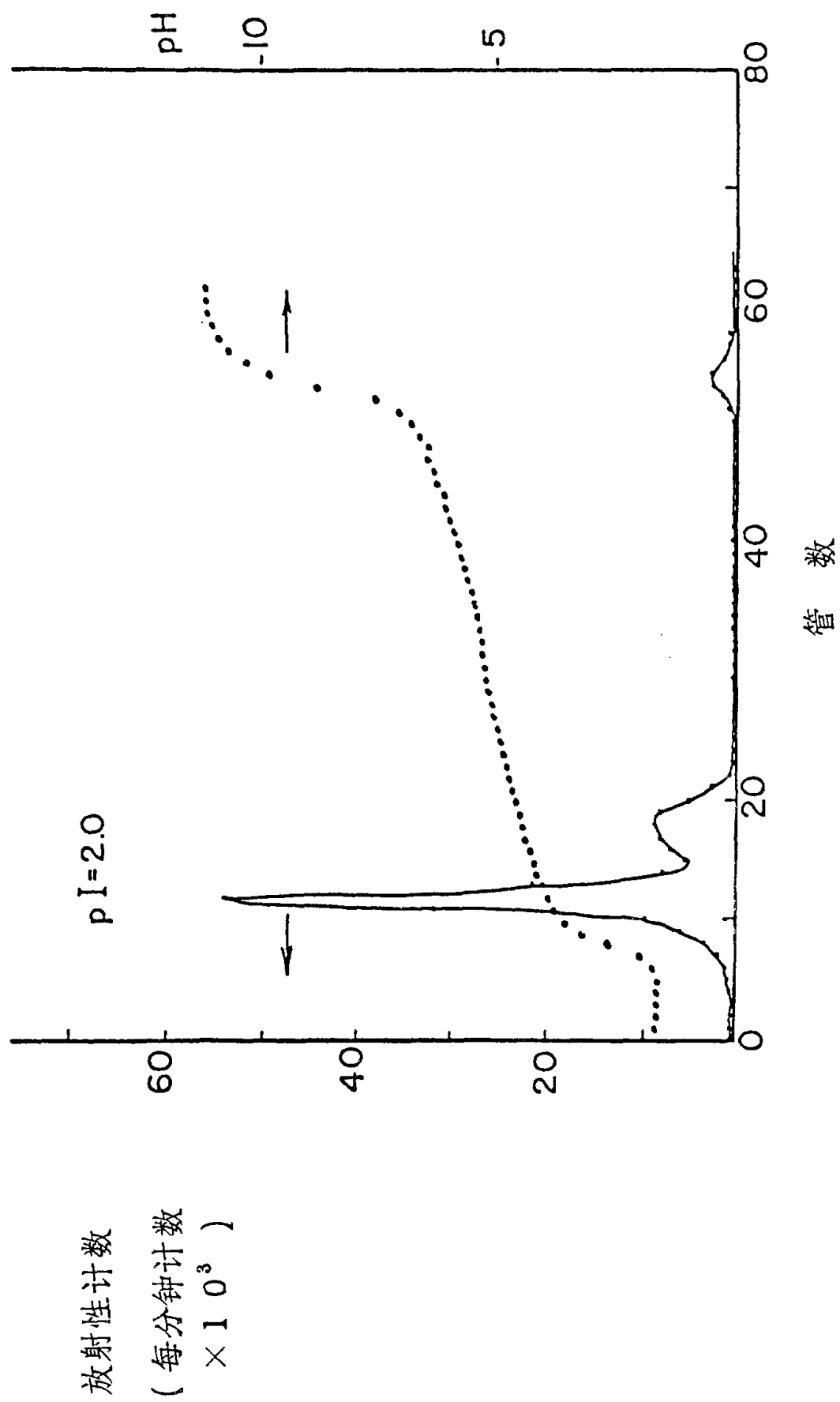


图 8

图 9

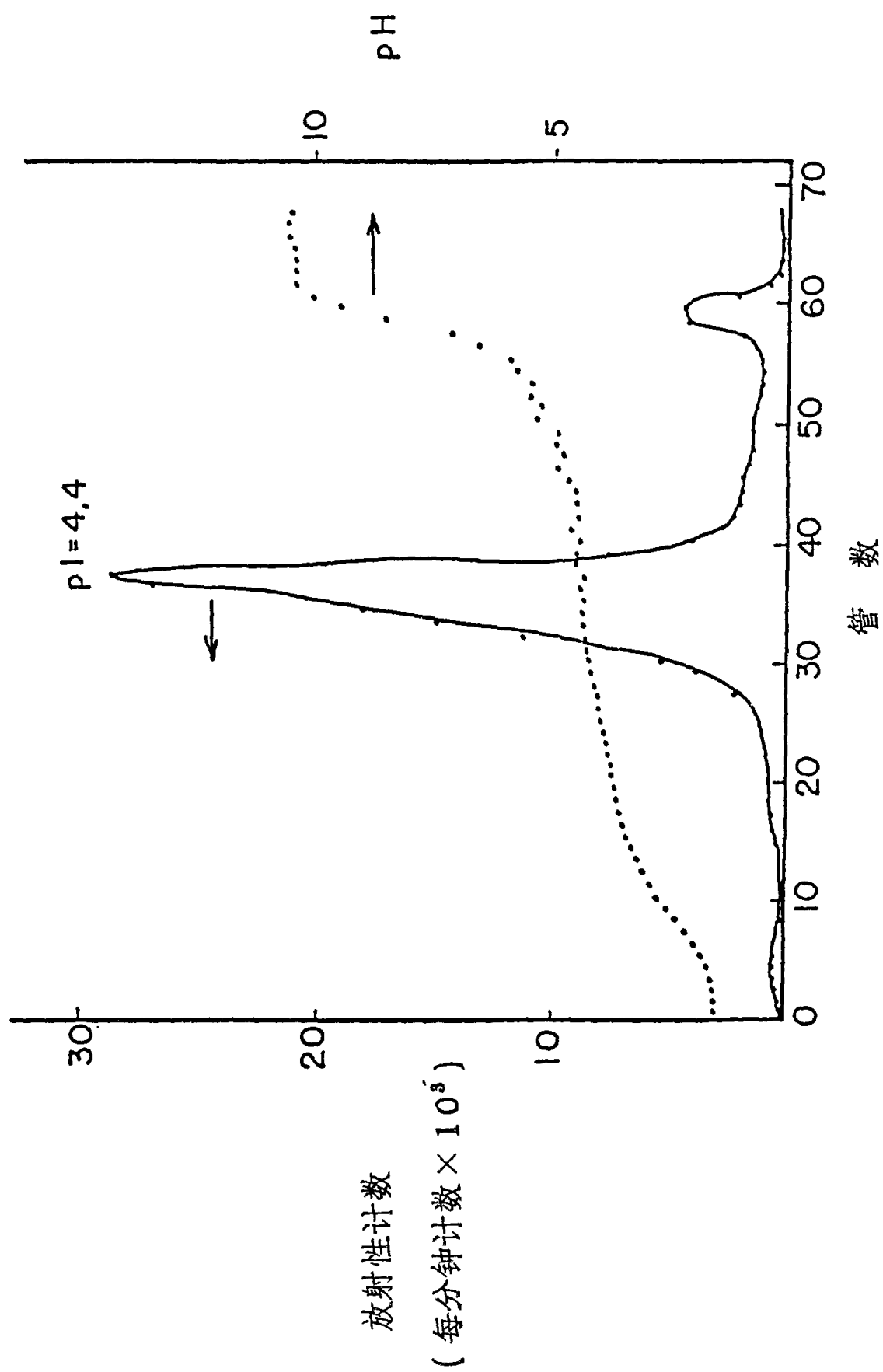


图 10

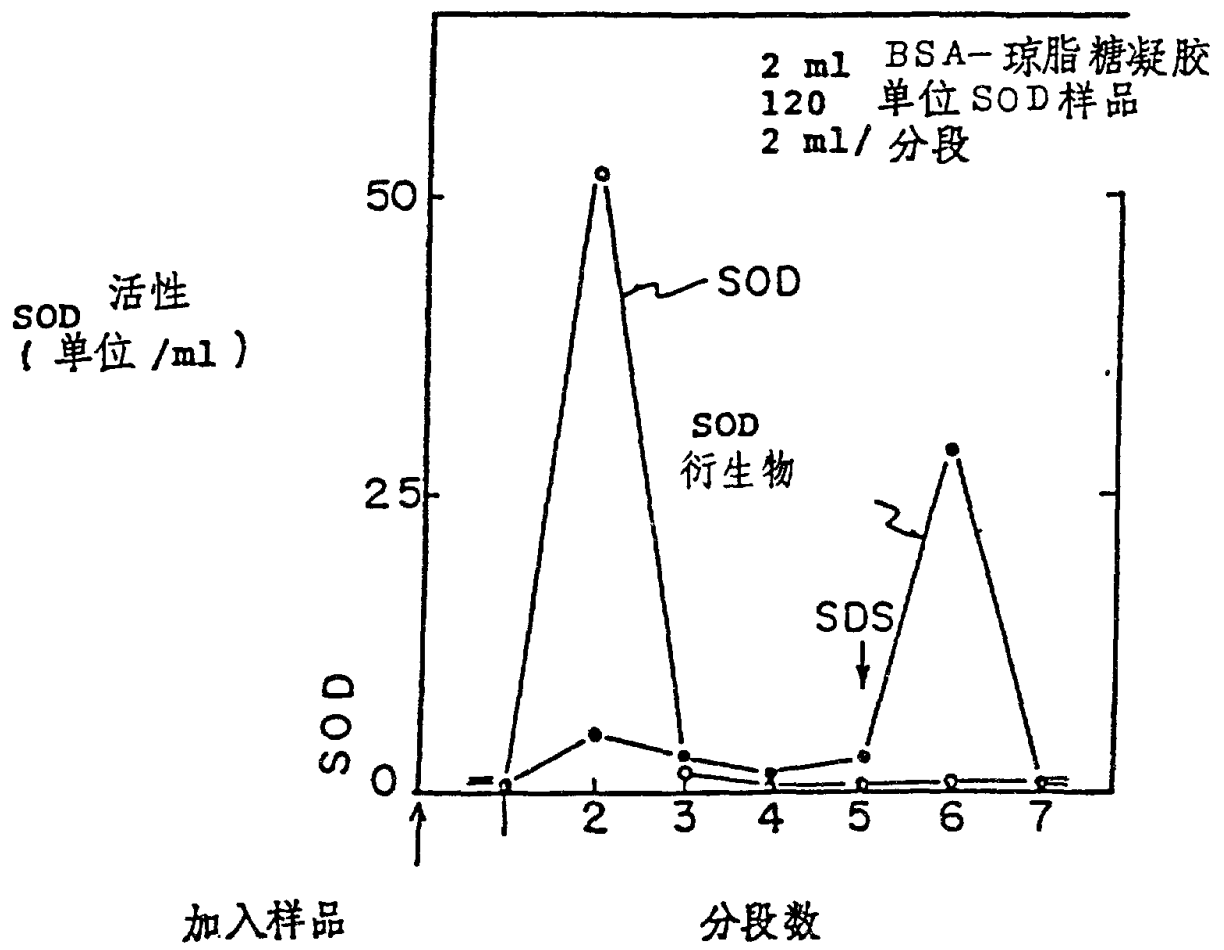


图 11

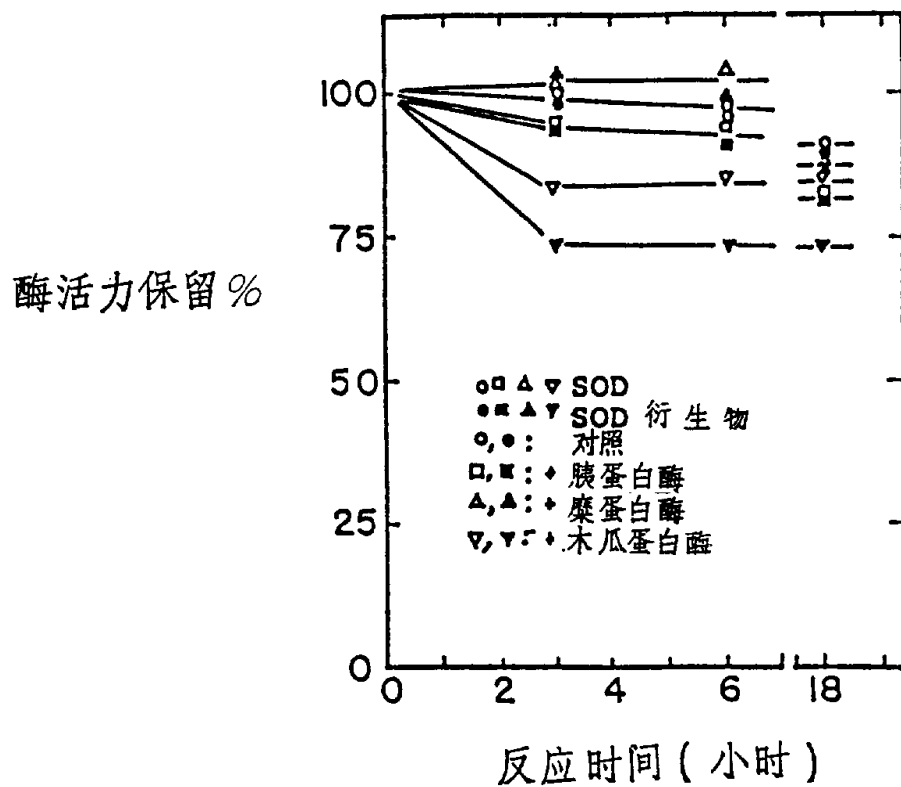


图 12

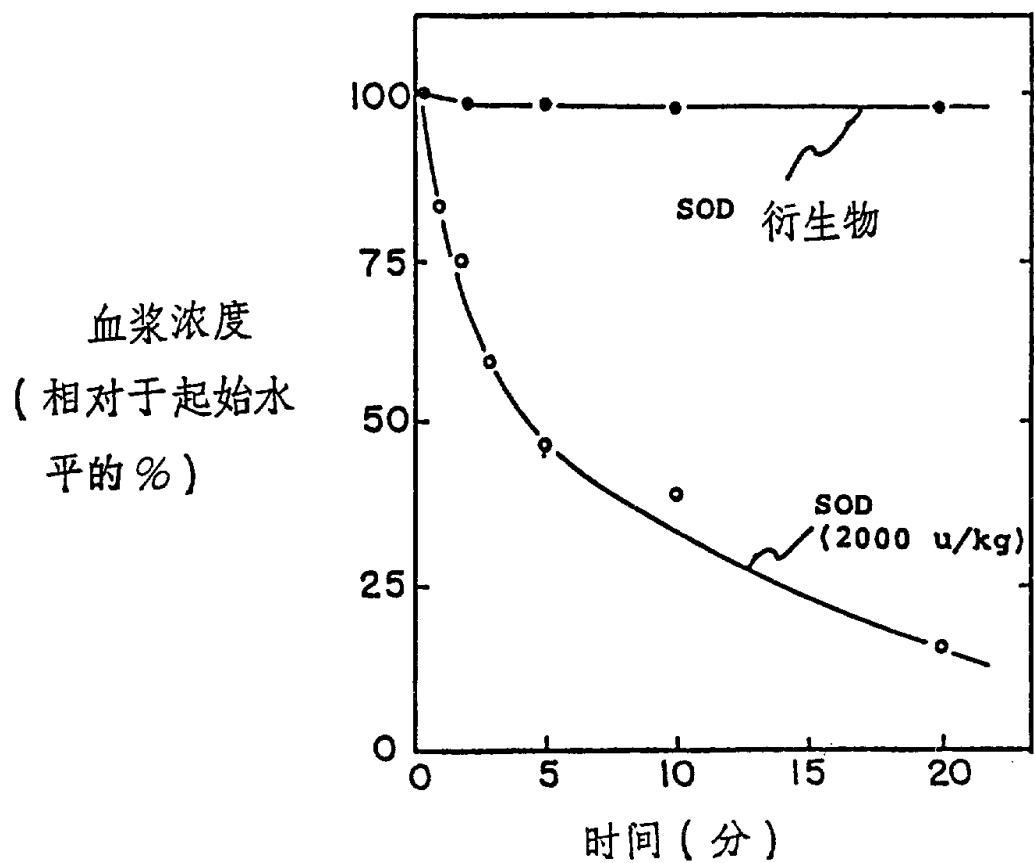


图 13

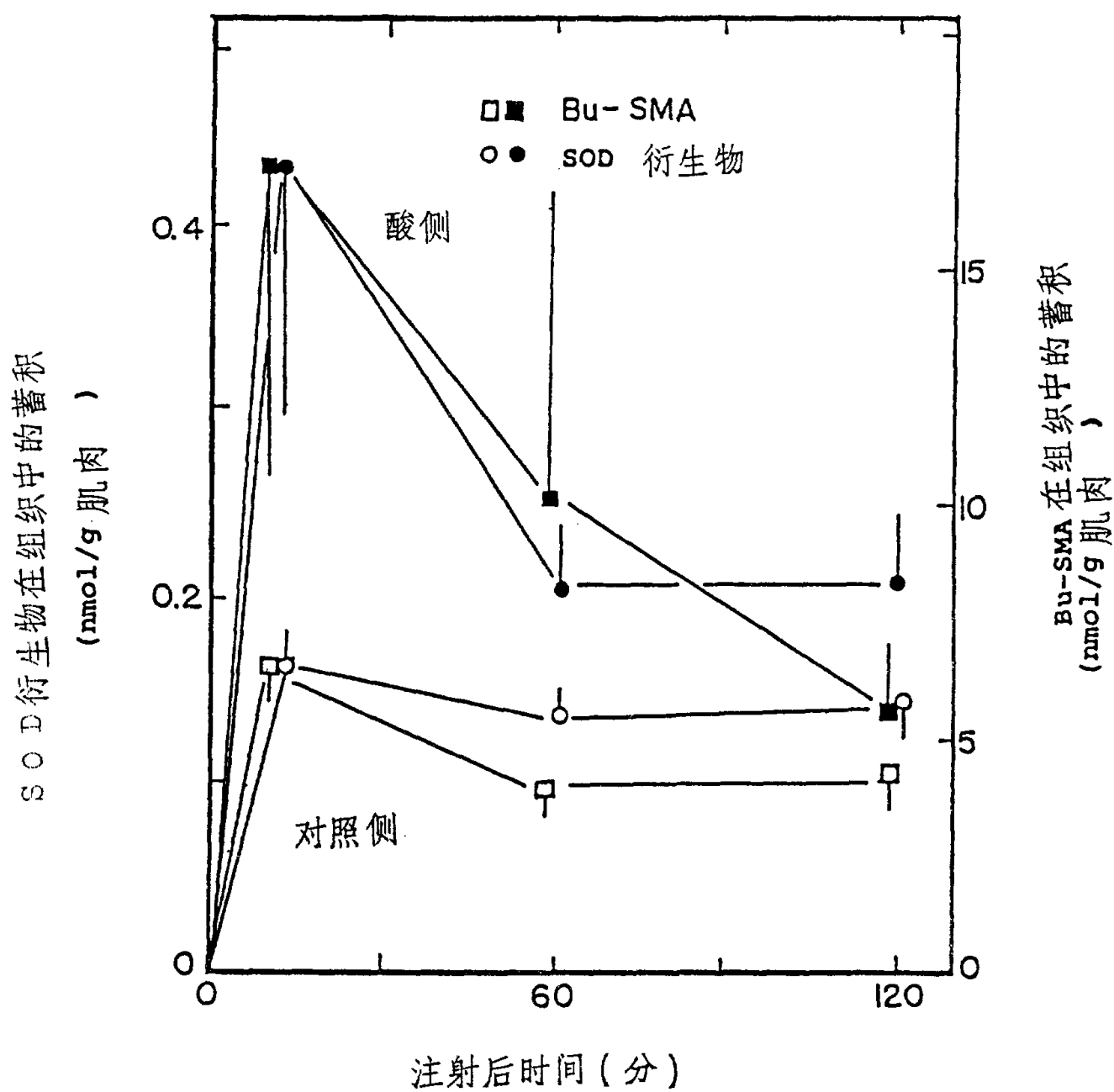
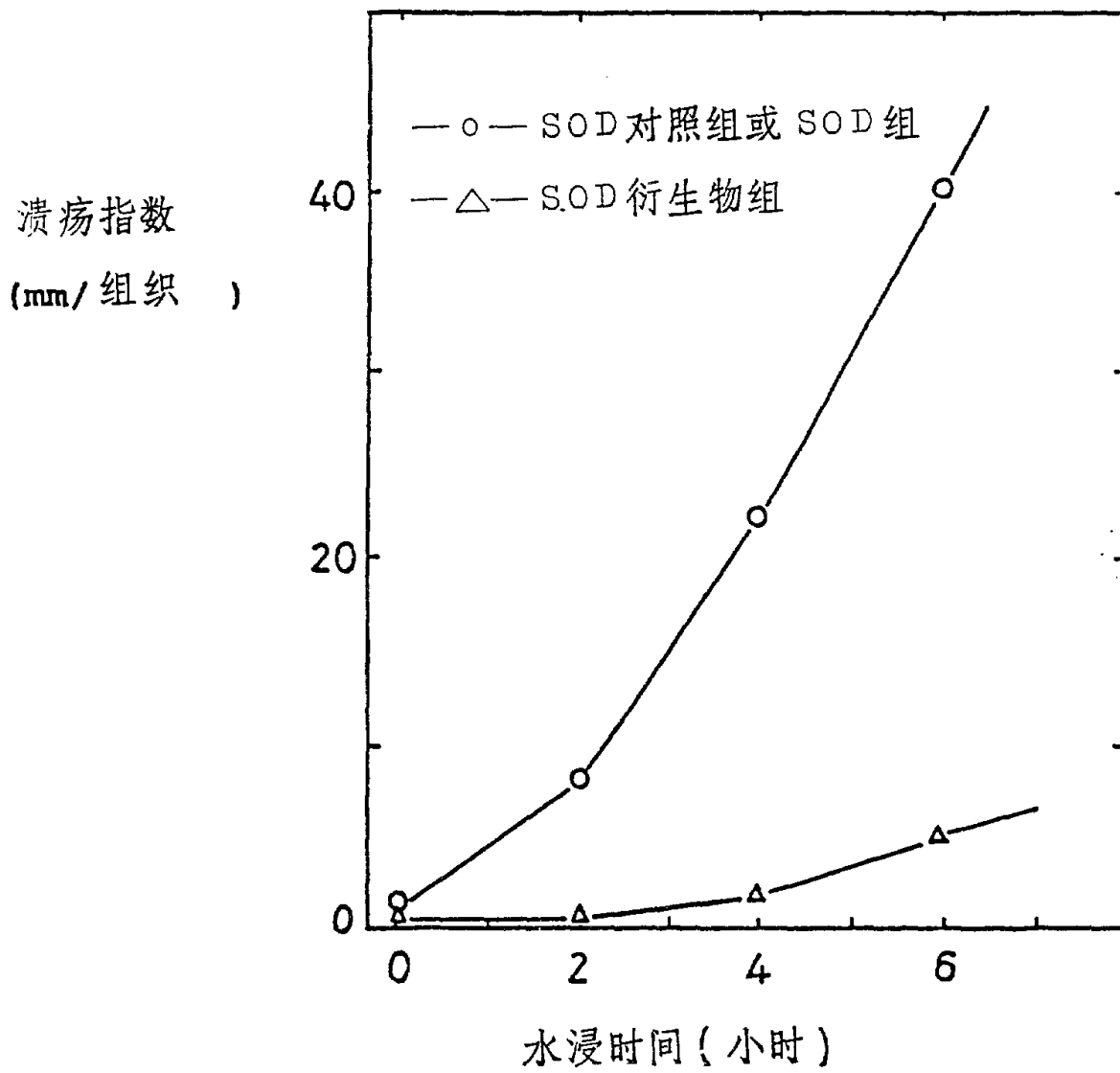
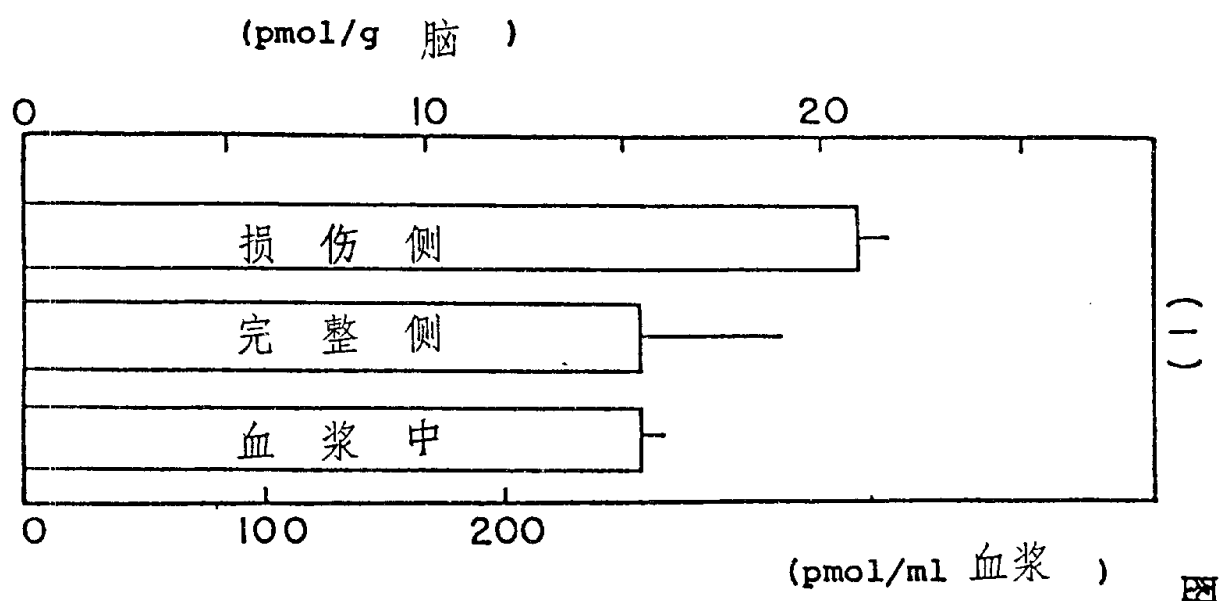


图 14



S O D 衍生物在组织中的蓄积



Bu-SMA 在组织中蓄积

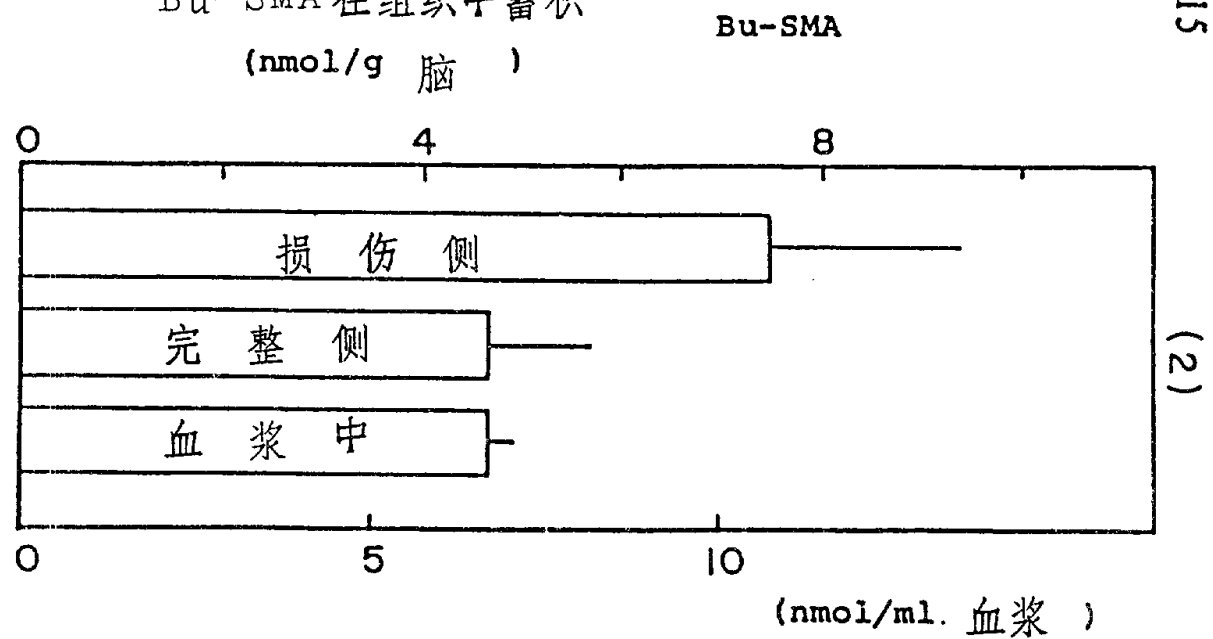


图 16

