

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A01N 47/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880013983.5

[43] 公开日 2010 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 101686687A

[22] 申请日 2008.2.28

[21] 申请号 200880013983.5

[30] 优先权

[32] 2007.2.28 [33] US [31] 60/892,212

[86] 国际申请 PCT/US2008/002626 2008.2.28

[87] 国际公布 WO2008/106186 英 2008.9.4

[85] 进入国家阶段日期 2009.10.28

[71] 申请人 塞瑞纳治疗公司

地址 美国亚拉巴马州

[72] 发明人 J.·米尔顿·哈里斯

迈克尔·大卫·本特利 尹君尚

方志浩

弗朗西斯科·玛丽亚·委罗内塞

[74] 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司
代理人 黄志华

权利要求书 10 页 说明书 60 页 附图 4 页

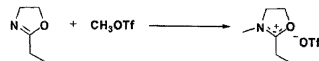
[54] 发明名称

活化的聚噁唑啉及包含该聚噁唑啉的组合物

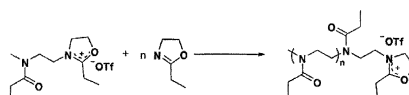
[57] 摘要

本公开提供了具有一系列活性官能团的末端活化的单官能 POZ 衍生物，所述活性官能团可使所述单官能 POZ 衍生物与多种靶分子在广泛的反应条件下偶联以产生水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。此外，本公开提供了合成所公开的末端活化的单官能 POZ 衍生物及用所公开的末端活化的单官能 POZ 衍生物产生的水解稳定的靶分子-POZ 偶联物的新方法。

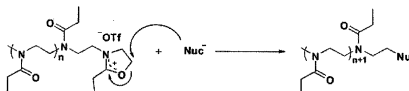
引发



增长



终止



1、一种末端活化的聚噁唑啉(POZ)化合物,所述 POZ 化合物包含 POZ 聚合物,所述 POZ 聚合物在其末端上有单个活性官能团,所述官能团能与靶分子上的基团反应而产生靶分子-POZ 偶联物,其中所述靶分子和所述 POZ 化合物间的所有连接均为水解稳定的连接。

2、如权利要求 1 所述的化合物,其中,所述 POZ 聚合物包含结构 $R_1-[N(COR_7)CH_2CH_2]_n$, 其中 R_1 为氢、未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基,各重复单元的 R_7 独立地选自未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基,以及 n 为 3-1000 的整数。

3、如权利要求 2 所述的化合物,其中, R_7 含 1-12 个碳原子。

4、如权利要求 2 所述的化合物,其中, R_7 为甲基、乙基或正丙基。

5、如权利要求 1 所述的化合物,其中,所述 POZ 聚合物的多分散性值低于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

6、如权利要求 1 所述的化合物,其中,所述靶分子-POZ 偶联物的体内半衰期在生理条件下增大。

7、一种聚噁唑啉(POZ)化合物,所述 POZ 化合物包含 POZ 聚合物,所述 POZ 聚合物在其末端上有单个活性官能团,所述官能团能与靶分子上的基团反应而产生靶分子-POZ 偶联物,其中所述靶分子与所述 POZ 化合物间的所有连接均为水解稳定的连接,且所述 POZ 聚合物的多分散性值低于或等于 1.2。

8、如权利要求 7 所述的化合物,其中,所述 POZ 聚合物包含结构 $R_1-[N(COR_7)CH_2CH_2]_n$, 其中 R_1 为氢、未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基,各重复单元的 R_7 独立地选自未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基,以及 n 为 3-1000 的整数。

9、如权利要求 8 所述的化合物,其中, R_7 含 1-12 个碳原子。

10、如权利要求 8 所述的化合物,其中, R_7 为甲基、乙基或正丙基。

11、如权利要求 7 所述的化合物,其中,所述 POZ 聚合物的多分散性值低

于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

12、如权利要求 7 所述的化合物，其中，所述靶分子-POZ 偶联物的体内半衰期在生理条件下增大。

13、一种基本结构为 R_1 -POZ- P_p - Q_q -X 的末端活化的聚噁唑啉(POZ)化合物，其中，

POZ 为 $[N(COR_7)CH_2CH_2]_n$

X 为能与靶分子形成水解稳定的连接以形成靶分子-POZ 偶联物的活性官能团；

P 为连接基团，包括但不限于-O-、-S-、NH、-NR₁₁-、未取代的杂环基，

Q 为连接基团，包括但不限于未取代的或取代的烷基、烯基、芳烷基、杂环基或芳基、 $-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_m-$ 、 $-NH-(CH_2)_m-NHCO-(CH_2)_m-$ 、 $-CO-(CH_2)_m-$ 、 $-CO-C_6H_4-$ 、或 $-CO-R_8$ 、 $-(R_{15})_m$ -或 $-(CR_3R_4)_m-$ ；

POZ 的各重复单元的 R₇ 独立地选自未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基；芳烷基、杂环基、芳基、链烯，

R₁、R₃-R₄、R₁₁ 和 R₁₄-R₁₅ 各自独立地选自氢、未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基；

R₈ 为 $-C_6H_{10}-CH_2-$ ；

n 为 3-1000 的整数；

m 为 1-10 的整数；

p 和 q 为独立地选自 0 或 1 的整数；

14、如权利要求 13 所述的化合物，其中，所述活性官能团被保护。

15、如权利要求 13 所述的化合物，其中，R₇ 含 1-12 个碳原子。

16、如权利要求 13 所述的化合物，其中，R₇ 为甲基、乙基或正丙基。

17、如权利要求 13 所述的化合物，其中，所述活性官能团选自由醛、活性碳酸盐(-O-CO-Z)、马来酰亚胺、磺酸酯(OSO₂-R₂₃)、酰肼、环氧化物、碘乙酰胺、炔、叠氮化物、异氰酸盐、氰酸盐、异硫氰酸盐、硫氰酸盐、腈、羰基二咪唑衍生物、乙烯基砷、羧酰卤、活性酯(-CO-Z)和羧酸组成的集合，其中任何

前述官能团都可以是取代的或未取代的, Z 为活化基团, 以及 R_{23} 为未取代的或取代的烷基、烯基、炔基、芳烷基或芳基。

18、如权利要求 17 所述的化合物, 其中, 所述磺酸酯为三氟乙基磺酸酯或甲磺酸酯。

19、如权利要求 17 所述的化合物, 其中, Z 为 N-琥珀酰亚胺氧基、氯、溴、磺基-N-琥珀酰亚胺氧基、对硝基苯氧基、1-咪唑基或 1-苯并三唑氧基。

20、如权利要求 17 所述的化合物, 其中, 所述活性官能团的杂环为取代的或未取代的哌嗪基或取代的哌啶基。

21、如权利要求 13 所述的化合物, 其中, 所述 POZ 聚合物的多分散性值低于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

22、如权利要求 13 所述的化合物, 其中, 所述靶分子-POZ 偶联物的体内半衰期在生理条件下增大。

23、一种基本结构为 R_1 -POZ- P_p - Q_q - W_w - U_u -X 的末端活化的聚噁唑啉(POZ)化合物,

其中,

POZ 为 $[N(COR_7)CH_2CH_2]_n$

X 为能与靶分子形成水解稳定的连接以形成靶分子-POZ 偶联物的活性官能团;

P 为连接基团, 包括但不限于-O-、-S-、NH、-NR₁₁-、未取代的杂环基,

Q 为连接基团, 包括但不限于未取代的或取代的烷基、烯基、芳烷基、杂环基或芳基、 $-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_m-$ 、 $-NH-(CH_2)_m-NHCO-(CH_2)_m-$ 、 $-CO-(CH_2)_m-$ 、 $-CO-C_6H_4-$ 、或 $-CO-R_8$ 、 $-(R_{15})_m$ -或 $-(CR_3R_4)_m$;

U 为连接, 选自由 $-(R_{16})_o-$ 、 $-(CR_5R_6)_o-$ 、 $-NH-R_{21}-NHCO-R_{22}-$ 组成的集合;

W 为连接基团, 选自由 $-NH-CO-O-$ 、 $-NH-CO$ 、 $-NH-CO-NH-$ 、 $-NH-CS-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 和 $SO-CO-NH$ 组成的集合;

POZ 的各重复单元的 R_7 独立地选自未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基;

R_1 、 R_3 - R_6 、 R_{11} 、 R_{14} - R_{16} 和 R_{21} - R_{22} 各自独立地选自氢、未取代的或取代的

烷基、烯基或芳烷基；

R_8 为 $-C_6H_{10}-CH_2-$ ；

n 为 3-1000 的整数；

m 和 o 独立地选自 1-10 的整数；

p 、 q 、 w 和 u 为独立地选自 0 或 1 的整数。

24、如权利要求 23 所述的化合物，其中，所述活性官能团被保护。

25、如权利要求 23 所述的化合物，其中， R_7 含 1-12 个碳原子。

26、如权利要求 23 所述的化合物，其中， R_7 为甲基、乙基或正丙基。

27、如权利要求 23 所述的化合物，其中，所述活性官能团选自自由醛、活性碳酸盐($-O-CO-Z$)、马来酰亚胺、磺酸酯(OSO_2-R_{23})、酰肼、环氧化物、碘乙酰胺、炔、叠氮化物、异氰酸盐、氰酸盐、异硫氰酸盐、硫氰酸盐、腈、羰基二咪唑衍生物、乙烯基砷、羧酰卤、活性酯($-CO-Z$)和羧酸组成的集合，其中任何前述官能团都可以是取代的或未取代的， Z 为活化基团， R_{23} 为未取代的或取代的烷基、烯基、炔基、芳烷基或芳基。

28、如权利要求 27 所述的化合物，其中，所述磺酸酯为三氟乙基磺酸酯或甲磺酸酯。

29、如权利要求 27 所述的化合物，其中， Z 为 N -琥珀酰亚胺氧基、氯、溴、磺基- N -琥珀酰亚胺氧基、对硝基苯氧基、1-咪唑基或 1-苯并三唑氧基。

30、如权利要求 27 所述的化合物，其中，所述活性官能团的杂环为取代的或未取代的哌嗪基或取代的哌啶基。

31、如权利要求 23 所述的化合物，其中，所述 POZ 聚合物的多分散性值低于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

32、如权利要求 23 所述的化合物，其中，所述靶分子-POZ 偶联物的体内半衰期在生理条件下增大。

33、一种基本结构为 $R_1-POZ-C-Q_q-X$ 的末端活化的聚噁唑啉(POZ)化合物，其中，

POZ 为 $[N(COR_7)CH_2CH_2]_n$

X 为能与靶分子形成水解稳定的连接的活性官能团;

Q 为连接基团, 包括但不限于未取代的或取代的烷基、烯基、芳烷基、杂环基或芳基、 $-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_m-$ 、 $-NH-(CH_2)_m-NHCO-(CH_2)_m-$ 、 $-CO-(CH_2)_m-$ 、 $-CO-C_6H_4-$ 、或 $-CO-R_8$ 、 $-(R_{15})_m-$ 或 $-(CR_3R_4)_m-$;

C 为连接基团, 选自 $-O-$ 、 $-NR_{19}-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 或所述 POZ 部分与所述吡啶或吡嗪环的 N 基团间形成的含-N-连接;

POZ 的各重复单元的 R_7 独立地选自未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基;

R_1 、 R_3 - R_4 、 R_{11} 、 R_{14} - R_{15} 和 R_{19} 各自独立地选自氢、未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基;

R_8 为 $-C_6H_{10}-CH_2-$;

n 为 3-1000 的整数;

m 为 1-10 的整数;

q 为 0 或 1 的整数;

34、如权利要求 33 所述的化合物, 其中, 所述活性官能团被保护。

35、如权利要求 33 所述的化合物, 其中, R_7 含 1-12 个碳原子。

36、如权利要求 33 所述的化合物, 其中, R_7 为甲基、乙基或正丙基。

37、如权利要求 33 所述的化合物, 其中, 所述活性官能团选自醛、活性碳酸盐($-O-CO-Z$)、马来酰亚胺、磺酸酯(OSO_2-R_{23})、酰肼、环氧化物、碘乙酰胺、炔、叠氮化物、异氰酸盐、氰酸盐、异硫氰酸盐、硫氰酸盐、腈、羰基二咪唑衍生物、乙烯基砜、羧酰卤、活性酯($-CO-Z$)和羧酸组成的集合, 其中任何前述官能团都可以是取代的或未取代的, Z 为活化基团, R_{23} 为未取代的或取代的烷基、烯基、炔基、芳烷基或芳基。

38、如权利要求 37 所述的化合物, 其中, 所述磺酸酯为三氟乙基磺酸酯或甲磺酸酯。

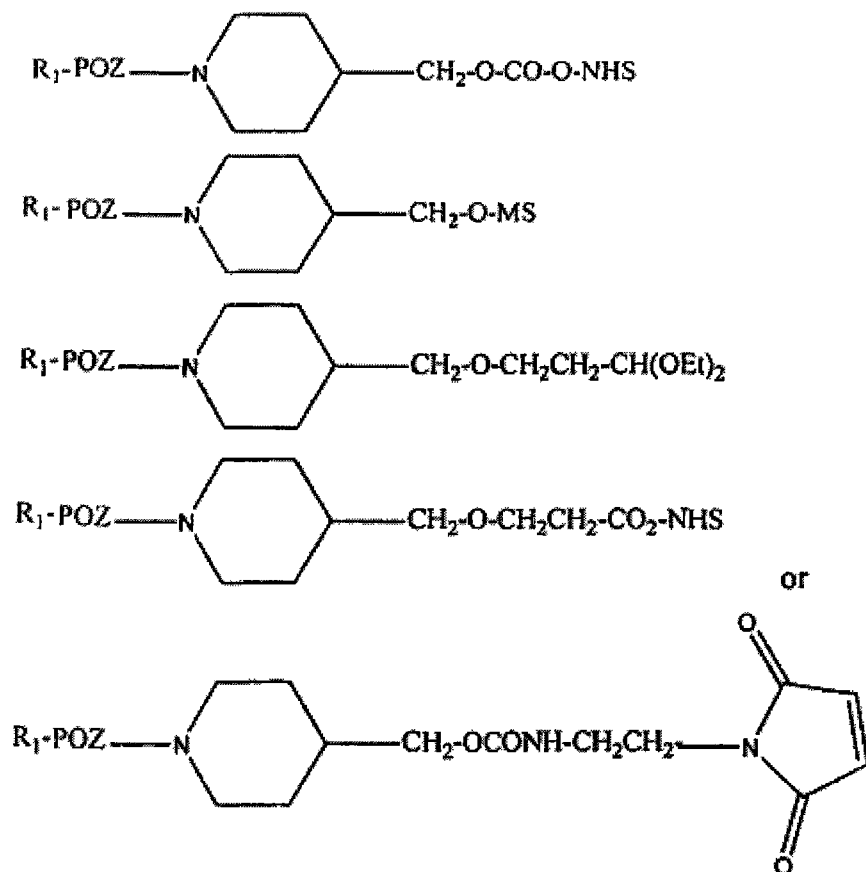
39、如权利要求 37 所述的化合物, 其中, Z 为 N-琥珀酰亚胺氧基、氯、溴、磺基-N-琥珀酰亚胺氧基、对硝基苯氧基、1-咪唑基或 1-苯并三唑氧基。

40、如权利要求 37 所述的化合物, 其中, 所述 X 基团的杂环为取代的或未

取代的哌嗪基或取代的哌啶基。

41、如权利要求 33 所述的化合物，其中，所述 POZ 聚合物的多分散性值低于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

42、如权利要求 33 所述的化合物，其中，所述化合物为



43、如权利要求 33 所述的化合物，其中，所述靶分子-POZ 偶联物的体内半衰期在生理条件下增大。

44、一种通式为 A-B-TM 的靶分子-POZ 偶联物，其中

A 为在其末端上有单个活性官能团的 POZ 化合物减去所述 POZ 化合物上的活性官能团与靶分子上的结合对象的反应过程中消除的任何离去基团；

TM 为靶分子，所述靶分子含所述结合对象；以及

B 为所述活性官能团与所述结合对象间形成的水解稳定的连接。

45、如权利要求 44 所述的偶联物，其中，所述活性官能团为三氟乙基磺酸酯，所述结合对象为 SH，以及 B 为硫醚连接。

46、如权利要求 44 所述的偶联物，其中，所述活性官能团为马来酰亚胺，

所述结合对象为 SH, 以及 B 为硫醚连接。

47、如权利要求 44 所述的偶联物, 其中, 所述活性官能团为活性碳酸盐, 所述结合对象为 NH_2 , 以及 B 为氨酯连接。

48、如权利要求 44 所述的偶联物, 其中, 所述活性官能团为活性酯, 所述结合对象为 NH_2 , 以及 B 为酰胺连接。

49、如权利要求 44 所述的偶联物, 其中, 所述活性官能团为醛, 所述结合对象为 NH_2 , 以及 B 为胺连接。

50、如权利要求 44 所述的偶联物, 其中, 所述 POZ 化合物的多分散性值低于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

51、如权利要求 44 所述的偶联物, 其中, 所述 POZ 化合物为权利要求 1、权利要求 13、权利要求 23 或权利要求 33 所述的 POZ 化合物。

52、如权利要求 44 所述的偶联物, 其中, 所述靶分子-POZ 偶联物的体内半衰期在生理条件下增大。

53、如权利要求 44 所述的偶联物, 其中, 所述 POZ 聚合物的多分散性值低于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

54、一种合成末端活化的聚噁唑啉(POZ)化合物的方法, 所述方法包括步骤:

(a) 引发 POZ 聚合以形成在末端上具有带正电荷的阳离子的 POZ 聚合物;

以及

(b) 用亲核试剂终止所述 POZ 聚合物

55、如权利要求 54 所述的方法, 其中, 所述亲核试剂为硫醇盐。

56、如权利要求 55 所述的方法, 其中, 所述硫醇盐包含结构 $\text{R}_{25}\text{S}-\text{D}_d-\text{X}$, 其中

X 为活性官能团或能转化为活性官能团的基团, 所述活性官能团能与靶分子形成水解稳定的连接以形成靶分子-POZ 偶联物;

R_{25} 为金属;

D 为连接基团, 包括但不限于未取代的或取代的烷基、烯基、杂环基或芳基、 $-(\text{CH}_2)_b-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_b-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_b-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_b-$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_b-$ 、 $-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-$ 、

或 $-\text{CO}-\text{R}_{26}$ 、或 $-(\text{CR}_{27}\text{R}_{28})_b$;

R_{27} 和 R_{28} 各自独立地选自氢或未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基集合;

R_{26} 为 $-\text{C}_6\text{H}_{10}-\text{CH}_2-$;

d 为 0 或 1; 以及

b 为 1-10 的整数。

57、如权利要求 56 所述的方法, 其中, 所述活性官能团选自自由醛、活性碳酸盐($-\text{O}-\text{CO}-\text{Z}$)、马来酰亚胺、磺酸酯($\text{OSO}_2-\text{R}_{23}$)、酰肼、环氧化物、碘乙酰胺、炔、叠氮化物、异氰酸盐、氰酸盐、异硫氰酸盐、硫氰酸盐、腈、羰基二咪唑衍生物、乙烯基砷、羧酰卤、活性酯($-\text{CO}-\text{Z}$)和羧酸组成的集合, 其中任何前述官能团都可以是取代的或未取代的, Z 为活化基团, R_{23} 为未取代的或取代的烷基、烯基、炔基、芳烷基或芳基。

58、如权利要求 56 所述的方法, 其中, 所述磺酸酯为三氟乙基磺酸酯或甲磺酸酯。

59、如权利要求 56 所述的方法, 其中, Z 为 N -琥珀酰亚胺氧基、氯、溴、磺基- N -琥珀酰亚胺氧基、对硝基苯氧基、1-咪唑基或 1-苯并三唑氧基。

60、如权利要求 56 所述的方法, 其中, R_{25} 为 Li 、 Na 或 K 。

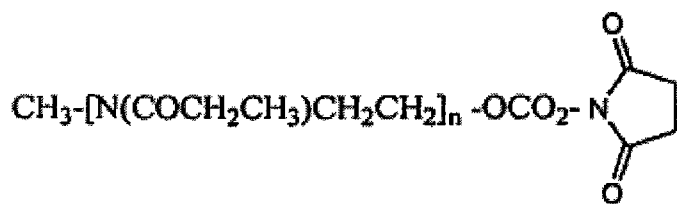
61、如权利要求 56 所述的方法, 其中, 所述活性官能团被保护。

62、如权利要求 54 所述的方法, 其中, 所述 POZ 聚合物的多分散性值低于或等于 1.2、低于或等于 1.1、或低于或等于 1.05。

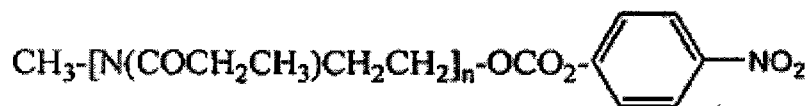
63、一种具有如下结构的化合物:



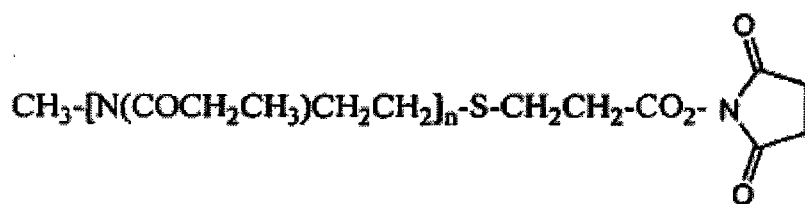
(h)



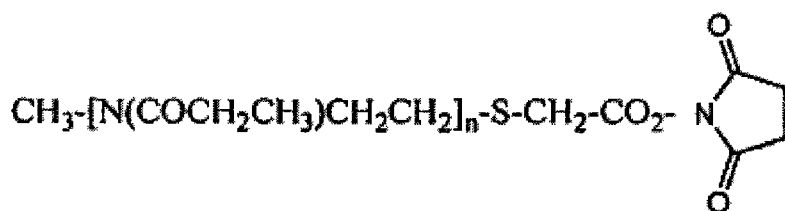
(i)



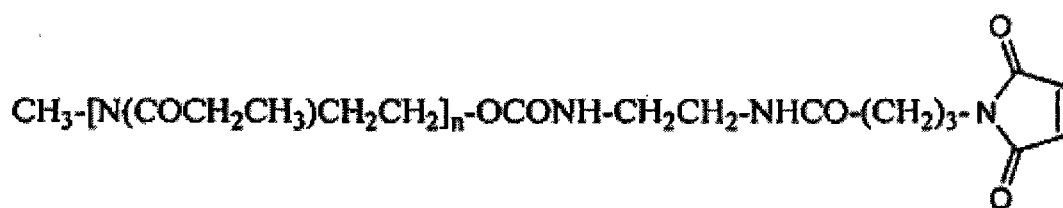
(j)



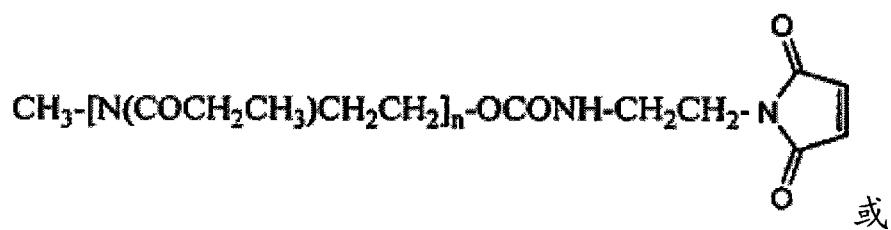
(k)



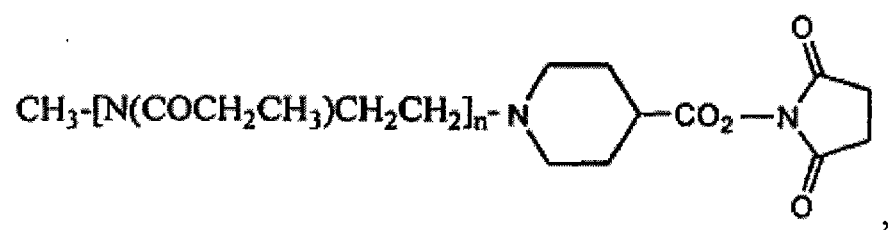
(l)



(m)



(n)



其中，n 为 3-1000 的整数。

活化的聚噁唑啉及包含该聚噁唑啉的组合物

本申请要求 2007 年 2 月 28 日提交的美国临时申请 60/892,212 的权益。

技术领域

本公开涉及聚噁唑啉衍生物、这类聚噁唑啉衍生物的制备中可用的合成方法和中间体、以及用这类聚噁唑啉衍生物产生的水解稳定的靶分子-聚噁唑啉偶联物。

背景技术

在现代药物科学中，聚合物修饰疗法已被证实具有高实用性。特别地，与聚乙二醇类(PEGs)偶联的蛋白质现已构成治疗一系列疾病的诸多很重要的疗法。由于聚合物修饰疗法的成功，故扩展具有这类应用的聚合物的范围、尤其是提供具有聚乙二醇所不具有的性质的聚合物是人们所感兴趣的。

附图说明

图 1 示出了 2-烷基-2-噁唑啉(如 2-乙基-2-噁唑啉)聚合的活性阳离子机制，其中-OTf 为-OSO₂-CF₃ 或“三氟甲磺酸盐”，Nuc⁻为负的亲核试剂；

图 2A 和图 2B 示出了通过现有技术的方法制得的 M-PEOZ-OH 2000 的凝胶渗透色谱；

图 3 示出了聚噁唑啉衍生物(这里以 2-乙基-2-噁唑啉示出)的聚合过程中链转移的消除-二聚机制的机制；

图 4A 和图 4B 示出了通过本发明的优化条件制得的 M-PEOZ-OH 2000 (图 4A)和 M-PEOZ-OH 5000 (图 4B)的凝胶渗透色谱。

发明详述

定义

本文中用到的术语“POZ”、“POZ 化合物”或“POZ 聚合物”指含具有结构 $-\text{[N(COR}_7\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{]}_n-$ 的重复单元的 2-取代-2-噁唑啉聚合物，其中各个重复单元的 R_7 独立地选自未取代的或取代的烷基、烯基、芳烷基或杂环基烷基， n 为 3-1000；在一个实施方案中，所述未取代的或取代的烷基、烯基、芳烷基或杂环基烷基包含 1-10 个碳原子，在一个更具体的实施方案中， R_7 为甲基、乙基或正丙基。

本文中用到的术语“PMOZ”指含具有结构 $-\text{[N(COCH}_3\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{]}_n-$ 的重复单元的 POZ。

本文中用到的术语“PEOZ”指含具有结构 $-\text{[N(COCH}_2\text{CH}_3\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{]}_n-$ 的重复单元的 POZ。

本文中用到的术语 M-POZ、M-PMOZ 或 M-PEOZ 指其中引发端 (initiating end) 上的氮与甲基结合的上述聚合物。

本文中用到的术语“POZ 衍生物”或“聚噁唑啉衍生物”指包含 POZ 聚合物的结构，所述 POZ 聚合物在 POZ 聚合物的末端上具有单个活性官能团，所述官能团能直接或间接地与靶分子上的化学基团形成连接；在一个实施方案中，所述 POZ 衍生物为单官能 POZ 衍生物。

本文中用到的术语“靶分子”指具有治疗、诊断应用或靶向功能的任何分子，其中所述靶分子能与本公开的 POZ 聚合物或 POZ 衍生物上的活性官能团反应，包括但不限于治疗部分(例如但不限于药物)、诊断部分、靶向部分、有机小分子、低聚核苷酸、多肽、抗体、抗体片段和蛋白质。

本文中用到的术语“水解稳定的靶分子-POZ 偶联物”指本公开的 POZ 衍生物与靶分子的偶联物，以使 POZ 偶联物与靶分子间的所有化学连接均水解稳定。

本文中用到的术语“水解稳定的”指在生理条件下的水溶液中稳定的连接；在一个实施方案中，这样的连接将稳定至少 12 小时、24 小时、48 小时、96 小时、192 小时或更久；在一个替选实施方案中，这样的连接无限期稳定。

本文中用到的术语“水解不稳定的”指在生理条件下的水溶液中不稳定的连

接。

本文中用到的术语“生理条件”指 pH 为 6-8、温度为 30-42 摄氏度的水溶液。

本文中用到的术语“活性官能团”指与反应需要强催化剂、高温或不切实际的反应条件的那些基团相比，易于与亲电或亲核基团反应或易于通过环加成反应来反应的那些基团。

本文中关于本文中所述的 POZ 衍生物或其组分用到的术语“连接”、“被连接的”、“连接”或“连接剂”指通常因化学反应而形成且通常为共价连接的基团或键。

本文中关于羟基、胺基、巯基及其他反应性基团用到的术语“被保护的”指经本领域技术人员熟知的保护基（如 Protective Groups in Organic Synthesis, Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., John Wiley & Sons, New York, N.Y., (第三版, 1999)中记载的那些）保护而避免不希望的反应的这些官能团形式，所述保护基可用其中记载的程序添加或除去。被保护的羟基的实例包括但不限于：甲硅烷基醚，如通过羟基与试剂（如但不限于叔丁基二甲基氯硅烷、三甲基氯硅烷、三异丙基氯硅烷、三乙基氯硅烷）的反应获得的那些；取代的甲基和乙基醚，如但不限于甲氧基甲基醚、甲硫基甲基醚、苄氧基甲基醚、叔丁氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基甲基醚、四氢吡喃醚、1-乙氧基乙基醚、烯丙基醚、苄基醚；酯，如但不限于苯甲酰甲酸酯、甲酸酯、乙酸酯、三氯乙酸酯和三氟乙酸酯。被保护的胺基的实例包括但不限于：酰胺，如甲酰胺、乙酰胺、三氟乙酰胺和苯甲酰胺；酰亚胺，如邻苯二甲酰亚胺和二硫代琥珀酰亚胺；等等。被保护的巯基的实例包括但不限于：硫醚，如 S-苄基硫醚和 S-4-吡啶甲基硫醚；取代的 S-甲基衍生物，如硫代半缩醛、二硫缩醛和氨基硫缩醛；等等。

无论单独或作为取代基的一部分使用，本文中用到的术语“烷基”包括包含一到二十个碳原子的直链烃基。因此该表述包括直链烷基，如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基等。该表述也包括直链烷基的支链异构体，包括但不限于作为实例给出的如下基团：
-CH(CH₃)₂、-CH(CH₃)(CH₂CH₃)、-CH(CH₂CH₃)₂、-C(CH₃)₃、-C(CH₂CH₃)₃、
-CH₂CH(CH₃)₂、-CH₂CH(CH₃)(CH₂CH₃)、-CH₂CH(CH₂CH₃)₂、-CH₂C(CH₃)₃、

$-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$
等。该表述也包括环状烷基，如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基，以及被如上所定义的直链和支链烷基所取代的这类环。该表述也包括多环烷基，如但不限于金刚烷基冰片基和双环[2.2.2]辛基，以及被如上所定义的直链和支链烷基所取代的这类环。

无论单独或作为取代基的一部分使用，本文中用到的术语“烯基”包括在任何两个相邻的碳原子间具有至少一个双键的烷基。

无论单独或作为取代基的一部分使用，本文中用到的术语“炔基”包括在任何两个相邻的碳原子间具有至少一个三键的烷基。

本文中用到的术语“未取代的烷基”、“未取代的烯基”和“未取代的炔基”指不含杂原子的烷基、烯基和炔基。

表述“取代的烷基”、“取代的烯基”和“未取代的炔基”指如上所定义的烷基、烯基和炔基，其中与碳或氢的一个或多个键被与非氢或非碳原子的键所代替，所述非氢或非碳原子如但不限于基团如烷氧基和芳氧基中的氧原子；基团如烷基和芳基硫化物、砷基、磺酰基和亚砷基中的硫原子；基团如三烷基甲硅烷基、二烷基芳基甲硅烷基、烷基二芳基甲硅烷基和三芳基甲硅烷基中的硅原子；和各种其他基团中的其他杂原子。

本文中用到的术语“未取代的芳基”指环部分中具有 6-12 个碳原子的不含杂原子的单环或双环芳族烃基，如但不限于苯基、萘基、蒽基、联苯基和二苯基。虽然表述“未取代的芳基”包括含稠环的基团（如萘），但其不包括环成员中的一个上结合有其他基团（如烷基或卤素基团）的芳基，因为如下所述，如甲苯基的芳基在本文中被视为取代的芳基。但未取代的芳基可与母体化合物中的一个或多个碳原子、氧原子、氮原子和/或硫原子结合。

本文中用到的术语“取代的芳基”相对于未取代的芳基具有与取代的烷基相

对于未取代的烷基相同的含义。但取代的芳基也包括其中一个芳族碳与一个非碳或非氢原子结合的芳基，所述非碳或非氢原子如但不限于上面关于取代的烷基所描述的那些原子，而且也包括其中芳基的一个或多个芳族碳与如本文中所定义的取代的和/或未取代的烷基、烯基或炔基结合的芳基。这包括其中芳基的两个碳原子与烷基或烯基的两个原子结合而限定稠环系(如二氢萘基或四氢萘基)的键合排列。因此，表述“取代的芳基”除了别的之外还包括但不限于甲基和羧基。

本文中用到的术语“未取代的芳烷基”指如上所定义的未取代的烷基或烯基，其中未取代的或取代的烷基或烯基的氢或碳键被与如上所定义的取代的或未取代的芳基的键所代替。例如，甲基(CH_3)为未取代的烷基。如果该甲基的氢原子被与苯基的键所代替，例如如果该甲基的碳与苯的碳结合，则该化合物为未取代的芳烷基(即苄基)。

本文中用到的术语“取代的芳烷基”相对于未取代的芳烷基具有与取代的芳基相对于未取代的芳基相同的含义。但取代的芳烷基也包括其中基团的烷基部分的碳或氢键被与非碳或非氢原子的键所代替的基团。

本文中用到的术语“未取代的杂环基”指芳族和非芳族环化合物，包括单环、双环和多环化合物，如但不限于含3个或更多个环成员的奎宁环基，这些环成员中的一个或多个为杂原子，如但不限于N、O和S。虽然表述“未取代的杂环基”包括稠合杂环(如苯并咪唑基)，但其不包括环成员中的一个上结合有其他基团(如烷基或卤素基团)的杂环基，因为如2-甲基苯并咪唑基的化合物为如下面所定义的“取代的杂环基”。杂环基的实例包括但不限于：含1-4个氮原子的不饱和3-8员环，如但不限于吡咯基、吡咯啉基、咪唑基、吡唑基、吡啶基、二氢吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、三唑基、四唑基；含1-4个氮原子的饱和3-8员环，如但不限于吡咯烷基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基；含1-4个氮原子的稠合不饱和杂环基，如但不限于吲哚基、异吲哚基、吲哚啉基、茚满基、苯并咪唑基、喹啉基、异喹啉基、吡唑基、苯并三唑基；含1-2个氧原子和1-3个氮原子的不饱和3-8员环，如但不限于噁唑基、异噁唑基、噁二唑基；含1-2个

氧原子和 1-3 个氮原子的饱和 3-8 员环, 如但不限于吗啉基; 含 1-2 个氧原子和 1-3 个氮原子的不饱和稠合杂环基, 如苯并噁唑基、苯并噁二唑基、苯并噁嗪基(如 2H-1,4-苯并噁嗪基等); 含 1-3 个硫原子和 1-3 个氮原子的不饱和 3-8 员环, 如但不限于噻唑基、异噻唑基、噻二唑基(如 1,2,3-噻二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、1,2,5-噻二唑基等); 含 1-2 个硫原子和 1-3 个氮原子的饱和 3-8 员环, 如但不限于噻唑烷基; 含 1-2 个硫原子的饱和和不饱和 3-8 员环, 如但不限于噻嗯基、二氢二硫杂环己二烯基(dihydrodithiynyl)、二氢二亚硫酰、四氢噻吩、四氢噻喃; 含 1-2 个硫原子和 1-3 个氮原子的不饱和稠合杂环, 如但不限于苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并噻嗪基(如 2H-1,4-苯并噻嗪基等)、二氢苯并噻嗪基(如 2H-3,4-二氢苯并噻嗪基); 含氧原子的不饱和 3-8 员环, 如但不限于呋喃基; 含 1-2 个氧原子的不饱和稠合杂环, 如苯并间二氧杂环戊烯基(如 1,3-苯并间二氧杂环戊烯基等); 含氧原子和 1-2 个硫原子的不饱和 3-8 员环, 如但不限于二氢氧硫杂环己二烯基(dihydrooxathiynyl); 含 1-2 个氧原子和 1-2 个硫原子的饱和 3-8 员环, 如 1,4-氧硫杂环己烷; 含 1-2 个硫原子的不饱和稠环, 如苯并噻嗯基、苯并二硫杂环己二烯基(benzodithiynyl); 以及含氧原子和 1-2 个氧原子的不饱和稠合杂环, 如苯并氧硫杂环己二烯基(benzoxathiynyl)。杂环基也包括上面描述的其中环中的一个或多个 S 原子与一个或两个氧原子双键键合的那些(亚砷和砷)。例如, 杂环基包括四氢噻吩、氧化四氢噻吩、和 1,1-二氧化四氢噻吩。优选的杂环基含 5 或 6 个环成员。更优选的杂环基包括吗啉、哌嗪、哌啶、吡咯烷、咪唑、吡唑、1,2,3-三唑、1,2,4-三唑、四唑、硫代吗啉、其中硫代吗啉的 S 原子与一个或多个 O 原子结合的硫代吗啉、吡咯、高哌嗪、噁唑烷-2-酮、吡咯烷-2-酮、噁唑、奎宁环、噻唑、异噁唑、呋喃和四氢呋喃。

本文中用到的术语“取代的杂环基”相对于未取代的杂环基具有与取代的烷基相对于未取代的烷基相同的含义。但取代的杂环基也包括其中一个碳与一个非碳或非氢原子结合的杂环基, 所述非碳或非氢原子如但不限于上面关于取代的烷基和取代的芳基所描述的那些原子, 而且取代的杂环基也包括其中杂环基的一个或多个碳与如本文中所定义的取代的和/或未取代的烷基、烯基或芳基结

合的杂环基。这包括其中杂环基的两个碳原子与烷基、烯基或炔基的两个原子结合而限定稠环系的键合排列。实例除了别的以外还包括但不限于 2-甲基苯并咪唑基、5-甲基苯并咪唑基、5-氯苯并噻唑基、1-甲基哌嗪基和 2-氯吡啶基。

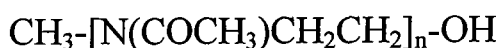
本文中用到的术语“未取代的杂环基烷基”指如上所定义的未取代的烷基或烯基，其中未取代的烷基或烯基的氢或碳键被与如上所定义的取代的或未取代的杂环基的键所代替。例如，甲基(CH₃)为未取代的烷基。如果该甲基的氢原子被与杂环基的键所代替，例如如果该甲基的碳与吡啶的碳 2 (与吡啶的 N 结合的碳中的一个)或吡啶的碳 3 或碳 4 结合，则该化合物为未取代的杂环基烷基。

本文中用到的术语“取代的杂环基烷基”相对于未取代的杂环基烷基具有与取代的芳基相对于未取代的芳基相同的含义。但取代的杂环基烷基也包括其中非氢原子与杂环基烷基的杂环基中的杂原子（如但不限于哌啶基烷基的哌啶环中的氮原子）结合的基团。

总体描述

聚噁唑啉(POZ)是自 2-取代-2-噁唑啉单体制备的聚合物。这些聚合物是水溶性的且据报道在哺乳动物模型系统中是无毒的。POZ 通常通过适当化学计量的量的 2-烷基-2-噁唑啉与亲电引发剂（如对甲苯磺酸甲酯(或“甲苯磺酸酯”，CH₃-OSO₂-C₆H₄-CH₃)或三氟甲磺酸甲酯(CH₃-OSO₂-CF₃)）反应、然后用亲核试剂（如氢氧化物或胺）终止制备。所产生的聚合物便于以简写形式描述为引发基团由最左侧的基团表示、终止基团由最右侧的基团表示、2-烷基-2-噁唑啉组分在中间。因此，当本说明书中使用这种简写描述时，除非另有指出，否则名称的左侧将代表“引发剂端”，而名称的右侧将代表“末端”。

例如，当 2-取代-2-噁唑啉为 2-甲基-2-噁唑啉、甲苯磺酸甲酯被用作引发剂、氢氧化物被用作终止剂时，将产生如下聚合物：



上面的聚合物便于以简写符号描述为 M-PMOZ-OH，其中甲基引发剂由最左侧的 M(在引发剂端处)表示，PMOZ 代表聚甲基噁唑啉，其中重复单元的甲基

由 PMOZ 的 M 表示, 终止羟基由 -OH(在末端处)表示。聚合度 n 可在约 3 到约 1000 范围内。

另一常用的单体为 2-乙基-噁唑啉, 该单体由三氟甲磺酸甲酯引发、由氢氧化物终止时将提供如下 POZ 聚合物:



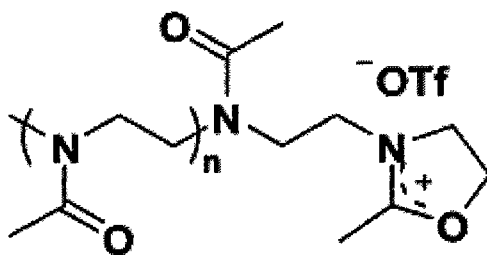
上面的聚合物便于以简写符号描述为 M-PEOZ-OH, 其中甲基引发剂由最左侧的 M(在引发剂端处)表示, PEOZ 代表聚甲基噁唑啉, 其中重复单元的乙基由 PEOZ 的 E 表示, 终止羟基由 -OH(在末端处)表示。

可使用更复杂的亲电试剂和亲核试剂。例如, 用苄基溴引发 2-乙基-2-噁唑啉聚合并用过量的乙二胺终止产生如下聚合物:



此外, 在相同的聚合物中可使用不同的单体来产生各种无规和嵌段共聚物。

该聚合工艺被称为活性阳离子聚合, 因为用亲电试剂进行的引发产生噁唑啉盐 (oxazolinium) 阳离子, 该噁唑啉盐阳离子然后以链反应与其他单体单元反应产生增长的“活性”阳离子。



通过假定活性阳离子可由下面的非环形式表示, 可以预测终止的产物, 虽然事实上环状形式无疑是最重要的, 且所需的产物通过亲核攻击环的 5-位产生:



本公开中以 M-PMOZ^+ 代表该阳离子。如上面所提到的, 该 POZ 阳离子可通过与亲核试剂 (如氢氧化物或胺) 反应而“被终止”。有趣的是, 用弱亲核试剂水进行的终止不产生所需的 5-位攻击产物 (“热力学”产物), 而是产生 2-位攻击 (“动力学”产物)。该动力学产物不稳定且可能重排得到酯产物或变回阳离子 (O. Nuyken, G. Maier, A. Gross, Macromol. Chem. Phys. 197, 83-85 (1996))。

羟基终止的聚合物可经进一步改性得到所需的衍生物。例如, Zalipsky 使端-OH 与戊二酸酐反应得到由戊二酸酯基团终止的 POZ (M. C. Woodle, C. M. Engbers and S. Zalipsky, *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 493-496)。



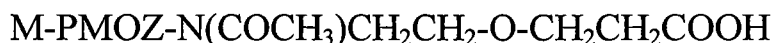
上面的聚合物被活化为琥珀酰亚胺基酯、与磷脂偶联并用来制备 POZ-修饰脂质体。已发现这些脂质体与 PEG-修饰脂质体具有相似的性质。

胺终止的聚合物也具有可用于进一步衍生化的反应性基团。例如, 用甲胺终止得到由活性基团-NHCH₃ 终止的 POZ。也可用环状二胺哌嗪终止。

噁唑啉聚合也可用功能性亲核试剂引发。例如, 亲电引发剂 3-溴丙酸乙酯已被用来引发 2-乙基-2-噁唑啉聚合。用氢氧化物终止得到如下聚合物:



值得一提的是, 在引发剂端和末端上具有相同官能团的 POZ 在化学上是不同的, 因为在引发剂端处的基团与氮相连, 而在末端处的基团与碳相连。例如, 下面的两种聚合物均是 PMOZ 的丙酸衍生物, 但不同在于引发剂端的丙酸与氮相连, 而末端的丙酸与碳相连(为清楚起见示出了开始或结束单体单元):



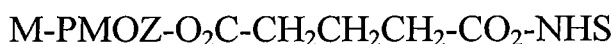
但制备含活性官能团的聚噁唑啉的另一途径是使单体(如 2-乙基-2-噁唑啉)与在 2-位上有活性官能团的噁唑啉单体共聚。例如, Jordan 和其同事已制备了 2-位上有乙炔和被保护的醛、羧酸和胺的噁唑啉(F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan and M. Essler, *J. Controlled Release*, 2007, 119, 291-300)。这些功能性单体与 2-乙基-2-噁唑啉的共聚产生含多个悬挂或侧链活性官能团的无规共聚物。例如, 用三氟甲磺酸甲酯引发 2-乙基-2-噁唑啉和 2-戊炔基-2-噁唑啉的聚合, 并随后用哌嗪(NHC₄H₈NH)终止产生如下无规共聚物:



下标“ran”表示该聚合物为无规共聚物。n 的值通常为约 20-30 而 m 为约 2-5。

为使 POZ 与靶分子(如但不限于多肽)偶联, 有必要通过在聚合物的至少

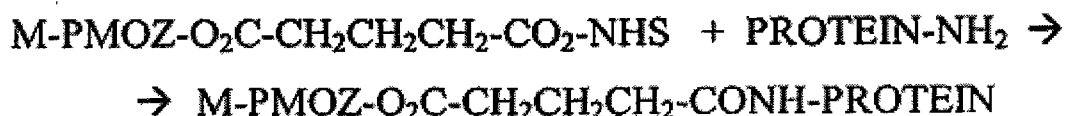
一个末端连上能与靶分子上的基团形成连接的活性官能团来“活化”该聚合物。关于活化 POZ 以与靶分子偶联所做的工作尚很少。活性基团可加在引发剂(左)端处或末(右)端处或两端处。例如,当靶分子为多肽时,多肽表面上有许多可与 POZ 上的活性官能团反应的氨基,在唯一出版了的连接 POZ 与蛋白质的实例中,Myamoto 和其同事将下面的 POZ 与过氧化氢酶的氨基相连(M. Myamoto, T. Saegusa, et al., *Macromolecules*, 1990, 23, 3201-3205):



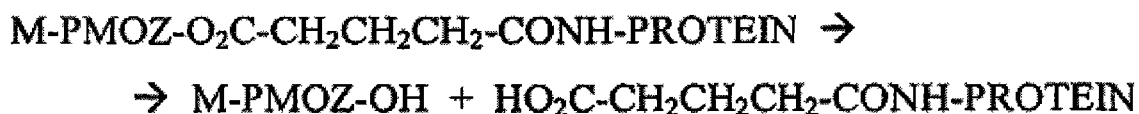
在这种情况下,使 M-PMOZ-OH 与戊二酸酐反应,所得羧酸经 N-羟基琥珀酰亚胺(由 NHS 表示)活化。NHS 活性酯是常用的羧酸活性形式。在本实例中,POZ-过氧化氢酶偶联物经证实是活性的。

现有技术已描述了三种能与靶分子偶联的末端活化的 POZ 化合物。但各个前述 POZ 衍生物均受到限制。Zalipsky 描述了活化的丙酸 POZ 化合物 NHS-OOCCH₂CH₂-PEOZ-OH,其中活化基团与分子的引发剂端相连(S. Zalipsky, C. B. Hansen, J. M. Oaks and T. M. Allen, *J. Pharm. Sci.*, 85, 133-137 (1996))。该 POZ 化合物通过用含活化基团的部分引发聚合来制备。但 Jordan、Hoogenboom 等已说明用不同的活化基团引发聚合可能需要很不同的反应条件,从而需要广泛的研究来确定最佳反应条件。因此,如果选择引发剂法来制备活化的 POZ 化合物,则必须进行探索性工作来为每种新化合物确定适宜的反应条件。此外,上面的化合物是双官能的,因为其由羟基而非惰性基团(如烷基)所终止。另外,如下面所讨论的,用卤代烷引发的聚合不经由活性阳离子机制进行并因此发现多分散性高。

Myamoto 和 Zalipsky 已制备了 NHS-活化的戊二酸酯衍生物。该衍生物自含 OH 基团作为末端活化基团的单官能 POZ 聚合物(M-PMOZ-OH)制备。但戊二酸酯和琥珀酸酯衍生物具有连接靶分子与 POZ 化合物的水解不稳定的酯连接。例如,NHS-活化的戊二酸酯衍生物将如所示与靶分子(这里以蛋白质示意)反应:



由于水解不稳定的酯连接，故所产生的靶分子-POZ 偶联物在生理条件下的生物体系（如人或其他哺乳动物）中将不稳定，而将水解而使 POZ 与蛋白质分裂：



此外，在上面的图式中，当靶分子-POZ 偶联物因不稳定的酯连接的分裂而水解时，所得靶分子将含“标签”或“半抗原”，其可导致靶分子的免疫原性。

最后，已制备出了邻二硫吡啶(OPSS)衍生物(G. Hsiue, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2006, 17, 781-786)。理论上该衍生物可与蛋白质硫醇基团偶联产生二硫化物连接，虽然 Hsiue 未进行此工作，但众所周知二硫化物是不稳定的而容易在血浆中还原。

阻碍已知的 POZ 聚合物用于修饰靶分子的另一问题在于一些 POZ 聚合物不具有单个活性官能团；即它们不是“单官能的”。如果要设法避免交联和/或在聚合物主链上与多个靶分子结合，则单官能性是必要的。例如，Jordan 和其同事已发表著作示出了 2-乙基-2-噁唑啉与含官能团的噁唑啉单体的共聚。这些悬挂官能团有时能与肽偶联。但该技术未设计为提供单官能 POZ 聚合物，而是产生含沿主链的悬挂基团的多官能化合物。在 POZ 主链中存在多个官能团有时可能是有利的，但在与多官能靶分子（如但不限于多肽和蛋白质）偶联时会导致交联和团聚体形成。此外存在希望单个靶分子与聚合物偶联的情况，而多官能 POZ 聚合物不允许这样做。

上述官能 POZ 化合物中的一些具有与靶分子（如蛋白质和小分子药物）偶联的潜能。但如对聚乙二醇修饰疗法进行的工作已表明的，聚合物修饰药物的商业开发通常需要采用分子量(MW)高达 40,000 Da 或以上以及分子量分布或多分散性(PD)低于 1.1 的聚合物。大量的工作已表明用常规技术的 POZ 不能获得在上述范围内的 MW 和 PD。通常见到的是，随着增长的 POZ 链的分子量达到大约 5,000 Da，多分散性也略微增高。副反应（包括链转移）开始大量发生。非常低的聚合温度与数周的反应时间的结合使用已表明可产生可接受的 PD，但这样的条件对于工业规模的制备来说是不现实的(J. S. Park and K. Kataoka,

Macromolecules, 39, 6622 (2006)). Hoogenboom、Schubert 及其同事指出, 低-PD POZ 可通过使用微波照射制备, 但用这种技术同样不能得到工业规模的聚合(R. M. Paulus, T. Erdmenger, C. R. Becer, R. Hoogenboom and U. S. Schubert, Macromol. Rapid Comm., 28, 484-491 (2007)). 由于通常发现多分散性宽, 故迄今所述的官能 POZ 化合物在聚合物疗法中的使用严重受限。

阻碍 POZ 衍生物用于修饰靶分子的又一问题在于不能得到一系列能在一系列条件下与靶分子反应的适宜的活化的 POZ 分子。此外, 目前可得到的 POZ 分子是多官能的或当与靶分子偶联时含水解不稳定的键, 而具有与之相关的缺点, 或活性取代基在引发反应过程中加入, 而具有与之相关的缺点。此外已描述了悬挂官能性, 但这些衍生物是多官能的而不适合本应用。

发明内容

本公开提供了具有一系列活性基团的单官能 POZ 衍生物, 所述活性基团可使所述单官能 POZ 衍生物与广泛的靶分子在广泛的反应条件下偶联以产生水解稳定的靶分子-POZ 偶联物, 其中, 一个靶分子与 POZ 衍生物结合。提供具有一系列能在不同的反应条件下与靶分子上的选定基团反应的活性基团的单官能 POZ 衍生物的能力提供了优于现有技术的显著优势, 因为不同的靶分子对不同的反应条件敏感且对于 POZ 衍生物与靶分子的偶联来说最有效的反应条件常随靶分子的性质及靶分子上与 POZ 衍生物反应的基团而异。

本公开通过提供一系列本领域中先前未知的 POZ 衍生物解决了前述 POZ 聚合物的局限。另外, 本公开提供了本领域中先前未知的单官能 POZ 衍生物。此外, 本公开提供了在其末端上有活性官能团的单官能 POZ 衍生物。此外, 本公开通过提供所公开的 POZ 衍生物的合成方法解决了现有技术的局限, 所述合成方法利用含易于得到且可用熟知的制备化学获得的终止剂端基(如但不限于羟基)的 POZ 分子。然后可通过以逐步方式偶联小的活性分子与可利用的端基而在 POZ 衍生物(如本文中所述)上生成所需的活性官能团来制得广泛的 POZ 衍生物。此外, 本公开通过使用所述的单官能 POZ 衍生物提供水解稳定的靶分子-POZ

偶联物而解决了现有技术的局限。这样的方法不仅提供了其中不超过一个靶分子与每种 POZ 衍生物结合的靶分子-POZ 偶联物，而且提高了靶分子-POZ 偶联物的体内半衰期并减少了与靶分子的“半抗原标记”有关的免疫原性问题。所公开的单官能 POZ 衍生物、合成方法和所得水解稳定的靶分子-POZ 偶联物在现有技术中尚未认识到。

因此，所述的单官能 POZ 衍生物和合成方法避免了现有技术中固有的问题并提供了产生其中一个靶分子与 POZ 衍生物结合的水解稳定的靶分子-POZ 偶联物的机制。

如下面更详细地讨论的，任何 2-取代-2-噁唑啉化合物（如但不限于 PMOZ 和 PEOZ）均可用来产生本公开的 POZ 衍生物。在某些实施方案中，PEOZ 或 PMOZ 为 2-取代-2-噁唑啉 POZ 分子。如本领域中熟知的，2-烷基-2-噁唑啉分子中不同的烷基可为本文中所述的 POZ 衍生物提供不同的溶解性、药代动力学和膜渗透能力。此外，POZ 聚合物主链中重复单元的性质可相同以产生均聚物（如但不限于 PMOZ 和 PEOZ）或至少一个重复单元可不同以提供共聚物（如但不限于无规或嵌段共聚物）。

此外，本公开提供了合成具有低多分散性(PD)值且由不希望的副反应（如但不限于链转移）所产生的杂质的量减少的 POZ 聚合物的新方法。在一个实施方案中，本公开描述了最大限度减少不希望的副反应（如但不限于链转移）的新方法，从而使纯度提高的 POZ 聚合物产物的 PD 值低。在一个实施方案中，本公开的方法提供了在提高的 MW 值下具有低 PD 值的 POZ 衍生物。在另一实施方案中，产生的 POZ 聚合物的杂质量减少。本公开中提供的新方法是对现有技术方法的改进并提供了适用于修饰广泛的靶分子的 POZ 聚合物的大规模工业制备。

因此，本公开也提供了纯度提高且 PD 值低的适用于药物应用中的 POZ 聚合物。如本领域中熟知的，PD 值将随 MW 而变；一般来说，随着分子量增大，PD 值也增大。使用本公开的方法可以工业规模生产各种 MW 的 POZ 聚合物，所述 POZ 聚合物在给定 MW 下的 PD 值比用现有技术的工业适用方法可产生的

低。例如，使用本公开的方法可产生 MW 为 20,000 Da 或以下、PD 值低于或等于 1.1 的 POZ 衍生物。在另一特别的实施方案中，产生的前述 POZ 衍生物的杂质质量减少。如本领域中熟知并在本文中的实施例所示出的，使用现有技术的方法合成的 POZ 衍生物含有某些杂质，这些杂质在 GPC 图中表现为高 MW 肩和低 MW 尾。这些杂质至少部分是通过不希望的副反应（如但不限于链转移）生成的。因此，所公开的 POZ 衍生物适用于修饰广泛的靶分子。

通过使用本文中所述的方法，可得到一系列具有不同的活性官能团的单官能 POZ 衍生物。此外，本公开提供了以高效方式产生这类单官能 POZ 衍生物的合成方法。最后，通过使用所述的单官能 POZ 衍生物，可产生其中一个靶分子与 POZ 衍生物结合的水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。

合成低 PD 值 POZ 衍生物的方法

聚合 2-芳基-和 2-烷基-2-噁唑啉的现有技术源于 Kobayshi、Nuyken 和 Jordan 的出版物(S. Kobayashi, E. Masuda, S. Shoda and Y. Shimano, *Macromolecules*, 1989, 22, 2878-2884; A. Gross, G. Maier and O. Nuyken, *Macromol. Chem. Phys.*, 1996, 197, 2811-2826; 和 F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan and M. Essler, *J. Controlled Release*, 2007, 119, 291-300)。在这些方法中，聚合由亲电试剂（如对甲苯磺酸烷基酯或三氟甲磺酸烷基酯）引发；在一个实施方案中，使用甲苯磺酸甲酯或三氟甲磺酸甲酯。使用这些强亲电试剂是为了通过活性阳离子机制促进聚合，因为理论上该机制不会产生终止或链转移反应(Q. Liu, M. Konas and J. S. Riffle, *Macromolecules*, 1993, 26, 5572-5576)(参见图 1)。但从现有技术已知，链转移反应确实发生且该反应不严格按活性阳离子机制进行。如果使用弱亲电试剂（如但不限于卤代烷），则反应会按共价机制进行，结果 PD 显著增大。现有技术聚合方法使用氯苯、二氯苯或乙腈作为溶剂。增长阶段在约 80℃ 下进行约 1-3 天。终止通过对碳酸钠水溶液于 80-90℃ 下加热进行而产生羟基端基或通过与仲胺（如吗啉或哌啶）反应而得到末端的叔胺。

这些典型的现有技术方法的使用导致凝胶渗透色谱中约 5-10% 的高-MW 肩及显著的低-MW 尾的存在。本领域中已注意到这样的结果(参见 J. Park and K.

Kataoka, *Macromolecules*, 2006, 39, 6622-6630)。文献中常见提到, 这种 MW 分布的变宽是由于通过消除-二聚机制进行的链转移, 虽然该过程的结构细节和实验支持是有限的(M. Litt, A. Levy and J. Herz, *J. Macromol. Sci.-Chem.*, 1975, A9, 703-727)。到链转移反应确实发生的程度, 这样的反应不能被认为是真正的活性聚合。因此, 减少不希望的副反应(如链转移)的发生是有利的。

本申请人已弄清了消除-二聚机制的细节、为该机制提供了实验支持并提出了关于终止步骤的机制的推论。这一新近进展特别重要, 因为其揭示了为何某些终止反应会失败而使我们选择成功的终止反应。这样的发现在本领域中尚未见述及且其为创建最大限度地减少不希望的副反应的发生并产生所需的终止产物的合成方法提供了指导。

如本文中所讨论的, 使用现有技术方法产生的 POZ 产物中含占 POZ 产物总质量的约 5-10% 的高 MW 肩。该高 MW 肩导致用现有技术合成方法获得的 PD 值不可接受。现有技术方法中观察到的高 MW 肩至少部分由聚合和/或终止步骤过程中形成的高-MW 二聚体组成(参见图 3)。消除-二聚机制预计, 如果链转移在终止步骤过程中发生, 则高 MW 肩中的物质将约是所需产物的 MW 的两倍。此外, 如果链转移在增长步骤过程中发生, 则将引发新的聚合物链, 且由于此时单体浓度较低, 故该聚合物的 MW 将低于聚合物本体的 MW。此外, 由于该新的聚合物链由链转移得到, 故其必须由质子而不是甲基引发, 因此该聚合物的 MALDI 谱将呈现出一组比主峰的低 14 Da 的峰。

关于终止步骤也有迄今尚未认识到的推论。例如, 为强碱和弱亲核试剂的终止亲核试剂的加入预计将导致显著的消除和二聚。此外, 噁唑啉盐阳离子是离域的或“软”亲电试剂, 且理论预测“软”或弥散的亲核试剂会更可能用作终止亲核试剂而非用作碱。举例来说, 可以预期“软”硫醇盐是比“硬”醇盐更有效的终止剂。

上面的预测得到了实验的确认。在一个实施例 3 中, 加入了空间受阻的乙基二异丙基胺(强碱和弱亲核试剂)来终止 2-乙基-2-噁唑啉聚合。该反应导致高 MW 二聚体产物增多至 75% (参见实施例 3)。经确认, GPC 中杂质峰的 MW 约为所

需产物的 MW 的两倍。此外, MALDI-TOF 谱确认, 部分主峰具有比预期的小 14 质量单位的第二组峰。我们已观察到, 该第二组峰的 MW 稍小于所需产物的 MW 的两倍。这大概因为在聚合物完全形成而单体被耗尽之前、在增长阶段过程中发生了某链转移而发生; 在这种情况下, 所述碱必定是单体, 因为其在增长过程中存在的最强的碱。

此外, 由已知为硬亲核试剂的醇盐进行终止导致大量的高 MW 二聚体而没有源自所需亲核攻击的产物(参见实施例 5)。此外, 由已知为软亲核试剂的硫醇盐进行终止确实如预测的那样导致了所需的亲核攻击产物(参见实施例 11)。

基于前述观察, 本申请人已开发出了新的合成方法, 所述新的合成方法减少了不希望的副反应(如链转移), 并可制备出比现有技术具有更优异的性质 POZ 聚合物和衍生物。所述改进的方法可用到如下改进中的一个或多个。

在一个实施方案中, POZ 聚合反应由强亲电试剂(如但不限于对甲苯磺酸烷基酯或三氟甲磺酸烷基酯)引发; 在一个实施方案中, 使用甲苯磺酸甲酯或三氟甲磺酸甲酯。

消除-二聚机制也表明, 增长和终止应在低温下进行, 因为高温有助于双分子消除。实施例通过示出降低增长和终止的温度会减少高 MW 二聚体的形成来确认了此言论。此预测也已得到了 Kataoka 的确认(参见 J. Park and K. Kataoka, *Macromolecules*, 2006, 39, 6622-6630)。但如果降低温度至足以消除所有链转移, 则可能要花数周来达到反应的完成, 因此这样的反应在工业上是不可行的。本公开下面描述的方法是工业上可行的。我们已观察到, 在增长完成或接近完成后继续加热将引起消除-二聚的产生。本公开已惊人地发现, 通过比现有技术方法中早得多地且在更低温度下终止聚合, POZ 衍生物的质量大大改进。此外, 增长反应的持续时间为单体完全或基本完全(高于或等于 90%)消耗所需的最短时间。应指出, 增长反应的温度和持续时间是相互关联的。换句话说, 可使用较高的增长温度和较短的增长反应时间。相反, 如果使用较长的增长反应时间, 则应相应降低温度。

也已发现, 溶剂(如但不限于氯苯)的使用比对于 POZ 产物的工业大规模

制备来说关键性的常用乙腈溶剂提供更快的聚合。虽然现有技术已认识到以氯苯作溶剂，但尚未认识到对反应速率的改进。使用氯苯作溶剂提供更快的反应时间这一出乎意料的结果使聚合反应可较早地在较高温度下终止，而不增加高 MW 二聚体产物的形成。这样的改进是本领域中未认识到的。

此外，POZ 产物、特别是用 OH 基团终止的那些，通过阳离子交换树脂的过滤改善 PD 值。据认为这样的过滤将除去低-MW 和高-MW 产物。对于较高分子量的 POZ 产物(例如 10,000 Da 及以上的那些产物)，过滤的效果尤其显著；但过滤为 POZ 衍生物提供的好处与 MW 无关。给出该改进的一个实例，未经过滤的 M-PEOZ-OH 10,000 (通过本公开的方法制备)显示出 Mn 为 7950 Da、PD 为 1.21 (GPC)，具有显著的低-MW 尾。该产物通过羧乙基-琼脂糖凝胶过滤后得到的 Mn 为 9180 Da、PD 为 1.05 (根据 GPC)，以及 Mn 为 9780、PD 为 1.01(根据 MALDI)，且没有可观察到的低-MW 尾，而有微不足道的 2%的高-MW 肩(根据 GPC 测定)。粗产物未呈现出高-MW 肩的事实表明，阳离子交换过滤既除去了低-MW 杂质也除去了高-MW 杂质。

此外，在某些情况下，如果 POZ 产物包含羧酸作为端基，则可使用阴离子交换色谱来分离所需的产物和除去所形成的任何高分子量产物。我们已对 M-PEOZ-S-CH₂CH₂-CO₂H 进行了该实验。值得一提的是，该色谱实验表明高-MW 二聚体是中性的。因此，主要的二聚产物必定为图 3 的链烯。在该实验中，粗产物的 Mn 为 9600 Da，PD 为 1.09 (GPC)，并有 6%的高-MW 肩。在 DEAE-琼脂糖凝胶上的阴离子交换色谱后，Mn 为 9500 Da，PD 为 1.06 (GPC)，且无高-MW 肩。

在另一实施方案中，终止反应在低温(在一个实施方案中，低于 80℃；在一个可替选的实施方案中，15-40℃)下用比作为碱更好的亲核试剂的亲核试剂进行；示例性的亲核试剂包括但不限于软亲核试剂，如硫醇盐。本申请人已发现，醇钠化合物作为终止剂的使用不产生所需的产物；而是保留未终止的阳离子。但硫醇钠和相关化合物(如但不限于 NaS-CH₂CH₂-CO₂Et)的使用产生高效的终止并得到具有所需性质(如但不限于低 PD 值)的 POZ 产物。阴离子交换色谱

后, 该酯水解成为羧酸而产生具有低PD值和无高-MW肩的高质量POZ产物。在一个这样的实例中, M-PEOZ-S-CH₂CH₂-CO₂H的Mn为9600 Da、PD为1.09 (GPC)并有6%的肩。在DEAE-琼脂糖凝胶上的阴离子交换色谱得到Mn为9500、PD为1.06 (GPC)、且无肩。

合成中的这些新的改进被用在本文中所述POZ聚合物和衍生物的制备中。本领域普通技术人员能够明白, 合成中的这些改进可以各种组合使用; 前述内容不应理解为需要在给定的合成中使用各个所述改进。

使用两种现有技术方法合成M-PEOZ-OH 2000。这些POZ衍生物的合成的描述在实施例1 (对于图2A)和实施例2 (对于图2B)中给出。分析所产生的POZ衍生物。对于图2A的POZ衍生物, GPC呈现出具有可感知的高-MW肩(Mn=3600 Da, 9%)的单个峰。主峰的Mn为1980 Da, PD为1.08。NMR呈现出预期的峰(参见实施例6)。MALDI-TOF MS呈现出一组最大值在2000 Da、PD 1.04和分离99.1 Da的峰。MALDI谱也呈现出具有分离99.1 Da的第二组峰, 但各峰比主要的那组低14 Da。这组峰的最大值发生在1600 Da。对于图2B的POZ衍生物, GPC呈现出具有可感知的高-MW肩(Mn=3300 Da, 6%)的单个峰。主峰的Mn为2200 Da, PD为1.06。NMR呈现出预期的峰(参见实施例6)。MALDI-TOF MS呈现出一组最大值在2300 Da和分离99.1 Da的峰。MALDI谱也呈现出具有分离99.1 Da的第二组峰, 但各峰比主要的那组低14 Da。这组峰的最大值发生在2100 Da。

使用本公开的方法合成用于比较的两种POZ衍生物M-PEOZ-OH 2000 (图4A)和M-PEOZ-OH 5000 (图4B)。这些POZ衍生物的合成的描述在实施例6 (对于图3A)和实施例7 (对于图4B)中给出。图4A和图4B中给出了GPC色谱。图4A和图4B示出了用本公开的合成方法获得的M-PEOZ-OH 2000和5000的有很大改进的GPC。对于M-PEOZ 2000, 反应条件为: (a)三氟甲磺酸甲酯引发, 在氯苯中于110℃增长1.5小时, 以及在室温下用碳酸盐水溶液终止。观察到M-PEOZ 2000衍生物的Mn为1900 Da (根据MALDI和GPC)、PD为1.07 (GPC)和1.03 (MALDI)、且无高-MW肩也无低-MW尾。对于M-PEOZ-OH 5000, 反

应条件为：(a)三氟甲磺酸甲酯引发，在氯苯中于 42℃增长 1 小时，然后于 80℃增长 3.75 小时，以及在室温下用碳酸盐水溶液终止。观察到 M-PEOZ 5000 衍生物的 Mn 为 4900 Da (根据 MALDI)、PD 为 1.06 (GPC)和 1.02 (MALDI)、有非常轻微的高-MW 肩(1%)、无低-MW 尾。在类似条件下制得的 M-PEOZ-OH 10,000 的 Mn 为 9780 Da (MALDI)、PD 为 1.01 (MALDI)和 1.05 (GPC)，有 2%的非常轻微的高-MW 肩。

总之，本公开的申请人已弄清了当使用现有技术的合成方法时发生的不希望的副反应的性质，从而使本申请人确定最大限度地减少这类副反应的影响的反应条件。因此，本公开的方法可制备出比现有技术中可得到的那些具有更优异的性质的 POZ 聚合物和衍生物。在一个实施方案中，本公开的方法可制备出具有低 PD 值的 POZ 聚合物和衍生物；在一个特别的实施方案中，本公开的方法可制备出在高 MW 值下具有低 PD 值的 POZ 聚合物和衍生物。此外，本公开的方法可以适于大规模生产的方式生产前述 POZ 聚合物和衍生物。具有这类特征的这类 POZ 聚合物和衍生物及其生产方法是本领域中缺乏的。

在一个实施方案中，本公开的方法通过提供完全或部分地减少 POZ 合成的引发、聚合或终止过程中发生的一种或多种副反应而在 POZ 聚合物合成中提供这样的好处。在一个特别的实施方案中，所述副反应为链转移过程。这类不希望的副反应（如但不限于链转移过程）是制备 POZ 产物的现有技术程序中存在的问题。这样的副反应使 POZ 衍生物具有不希望的特征，如高 PD 值。

合成单官能 POZ 衍生物的方法

本公开提供了合成所述单官能 POZ 衍生物的新方法。该新的合成方法在本文中通常称为构建单元法 (building block method)。在构建单元法的一个实施方案中公开了一步合成法。在构建单元法的一个可替选的实施方案中公开了两步法。在构建单元法的另一可替选的实施方案中描述了活性聚合物合成。每种方法均将在下面更详细地描述。

构建单元一步法

在构建单元法的第一个实施方案中公开了一步法。在一步法中，通过单个

末端官能化的 POZ 分子与含所需活性基团的一组化合物间的反应在单个步骤中生成一系列单官能 POZ 衍生物。这样, 单个末端官能化的 POZ 分子可被转化为一系类活化的单官能 POZ 衍生物。该方法意味着仅需要优化制备单个单官能 POZ 衍生物的聚合化学。POZ 端基(下面的 Y)经仔细选取以使这一系列反应可提供一系类活性基团。所述一步法的一般形式可由如下图式 1 代表:



图式 1

其中,

POZ 为 $-\text{[N(COR}_7\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{]}_n-$;

各重复单元的 R_7 独立地选自未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基, 在一个实施方案中含 1-12 个碳;

R_1 为氢或未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基集合;

R_2 - R_4 、 R_{11} 和 R_{14} - R_{15} 各自独立地选自氢或未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基集合, 在一个实施方案中含 1-10 个碳;

R_8 为 $-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{-CH}_2-$ (环己亚甲基);

R_{23} 为未取代的或取代的烷基、烯基、炔基或芳烷基集合(在一个实施方案中含 1-10 个碳原子)、或为取代的或未取代的芳基;

Y 为 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{S-(CH}_2\text{)}_k\text{-CO}_2\text{H}$ 、哌嗪基、取代哌嗪基、取代哌啶基、或 $-\text{NHR}_2$;

P 为连接基团; P 可为任何能形成图式 1 中所示的连接基团并可根据与其形成连接的基团的化学性质来选择; 代表性的 P 基团包括但不限于 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}_{11}-$ 、或未取代的杂环基 (如但不限于哌嗪基($\text{NC}_4\text{H}_8\text{N}$));

Q 为连接基团; Q 可为任何能形成图式 1 中所示的连接基团并可根据与其形成连接的基团的化学性质来选择; 代表性的 Q 基团包括但不限于未取代的或取代的烷基、烯基、杂环基或芳基、 $-(\text{CH}_2)_m\text{-CONH-(CH}_2)_m-$ 、 $-\text{NH-(CH}_2)_m\text{-NHCO-(CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CO-(CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CO-C}_6\text{H}_4-$ 、或 $-\text{CO-R}_8$ 、 $-(\text{R}_{15})_m-$ 或 $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_m$;

n 为 3-1000 的整数;

k 和 m 为独立地选自 1-10 的整数;

p 和 q 为独立地选自 0 或 1 的整数;

X 为能与靶分子形成连接而产生水解稳定的靶分子-POZ 偶联物的活性官能团。

在一个实施方案中,所述活性官能团选自如下大类的化合物:醛(-CHO)、活性碳酸盐(-O-CO-Z)、马来酰亚胺、磺酸酯(-OSO₂-R₂₃)(包括但不限于三氟乙基磺酸酯(2,2,2-三氟乙基磺酸酯)和甲磺酸酯(-O-SO₂-CH₃ 或 -OMs))、酰肼(-CONHNH₂)、环氧化物、碘乙酰胺、炔、叠氮化物(-N₃)、异氰酸盐(-OCN)、氰酸盐(-NCO)、异硫氰酸盐(-SCN)、硫氰酸盐(-NCS)、腈(-CN)、羰基二咪唑衍生物、乙烯基砜、羧酰卤、活性酯(-CO-Z)和羧酸(-CO₂-H); 以及

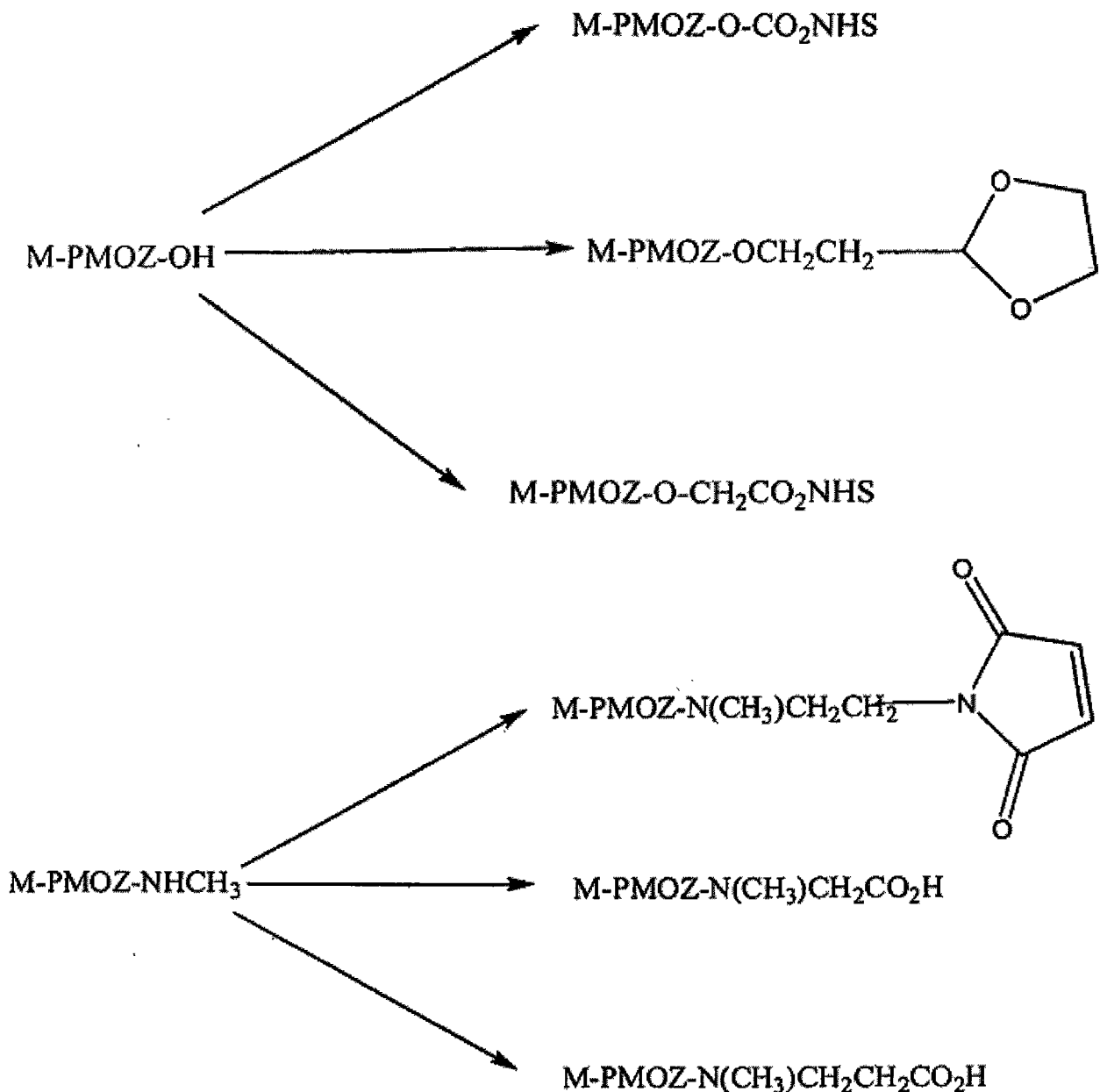
Z 为活化基团,本领域内熟知的活性基团有很多,包括 N-琥珀酰亚胺氧基、氯、溴、磺基-N-琥珀酰亚胺氧基、对硝基苯氧基、1-咪唑基和 1-苯并三唑氧基;

活性官能团也可通过本领域中熟知的方法保护起来而产生被保护的活性官能团。例如,缩醛[CH(OR₁₄)₂]为示例性的保护基,其可水解产生醛基。活性官能团可被基团(如但不限于关于取代的烷基及取代的和未取代的烷基、烯基、炔基、芳烷基或杂环基烷基所描述的那些基团)所取代。此外,活性官能团包括可转化为活性官能团的那些化合物。例如,X 基团可包括被在某些反应条件下可被水解的连接改性的化合物(如用来连接 POZ 衍生物与靶分子的那些),从而断开连接而暴露活性官能团以与靶分子上的基团反应。

在图式 1 中,反应物 R₁-POZ-Y 为 POZ 聚合的直接产物,Y 基团能直接转化为一系类能形成水解稳定的靶分子-POZ 偶联物的单官能 POZ 衍生物。例如,在一个实施方案中,Y 等于-OH 且当 POZ 聚合反应由氢氧化物终止时获得。在一个可替选的实施方案中,Y 等于-NHR₂ 且当 POZ 聚合反应由含氨基的化合物 R₂NH₂ 终止时获得。提供可用的 Y 基团的其他可用的胺终止剂有哌嗪或取代的哌嗪,如 1-哌嗪丙醇(H-NC₄H₈N-CH₂CH₂CH₂-OH)。取代的哌啶也可用,因为它们提供胺通常提供的快速终止,且它们也引入一系列官能团。市场上可获得的取代的哌啶包括 4-哌啶丁酸、3-哌啶羧酸和 4-哌啶甲醇。在一个可替选的实施方案中,Y 等于-S-CH₂CH₂-CO₂H 且当 POZ 聚合反应由 S-CH₂CH₂-CO₂-CH₃ 终止

(随后不经分离即水解)时获得。

下面示出了说明经由 R_1 -POZ-X 衍生物的一步法的制备的各种示例性反应。在下面给出的反应中, R_1 和 R_7 为甲基, Y 为 -OH 或 -NHR₂, 其中 R_2 为 CH₃。



可以看出上面的结构落在图式 1 的描述内。例如, 对于上面的活性碳酸盐 ($M\text{-PMOZ-OCO}_2\text{-NHS}$), R_1 和 R_7 为甲基, p 和 q 为 0, 以及 X 为琥珀酰亚胺基碳酸酯。对于上面的活性酯 ($M\text{-PMOZ-O-CH}_2\text{-CO}_2\text{NHS}$), R_1 和 R_7 为甲基, P 为 -O-, p 为 1, Q 为 -CH₂-, q 为 1, 以及 X 为 -CO₂NHS。

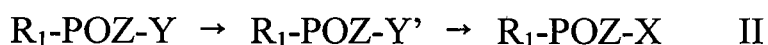
含上述活性基团的单官能 POZ 衍生物提供若干有用而不同的性质, 从而可根据靶分子的性质和所需的反应条件选择具有所需活性官能团的特定单官能

POZ 衍生物。例如，当活性官能团为醛时，单官能 POZ 衍生物在限定的 pH 范围内主要与靶分子的 N-端胺反应以形成亚胺(其通常被氢硼化物还原为仲胺)。当活性官能团为活性酯时，单官能 POZ 衍生物主要与胺(包括但不限于靶分子上的非末端赖氨酸基团)反应。同样，当活性官能团为活性碳酸盐或三氟乙基磺酸酯时，单官能 POZ 衍生物易于与胺反应，但反应条件和选择性不同于活性酯和醛。此外，当活性官能团为乙烯基砜或马来酰亚胺时，单官能 POZ 衍生物主要与硫醇反应，但反应条件随各个基团而不同，从而提供了一系列适合于一系列靶分子的反应条件。

重要的是，用上面的合成图式形成的各个单官能 POZ 衍生物能形成水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。

构造单元两步法

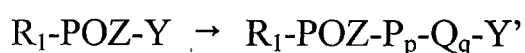
在一个可替换的实施方案中公开了两步合成法。在两步法的第一步中，通过如上所述的聚合制得的起始聚合物产物(下面的 R_1 -POZ-Y)与所需的化合物反应产生 POZ 中间体(下面的 R_1 -POZ-Y')。在两步法的第二步中，该 POZ 中间体再与一系列包含一系列活性官能团的化合物反应形成一系列能形成水解稳定的靶分子-POZ 偶联物的单官能 POZ 衍生物(下面的 R_1 -POZ-X)。该两步合成法具有仅用两个反应并从单个起始聚合物产物(R_1 -POZ-Y)开始提供一系列单官能 POZ 衍生物的优势，从而最大限度地减少针对多个聚合物产物优化聚合条件的需要。该两步法提供用一步法不能得到的单官能 POZ 衍生物。构造单元两步法的转化的最一般形式在下面的图式 2 中示出。



图式 2

构造单元两步法可以图式 3 中的如下详细形式示出。在图式 3 中，Y'为能与 T 基团所代表的功能性亲核试剂反应的活性基团，包括但不限于活性酯和活性碳酸盐。

步骤 1



步骤 2



图式 3

其中，

$R_1\text{-}R_4$ 、 R_7 、 R_8 、 R_{11} 、 $R_{14}\text{-}R_{15}$ 、 R_{23} 、POZ、P、Q、k、m、n、p、q、Y 和 X 同如上所述；

U 为连接基团；U 可为任何能形成图式 3 中所示的连接基团并可根据与其形成连接的基团的化学性质来选择；代表性的 U 基团包括但不限于 $\text{-(R}_{16}\text{)}_o\text{-}$ 、 $\text{-(CR}_5\text{R}_6\text{)}_o\text{-}$ 、 $\text{-NH-R}_{21}\text{-NHCO-R}_{22}\text{-}$ ；

o 为一到十的整数；

w 和 u 为独立地选自 1 或 0 的整数；

R_5 、 R_6 、 R_{16} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自独立地选自氢或未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基，在一个实施方案中含 1-10 个碳原子；

R_{17} 选自氢或未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基集合(在一个实施方案中含 1-10 个碳原子)、或取代的或未取代的芳基。

Y' 和 T 为反应形成水解稳定的连接 W 的反应性对，其中 Y' 和 T 反应性对和所得 W 连接选自表 1 中所示的那些基团和连接。 Y' 和 T 基团可反过来而不影响 W 连接的性质。

表 1 – 一些可能的 T-Y'对和所得 W 连接		
T 基团	Y'基团	W 连接
-NH ₂	任何活性碳酸盐(如但不限于 -O-CO-O-Z)	氨酯(-NH-CO-O-)
-OH	异氰酸盐(-NCO)	氨酯(-NH-CO-O-)
-NH ₂	任何活性酯或酰卤(如但不限于 -CO-O-Z、-CO-Cl 和 -CO-Br)	酰胺(-NH-CO-)
-NH ₂	NCO	脲(-NH-CO-NH-)
-NCS	-NH ₂	硫脲(-NH-CS-NH-)
卤化物-Cl 或 -Br	-OH	醚(-O-)
-OH	-OSO ₂ -R ₁₇	醚(-O-)
卤化物	-SH	硫醚(-S-)

O-SO ₂ -R ₁₇	-SH	硫醚(-S-)
卤化物	-NH ₂	胺(-NH-)
O-SO ₂ -R ₁₇	-NH ₂	胺(-NH-)
-SH	-NCO	-S-CO-NH-
-SH	-OSO ₂ -R ₁₇	硫醚(-S-)

下面示出了说明水解稳定的 R₁-POZ-P_p-Q_q-W_w-U_u-X 衍生物的制备的示例性反应。在该反应中, R₁ 为氢, R₇ 为甲基, Y 为 -OH, p 和 q 为 0, U 为 -CH₂CH₂-, u 为 1, 反应性对 T 和 Y' 分别为 -NH₂ 和 -O-CO₂-NHS, 它们形成氨酯 W 连接, w 为 1, 以及 X 为缩醛(被保护的醛):



其在水解后产生 H-PMOZ-OCONH-CH₂CH₂-CHO。

下面示出了图式 3 的另一实例。在该反应中, R₁ 和 R₇ 为甲基, Y 为 -OH, P 为 -O-, p 为 1, Q 为 -CH₂CH₂-, q 为 1, 反应性对 T 和 Y' 分别为 -NH₂ 和 -CO₂H, 它们形成酰胺 (-CONH) W 连接, w 为 1, U 为 -CH₂CH₂-, u 为 1, X 为缩醛(被保护的醛):



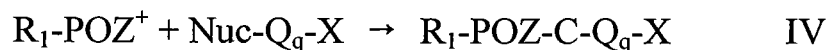
其在水解后产生 M-PMOZ-O-CH₂CH₂-CONH-CH₂CH₂-CHO。

如上面所讨论的, 图式 3 的各活性官能团在与靶分子的反应中具有独特的优势和特殊性。此外, T 和 Y' 基团与彼此的反应性可通过 Q 和 U 基团的性质控制。通过如所述地增大 Q 和 U 基团的尺寸来增大 T 和 Y' 和/或 T 和 X 基团间的化学距离, 改变 Y' 和 T 基团的反应性。此外, 活性官能团 X 与靶分子的反应性可类似地调节。

与一步法一样, 用上面的两步合成图式形成的各单官能 POZ 衍生物能形成水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。

活性聚合物方法

在本发明的另一可替代的实施方案中，可使用小的活性分子来终止噁唑啉聚合以直接提供单官能 POZ 衍生物，其可与靶分子反应形成水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。该方法被称为活性聚合物方法。活性聚合物方法的最一般形式可由如下图式 4 表示：



图式 4

其中，

R_1 - R_4 、 R_7 、 R_8 和 R_{14} - R_{15} 、 R_{23} 、POZ、Q、k、m、n、q、Y 和 X 同如上所述；

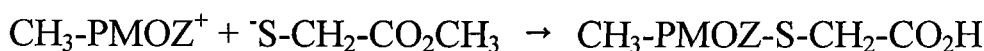
POZ⁺ 代表噁唑啉聚合过程中形成的阳离子-[N(COR₇)CH₂CH₂]_n⁺；

R_{19} 选自氢或未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基集合，在一个实施方案中含 1-10 个碳原子；以及

Nuc 为能通过末端阳离子-N(COR₇)CH₂CH₂⁺相互作用终止活性 POZ 聚合反应而形成水解稳定的连接 C 的亲核试剂，其中 Nuc 基团和所得 C 连接可选自表 2 中所示的那些基团和连接。

表 2 – 一些可能的 Nuc 基团和 C 连接	
Nuc 基团	C 连接
-NHR ₁₉	胺(-NR ₁₉ -)
-SH	硫醚(-S-)
-NH ₂	胺(-NH-)
哌嗪	部分环结构
哌啶	部分环结构

下面给出了说明 R_1 -POZ-C-Q_q-X 衍生物的制备的示例性反应。在下面所示的反应中， R_1 和 R_7 为甲基，Nuc 为 -NH₂，C 为 -NH-，Q 为 -CH₂-，q 为 1，以及 X 为 -CO₂H (注：甲酯在下面的反应过程中水解)：



与本领域中的意见相反，本公开表明，醇盐（如 -O-CH₂-CO₂-CH₃）捕获阳离子不产生所需的产物。

如表 2 中所提及的, 当使用哌嗪和哌啶作为 Nuc 基团时, C 连接将结合进哌嗪和哌啶环结构中。下面提供了用哌嗪和哌啶作为 Nuc 基团所得到的 C 连接及结构的实例。

在该反应的一个实施方案中, 硫醇盐化合物被用来终止噁唑啉聚合。在该方法中, 噁唑啉聚合如本文中所述被引发以形成在 POZ 聚合物的终止端处具有噁唑啉盐阳离子的 POZ 聚合物。通过向反应中加入亲核硫醇盐分子来终止该反应, 从而终止活性 POZ 聚合。硫醇盐分子包含能与靶分子上的基团反应而形成水解稳定的连接的活性官能团(该活性官能团可如本文中所述被保护起来)。

在该方法的一个具体实施方案中, 硫醇盐具有结构 $R_{25}S-D_d-X$, 其中:

X 的定义同上;

R_{25} 为金属; 在一个实施方案中, R_{25} 为 Li、Na 或 K;

D 为连接基团, 包括但不限于未取代的或取代的烷基、烯基、杂环基或芳基、 $-(CH_2)_b-CONH-(CH_2)_b-$ 、 $-NH-(CH_2)_b-NHCO-(CH_2)_b-$ 、 $-CO-(CH_2)_b-$ 、 $-CO-C_6H_4-$ 、或 $-CO-R_{26}$ 或 $-(CR_{27}R_{28})_b$;

R_{27} 和 R_{28} 各自独立地选自氢或未取代的或取代的烷基、烯基或芳烷基集合, 在一个实施方案中含 1-10 个碳;

R_{26} 为 $-C_6H_{10}-CH_2-$ (环己亚甲基);

d 为 0 或 1; 以及

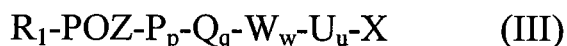
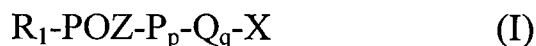
b 为 1-10 的整数。

在一个实施方案中, 活性官能团为被保护的官能团或可转化为活性官能团的化合物。如上面所讨论的, 各活性官能团在与靶分子的反应中具有独特的优势和特殊性。如同上述, 用上面的合成图式形成的各单官能 POZ 衍生物能形成水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。

特定的 POZ 衍生物

本公开描述了多种可通过上述方法制备的单官能 POZ 衍生物。此外, 本公开描述了许多可用于合成本公开的单官能 POZ 衍生物的化合物。

在一个实施方案中, 单官能 POZ 衍生物由通式(I)、(III)或(IV)描述:



其中通式(I)、(II)和(III)中的定义与上面关于图式 1-4 中所提供的相同。

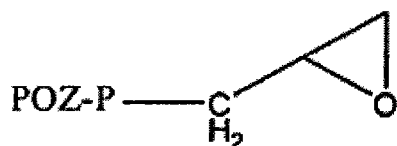
此外，下面提供了本公开的单官能 POZ 衍生物的若干具体结构。这些结构仅为示例的目的给出，而非意在限制本文中所述的单官能 POZ 衍生物的范围。同上，当在下面提及时，上面的图式 1-4 中给出的定义适用于下面的结构；下面的定义也适用于可应用的地方。此外，对于下面提供的所有结构， R_1 基团应理解为含在引发剂基团的位置处(POZ 基团的左侧)。

R_9 为连接部分，如 $-(R_{16})_0$ -或 $-\text{NH-R}_{21}-\text{NHCO-R}_{22}-$ ；

G 为未取代的或取代的芳基或取代的或未取代的烷基、烯基或炔基，如但不限于氟代烷基；以及

Ar 为未取代的芳基或取代的芳基。

在一个实施方案中，本公开提供了通过构造单元一步法制得的单官能 POZ 衍生物。源自该途径的示例性结构包括但不限于如下结构。

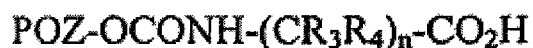
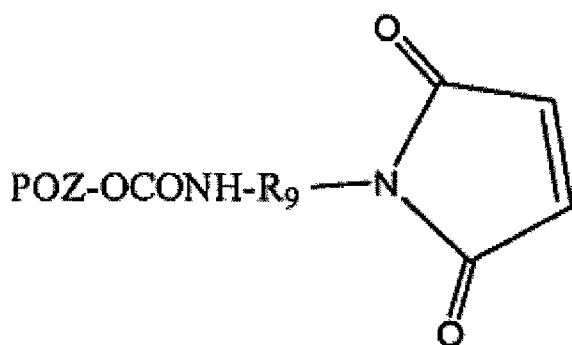




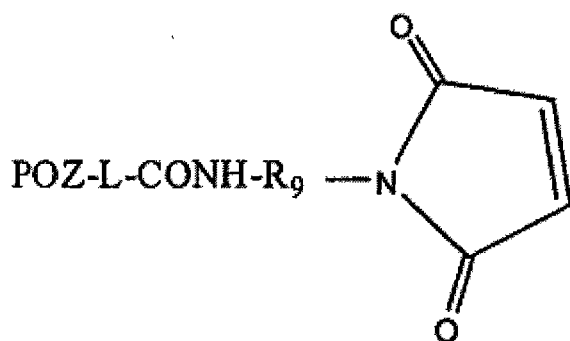
在另一实施方案中,本公开提供了通过构造单元两步法利用 POZ 磺酸酯(源自 POZ-OH 的中间体)上的亲核取代制得的单官能 POZ 衍生物:



在另一实施方案中,本公开提供了通过构造单元两步法利用 POZ 活性碳酸盐(源自 POZ-OH 的中间体)上的亲核取代制得的单官能 POZ 衍生物:



在另一实施方案中,本公开提供了通过任何上述活性酯上的亲核取代制得的结合了马来酰亚胺的单官能 POZ 衍生物:



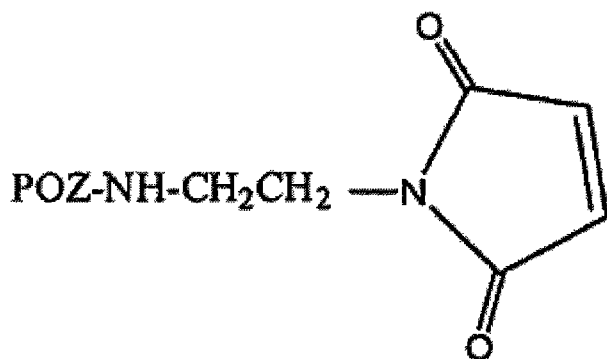
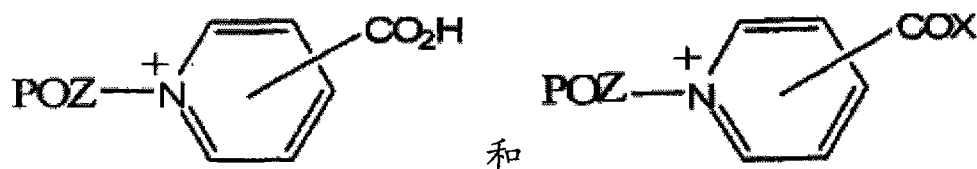
其中,

POZ-L-CO-源自任何本文中所述的活性羧酸酯; 以及

L 为任何上面所示的连接 POZ 与羧基的连接部分, 包括-P-(CR₃R₃)_m-、-P-Ar-、和吡啶盐-NC₅H₄⁺。

可以看出这些马来酰亚胺适合上面的 POZ-P_p-Q_q-W_w-U_u-X 式, 其中 L 包含 P_p-Q_q 段, -CONH-包含 W_w 段, 以及 R₉ 包含 U_u 段。

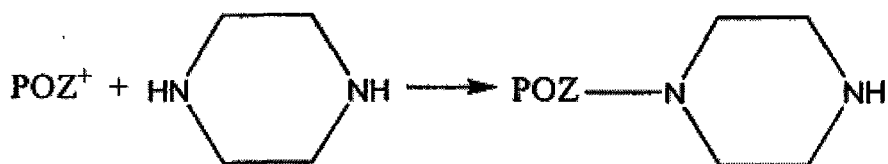
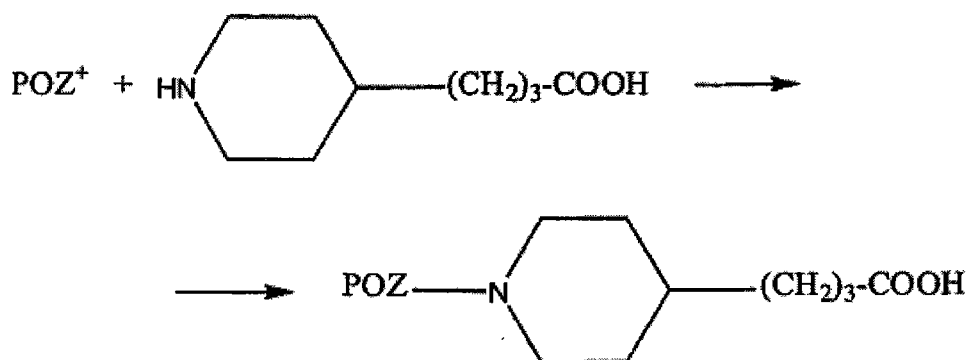
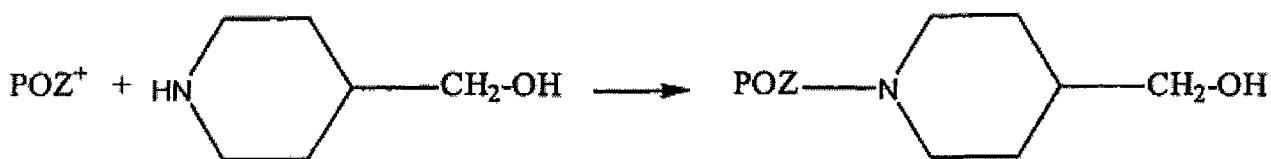
在另一实施方案中, 本公开提供了通过利用亲核攻击 2-烷基-2-噁唑啉的聚合过程中生成的 POZ 阳离子的活性阳离子方法制得的 POZ 衍生物:



所有上面的 POZ 衍生物与靶分子上的基团反应以在靶分子与 PO 衍生物间形成水解稳定的连接。

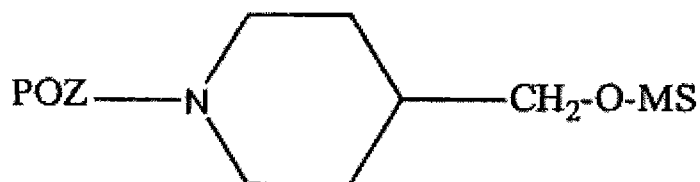
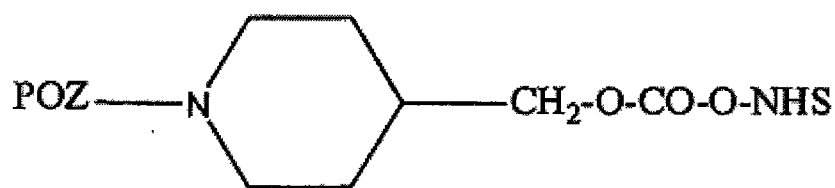
源自哌啶或哌嗪的特定 POZ 衍生物

如本文中所讨论的, 活性 POZ 阳离子可用取代的或未取代的哌啶或哌嗪或其衍生物终止。取代基包括但不限于关于取代的烷基及取代的和未取代的烷基、烯基、芳烷基或杂环基烷基所描述的那些基团。这些 POZ 衍生物难以用上面的图式 1-4 说明, 因为连接基团(图式 4 中指定的 C)是哌啶或哌嗪环结构的一部分。例如, POZ 阳离子可被 4-哌啶甲醇捕获而产生 POZ 醇, 被 4-哌啶丁酸捕获而产生 POZ 羧酸, 或被哌嗪本身捕获而产生 POZ 胺:

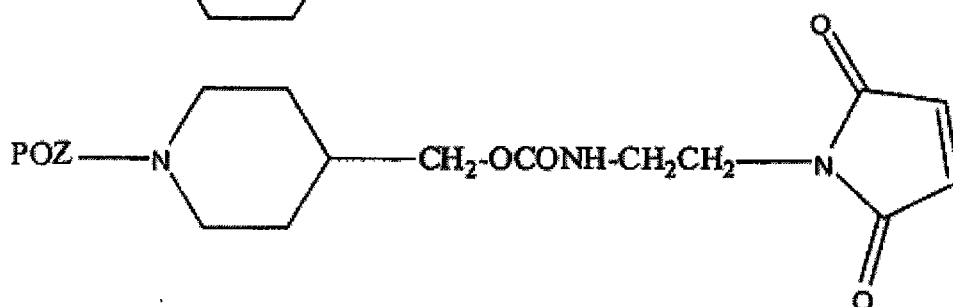
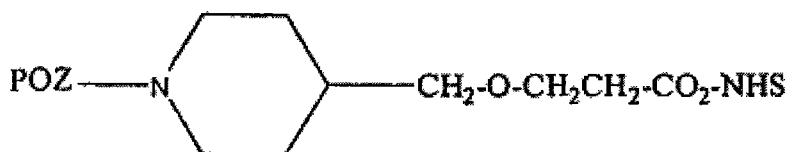
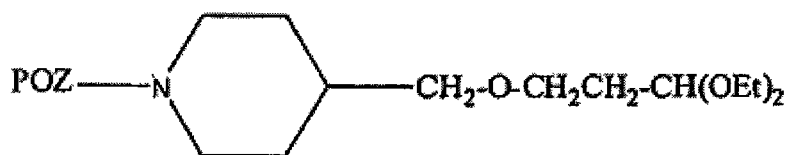


用这类哌啶和哌嗪的终止是有用的, 因为强氮亲核试剂赋予快速并完全的终止而引入末端活性官能团。市场上可获得的哌啶和哌嗪衍生物有至少四种, 包括 1-哌嗪丙醇、4-哌啶丁酸、3-哌啶羧酸和 4-哌啶甲醇, 其他的可容易地合成。

应理解, 任何上述自 POZ 醇、酸或胺制得的 POZ 衍生物也可自这类哌啶或哌嗪制备, 其中的含氮环提供醇、酸或胺。例如, 如下化合物可自上面的用 4-哌啶甲醇终止的 POZ 来制备:



这些化合物可再转化为一系列有用的衍生物，包括缩醛、马来酰亚胺和活性酯：



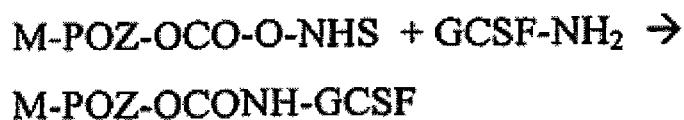
POZ 衍生物的使用

所述单官能 POZ 衍生物可用来通过活性官能团产生水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。此外，使用本文中所述的单官能 POZ 衍生物，一个靶分子被每个 POZ 衍生物结合。换句话说，各 POZ 衍生物上结合的靶分子不超过 1 个。单官能 POZ 衍生物中存在的活性官能团的多样性使单官能 POZ 衍生物可用多种反应化学与靶分子上的多种基团偶联。例如，当活性官能团为醛时，单官能 POZ 衍生物在限定的 pH 范围内主要与靶蛋白分子的 N-端胺反应。当活性官能团为活性酯时，单官能 POZ 衍生物主要与胺（包括但不限于靶分子上的赖氨酸基团）反应。同

样，当活性官能团为活性碳酸盐或三氟乙基磺酸酯时，单官能 POZ 衍生物与胺反应，但反应条件和选择性不同于活性酯和醛。此外，当活性官能团为乙烯基砜、马来酰亚胺或碘乙酰胺时，单官能 POZ 衍生物主要与硫醇反应，但反应条件随各个基团而不同，从而提供了一系列适合于一系列靶分子的反应条件。

重要的是，用上面的合成图式形成的各个单官能 POZ 衍生物均能形成水解稳定的靶分子-POZ 偶联物。

在一个实施方案中，靶分子为多肽，如但不限于蛋白质。例如，单官能 POZ 衍生物可与治疗学重要的蛋白质（如但不限于粒细胞集落刺激因子(GCSF)）偶联。该示例性的反应在下面通过如下反应示意性地说明：



在该实施方案中，GCSF 上所示的胺代表若干可利用的赖氨酸基团中的一种。

同样，GCSF 含可利用的硫醇基团，且在适当的条件下，含马来酰亚胺作为活性官能团的单官能 POZ 衍生物可与该硫醇基团反应。

活性 POZ 衍生物也可与肽偶联。例如，含活性酯作为活性官能团的单官能 POZ 衍生物可与胰岛素上可利用的氨基偶联：



在一个可替换的实施方案中，靶分子为小分子、药物或诊断剂。

靶分子-POZ 偶联物

如上所讨论的，本公开描述了多种能与靶分子形成连接而产生水解稳定的靶分子-POZ 偶联物的单官能 POZ 衍生物。在一般的实施方案中，本公开提供了具有通式(IV)的水解稳定的靶分子-POZ 偶联物：



其中，

A 为本文中所述的单官能 POZ 衍生物减去 POZ 衍生物上的活性官能团与靶分子上的结合对象的反应过程中消除的任何离去基团；

TM 为靶分子；以及

B 为本公开的单官能 POZ 衍生物的活性官能团与靶分子上的结合对象间形成的水解稳定的连接，应理解，水解稳定的 B 连接的性质将取决于单官能 POZ 衍生物上的活性官能团及靶分子上的结合对象的性质。示例性的活性官能团、结合对象和 B 连接在下表 3 中给出。表 3 中的列举不是详尽无遗漏的，根据本公开可想到其他组合和所得的 B 连接。

表 3		
活性官能团	靶分子上的结合对象	B 连接
三氟乙基磺酸酯	SH	硫醚(-S-)
马来酰亚胺	SH	硫醚(-S-)
活性碳酸盐	NH ₂	氨酯(-NH-CO-O-)
活性酯	NH ₂	酰胺(-NH-CO-)
醛	NH ₂ (胺)	胺(-NH-)

实施例

试剂

试剂购自 EM Science 或 Aldrich 并在用前蒸馏。氯苯和噁唑啉从氢化钙中馏出。凝胶渗透色谱(GPC)在具有 1100 四元泵和 RI 检测器的 Agilent Technologies 机器上进行。在柱加热器(60 °C)中串联地使用两个 Phenogel™ GPC 柱(Phenomenex, 5μ, 500Å, 300×7.8mm)。流动相为 100%的 N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)，流速为 1mL/min。校准曲线用据 MALDI 测得具有不同分子量(750, 1K, 2K, 5K 和 10K)的 M-PEOZ-OH 样品生成。凝胶过滤色谱(GFC)用使用 Shodex KW-803 柱的相同系统进行，以 pH 7.0 的 1mM HEPES 缓冲溶液作流动相。使用 UV 检测器对 228 nm 加以监测。MALDI-TOF MS 用 Bruker, Microflex™仪器使用葱三酚作为基质进行。NMR 在 Varian 500 MHz 仪器上进行。

实施例 1: M-PEOZ-OH 2000 的典型现有技术制备。

向 2-乙基-2-噁唑啉(2.02mL, 0.020mol)/乙腈(3.0mL, 6.7M)溶液中加入三氟甲磺酸甲酯(0.113mL, 0.001mol)，溶液搅拌 10 分钟。然后将反应加热至 80 °C 并搅拌 18 小时。加入碳酸钠(1.167g)和水(1mL)，并且所得混合物于 90 °C 加热整夜。

冷却至室温后,混合物用二氯甲烷(40mL)稀释,然后移入分液漏斗中。加入水(5mL)和盐水(3mL)并摇动。弃去底层,水层用二氯甲烷萃取两次(2×20 mL)。结合的有机层用硫酸镁干燥,过滤并通过旋转蒸发浓缩。将粗油溶解在丙酮中并通过逐滴加到二乙醚(80mL)中而沉淀。所得粉末经真空干燥(1.90g, 产率 94%)。

GPC 呈现出具有可感知的高-MW 肩的单个峰($M_n=3600$ Da, 9%) (图 2A)。主峰的 M_n 为 1980 Da, PD 为 1.1。NMR 呈现出预期的峰(参见实施例 6)。MALDI-TOF MS 呈现出一组最大值在 2000 Da、PD 1.04 和分离 99.1 Da 的峰。MALDI 谱也呈现出分离 99.1 Da 的第二组峰,但各峰比主要的那组低 14 Da。该组峰的最大值发生在 1600 Da。

实施例 2: M-PEOZ-OH 2000 的第二种现有技术制备。

将氯苯(6.9mL)、乙腈(2.3mL)和三氟甲磺酸甲酯(0.164mL, 1.5mmole)在氮气和环境温度下混合。然后在搅拌下缓慢加入 2-乙基-2-噁唑啉(3.05mL, 3.0g, 30mmole)。混合物被加热至 70℃并搅拌 8 小时。然后通过浸没在冰浴中将反应混合物冷却至室温。加入氢氧化钾(2mmol)/甲醇(1mL),混合物搅拌 1 小时。然后用二氯甲烷(40mL)萃取混合物。分离出二氯甲烷层并用水(总共 40mL)洗涤三次。有机层被干燥,过滤并通过旋转蒸发浓缩至 5mL。产物通过加到二乙醚(100mL)中沉淀并在真空下干燥(产量 0.7g)。

GPC 呈现出具有可感知的高-MW 肩的单个峰($M_n=3300$ Da, 6%) (图 2B)。主峰的 M_n 为 2200 Da, PD 为 1.07。NMR 呈现出预期的峰(参见实施例 6)。MALDI-TOF MS 呈现出一组最大值在 2300 Da 和分离 99.1 Da 的峰。MALDI 谱也呈现出分离 99.1 Da 的第二组峰,但各峰比主要的那组低 14 Da。该组峰的最大值发生在 2100 Da。

实施例 3: 乙基二异丙基胺对 M-PEOZ⁺终止的影响。

在室温下向 2-乙基-2-噁唑啉(1.01mL, 10.0mmol)/氯苯(5mL, 2M)溶液中加入三氟甲磺酸甲酯(0.0566mL, 0.5mmol),溶液搅拌 10 分钟。然后将溶液加热至 110

℃并搅拌 30 分钟。将溶液冷却至 0℃, 加入二异丙基乙基胺(0.261mL, 1.5mmol), 所得混合物于 50℃搅拌 18 小时。将混合物冷却至室温并逐滴加到二乙醚(50mL)中, 以得到白色沉淀。固体物于真空下以几乎为定量产率进行干燥。

GPC 呈现出两个峰, 一个在约 2000 Da 处(24%), 一个在约 3800 Da 处(76%)。MALDI 谱确认了高-和低-MW 产物的存在。

实施例 4: 2,6-二甲基吡啶对 M-PEOZ⁺终止的影响。

在室温下向 2-乙基-2-噁唑啉(0.758mL, 7.5mmol)/氯苯(3.75mL)溶液中加入三氟甲磺酸甲酯(0.0424mL, 0.375mmol), 溶液搅拌 10 分钟。然后将溶液加热至 110℃并搅拌 30 分钟。将溶液冷却至 0℃, 加入 2,6-二甲基吡啶(0.170mL, 1.5mmol), 所得混合物于 50℃搅拌 18 小时。将混合物冷却至室温并逐滴加到二乙醚(20mL)中, 得到白色沉淀。固体物于真空下以几乎为定量产率进行干燥。

GPC 呈现出两个峰, 一个在约 2000 Da 处(89%), 一个在约 4000 Da 处(11%), 这与某些二聚相一致。NMR 谱在 4.2 和 5.0 ppm 处呈现出峰, 这与未终止的噁唑啉盐阳离子的存在相一致。

实施例 5: 尝试用乙醇酸甲酯终止噁唑啉聚合。

在室温下向 2-乙基-2-噁唑啉(4.04mL, 0.040mol)/氯苯(5mL, 2M)溶液中加入三氟甲磺酸甲酯(0.453mL, 0.004mol), 溶液搅拌 10 分钟。然后将溶液加热至 110℃并搅拌 30 分钟。将溶液冷却至 0℃, 加入 2,6-二甲基吡啶(0.929mL, 0.008mol)和乙醇酸甲酯(0.609mL, 0.008mol), 所得混合物于室温下搅拌 18 小时。将混合物冷却至室温并逐滴加到二乙醚(1500 mL)中, 得到白色沉淀。固体物于真空下以几乎为定量产率进行干燥。

NMR 在 4.46 和 4.99ppm 处呈现出峰, 这与噁唑啉盐离子相一致, 并与乙醇酸酯未能终止聚合相一致。

实施例 6: 最适条件下 M-PEOZ-OH 2000 的制备。

将氯苯(30mL)和 MeOTf (344 μ L, 3.0mmol)在氮气下于室温混合并加到 2-Et-2-Ox (6.06mL, 60mmol)/氯苯(20mL)中。混合物搅拌 35 分钟,同时加热到 110 $^{\circ}$ C。接着将混合物冷却至 0 $^{\circ}$ C,然后加入碳酸钠(2.12g)/水(40mL)溶液并搅拌整夜。将混合物倒进分液漏斗中并加入 40mL 水。除去底层,水层用二氯甲烷萃取(3 $\times$ 60mL)。结合的有机层用硫酸镁干燥,过滤并通过旋转蒸发浓缩。将稠油状残余物溶解在 7mL 二氯甲烷中并于 0 $^{\circ}$ C 逐滴加到二乙醚(80mL)中。重复此沉淀作用,得到 4.2g 白色粉末(产率 84%)。

NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl₃) 在 1.12ppm (s, 3H, CH₃CH₂CO-), 2.31ppm (小 s) 和 2.41ppm (大 s) (总面积 2H, CH₃CH₂CO-), 及 3.47ppm (s, 4H, -NCH₂CH₂N-) 处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm (小) 和 3.05ppm (大) 处的两个单峰出现(CH₃-NCH₂CH₂)。末端亚甲基(-CH₂-OH)出现在 3.8ppm (s) 处。GPC 呈现出单个峰, 无高 MW 肩并无可感知的谱尾; Mn=1900 Da, 多分散性(PD)=1.03 (图 3A)。MALDI 谱的 Mn=1900 Da, 且有 99.1 Da 质量单位的分离。计算的 PD 为 1.03。

对硝基苯基碳酸酯衍生作用。将产物转化为对硝基苯基碳酸酯, 其然后经纯化并在 0.2N NaOH 溶液(pH 8)的存在下水解。对硝基苯酚的测定(400nm 处的 UV 吸收, $\epsilon=18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)表明-OH 取代度为 99%。

实施例 7: 最适条件下 M-PEOZ-OH 5000 的制备。

将氯苯(80mL)和 MeOTf (354 μ L, 3.2mmole)于室温在氮气下于 250mL 单颈圆底烧瓶中混合。搅拌的同时向烧瓶中缓慢加入 2-Et-2-Ox (16.4mL, 16.0g, 160mmol)。加入噁唑啉后混合物即变混浊。混合物于 42 $^{\circ}$ C 加热并搅拌一小时。随着加热混合物, 混合物变澄清。然后将混合物加热至 80 $^{\circ}$ C 并搅拌 3.75 小时。接着通过浸没在冰浴中 15 分钟而将混合物冷却至室温。

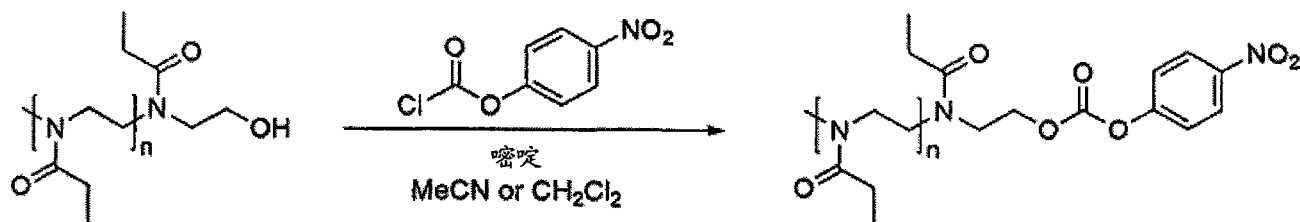
聚合通过加入 40mL 水和 2g 碳酸钠并然后搅拌 30 分钟被终止。分离出水层, 有机层被再次用 40mL 水和 1g 碳酸钠并然后搅拌 30 分钟来萃取。分离出水层并与第一水层合并, 合并得到的水溶液于室温下搅拌整夜。混浊的水层(~80mL)

然后用 0.5M HCl (~40mL)酸化直至 pH 低于 6 (pH 试纸), 并获得澄清溶液。

然后聚合物用二氯甲烷萃取 4 次(每次 200mL), 合并的有机层在搅拌的同时用无水硫酸镁干燥一小时。在真空下蒸发二氯甲烷溶液, 将所得残余物溶解在 25mL 干燥的二氯甲烷中并通过逐滴加到 250mL 乙醚(室温)中而沉淀。然后将所得白色固体物在真空炉中于 50℃干燥整夜。干燥得到白色粉末(14.1g, 产率 88%)。

NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl₃) 在 1.12ppm (s, 3H, CH₃CH₂CO-), 2.31ppm (小 s) 和 2.41ppm (大 s) (总面积 2H, CH₃CH₂CO-)、及 3.47ppm (s, 4H, -NCH₂CH₂N-) 处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm (小) 和 3.05ppm (大) 处的两个单峰出现(CH₃-NCH₂CH₂)。末端亚甲基(-CH₂-OH) 出现在 3.8ppm (s) 处。GPC 呈现出单个峰, 保留时间为 13.5 分钟。Mn=4100 Da, 多分散性(PD)=1.06。Mn (理论)=4980 Da。12.4 分钟处的小肩表明有约 1% 的高 MW 杂质; Mn=8900 Da (图 3B)。MALDI 谱的 Mn=4910 Da, 且有 99.1 Da 质量单位的分离。PD 为 1.02。对硝基苯基碳酸酯衍生作用。将产物转化为对硝基苯基碳酸酯, 其然后经纯化并在 0.2N NaOH 溶液(pH 8)的存在下水解。对硝基苯酚的测定(400nm 处的 UV 吸收, ε=18,000 M⁻¹ cm⁻¹)表明-OH 取代度为 99%。

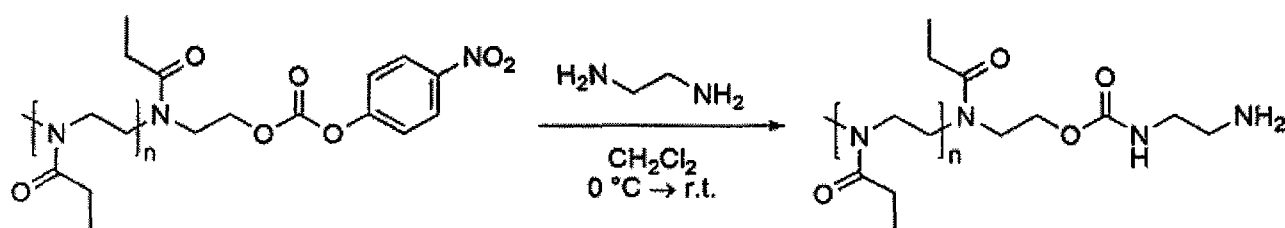
实施例 8: POZ 对硝基苯基碳酸酯的合成



用旋转蒸发浓缩 M-PEOZ-OH (10.0g, 1.0mmol)/乙腈(80mL)溶液。将残余物溶解在二氯甲烷(40mL)中并在 0℃下加入对硝基苯基氯甲酸酯(1.61g, 7.96mmol)。逐滴加入吡啶(0.80mL, 9.95mmol), 混合物于室温下搅拌三小时。用旋转蒸发浓缩混合物, 然后加到二乙醚中, 得到白色沉淀。轻轻倒出溶剂, 真空下干燥沉淀。将产物溶解在略酸性的水中, 搅拌 20 分钟并过滤。产物在二氯

甲烷中萃取并用硫酸镁干燥。通过旋转蒸发浓缩溶液并加到二乙醚中沉淀。轻轻倒出溶剂，产物在真空下干燥。产量 8.7g。NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl₃) 在 1.12ppm (s, 3H, CH₃CH₂CO-)、2.31ppm (小 m) 和 2.41ppm (大 s) (总面积 2H, CH₃CH₂CO-)、3.47ppm (s, 4H, -NCH₂CH₂N-)、7.38ppm (d, 2H, J=5.2Hz) 和 8.29ppm (d, 2H, J=5.2Hz) 处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm (小) 和 3.03ppm (大) 处的两个单峰出现(CH₃-NCH₂CH₂)。末端亚甲基(-CH₂-O-CO-)出现在 4.42ppm (s) 处。对硝基苯基碳酸酯取代。使产物在 0.2N NaOH 溶液的存在下水解。游离对硝基苯酚的测定(400nm 处的 UV 吸收, ε=17,000 M⁻¹ cm⁻¹) 表明 -OH 取代度为 100%。

实施例 9: M-PEOZ 胺的合成



将 M-PEOZ-PNPC (3.60g, 0.694mmol)/二氯甲烷(20mL)溶液冷却至 0℃ 并加入乙二胺(2.33mL, 34.7mmol)。溶液在冷态搅拌一小时, 然后于室温搅拌 18 小时。混合物用旋转蒸发浓缩, 通过加入正丁醇(20mL)稀释, 然后通过旋转蒸发除去醇(以共沸除去二胺)。将残余物溶解在二氯甲烷中并加到二乙醚中。轻轻倒出溶剂并将白色粉末溶解在二氯甲烷(100mL)中。溶液用 1N NaOH 溶液洗涤。水相用二氯甲烷洗涤两次(2×70mL), 合并有机层, 并用硫酸镁干燥。溶液被过滤、浓缩并加到乙醚中。轻轻倒出溶剂, 白色粉末在真空下干燥。

NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl₃) 在 1.12ppm (s, 3H, CH₃CH₂CO-)、2.31ppm (小 s) 和 2.41ppm (大 s) (总面积 2H, CH₃CH₂CO-) 和 3.47ppm (s, 4H, -NCH₂CH₂N-) 处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm (小) 和 3.05ppm (大) 处的两个单峰出现(CH₃-NCH₂CH₂)。末端亚甲基(-CH₂-OCO-NH-)出现在 4.2ppm (br s, 2H) 处, 与乙二胺有关的质子出现在 2.82ppm (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-NH₂) 和

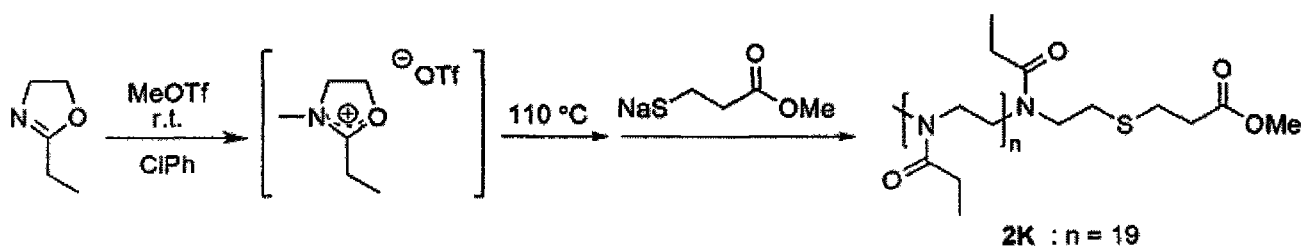
3.23ppm (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-NH₂)处。

实施例 10: POZ 琥珀酰亚胺基碳酸酯的合成

在 5mL 干燥的二氯甲烷或干燥的乙腈中制备 M-PEOZ-OH (0.5g, 0.23mmol) 的溶液并通过旋转蒸发浓缩。制备二琥珀酰亚胺基碳酸酯(0.24g, 0.9mmol)在 5mL 干燥的二氯甲烷或干燥的乙腈中的悬浮液。向该悬浮液中加入吡啶 (0.094mL, 1.16mmol)。向上面的悬浮液中逐滴加入 M-PEOZ-OH 溶液, 混合物于室温下搅拌整夜。混合物被过滤, 用旋转蒸发浓缩, 然后加到二乙醚中。轻轻倒出溶剂, 白色粉末在真空下干燥。将粉末溶解在干燥的丙酮中并通过加到二乙醚中沉淀。产量 0.6g。NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl₃) 在 1.12ppm (s, 3H, CH₃CH₂CO-), 2.31ppm (小 m) 和 2.41ppm (大 s) (总面积 2H, CH₃CH₂CO-), 3.47ppm (s, 4H, -NCH₂CH₂N-), 2.70ppm (s, 4H, SC 基团) 处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm (小) 和 3.03ppm (大) 处的两个单峰出现(CH₃-NCH₂CH₂)。末端亚甲基(-CH₂-O-CO-)出现在 4.24ppm (s) 处。

实施例 11: M-PEOZ-T-COOH 2000 的合成

a. 甲酯的合成



按如上所述在氯苯中制备 1mmol M-PEOZ⁺的溶液。将溶液冷却至室温。在 0℃ 下向 NaH (0.12g, 5mmol)/THF 悬浮液中逐滴加入 3-巯基丙酸甲酯(0.65mL, 6mmol)。然后将 M-PEOZ⁺溶液缓慢加到 THF 溶液中。使所得混合物升温至室温并搅拌整夜。反应混合物被过滤并加到醚中, 得到白色沉淀。轻轻倒出溶剂, 固体物在真空下干燥得到 1.5g 白色粉末。

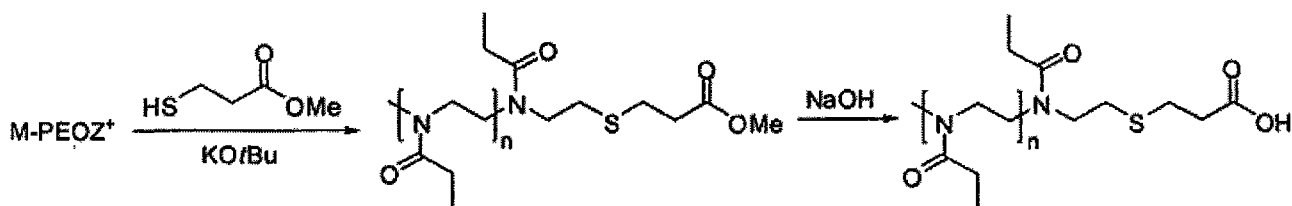
NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl₃) 在 1.12ppm (s, 3H, CH₃CH₂CO-),

2.31ppm (小 m)和 2.41ppm (大 s) (总面积 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$)、3.47ppm (s, 4H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$)处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm (小)和 3.03ppm (大)处的两个单峰出现($\text{CH}_3-\text{NCH}_2\text{CH}_2$)。末端亚甲基($-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$)出现在 2.64ppm (s)处, 其邻近的亚甲基($\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$)出现在 2.81ppm (s)处, 与硫基团相邻的亚甲基($-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$)出现在 2.71ppm (s)处。甲酯基团($-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$)在 3.71ppm 处以尖锐的单峰出现。

硫代酸的合成

制备上面的酯(8.1g, 0.004mol)在 20mL 甲醇中的溶液并与 30mL 0.05N NaOH 溶液(0.02mol)混合。混合物于室温下搅拌 40 分钟, 然后用 5%的 HCl 酸化。通过旋转蒸发除去甲醇, 溶液用二氯甲烷萃取。萃取物用硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩并加到醚中沉淀。轻轻倒出醚, 残余物在真空下干燥。NMR 谱表明 3.71ppm 处的甲酯峰消失。GPC 表明有 6%的高 MW 肩。主峰的 M_n 为 1870 Da, PD 为 1.15。上面的样品通过离子交换色谱用 DEAE 琼脂糖凝胶 FF 介质纯化。产物的 GPC 给出没有高-MW 肩的单个主峰, M_n 为 1970 Da, PD 为 1.08。MALDI 给出的 M_n 为 2090 Da, PD 为 1.04。

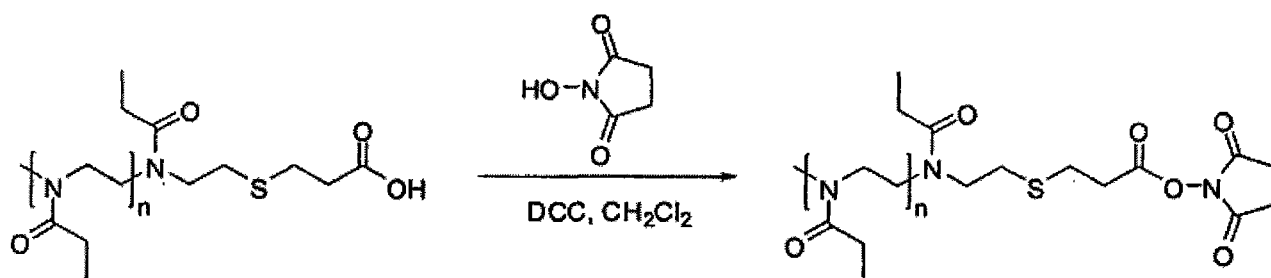
实施例 12: M-PEOZ-T-丙酸(M-PEOZ-T-PA) 1000 的合成



如上所述, 用 2-乙基-2-噁唑啉(5.05mL, 50mmol)和三氟甲磺酸甲酯(0.63mL, 5.56mmol)在氯苯(25mL)中制备 M-PEOZ^+ 。为获得终止试剂, 在 0°C 下向叔丁醇钾(1.25g, 11.1mmol)/氯苯(10mL)悬浮液中逐滴加入 3-巯基丙酸甲酯(2.41mL, 22.2mmol)。混合物在冷态搅拌 2 小时后, 逐滴加入 M-PEOZ^+ /氯苯溶液。混合物在冷态搅拌 4 小时, 然后于室温搅拌 18 小时。加入水(50mL)并通过加入 5%的 HCl 水溶液使混合物酸化(pH ~ 3)。用旋转蒸发除去挥发物(包括氯苯)。所得水溶液用 NaOH (1.33g, 33.3mmol) / H_2O (70mL)溶液处理。搅拌 1 小时后, 用 5%

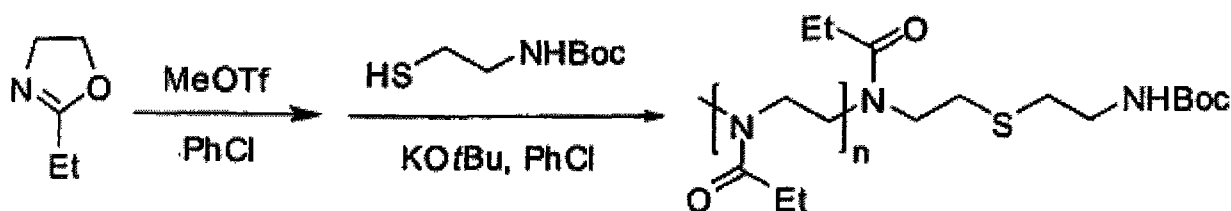
的 HCl 水溶液使混合物酸化, 然后用二氯甲烷萃取。合并的有机相用硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩并通过加到醚中沉淀。轻轻倒出醚, 残余物在真空下干燥。通过离子交换色谱用 DEAE 琼脂糖凝胶 FF 介质进行进一步的纯化。GPC 和 GFC 呈现出单个峰, M_n 为 910 Da, PD 为 1.02。MALDI 给出的 M_n 为 1100 Da, PD 为 1.05。

实施例 13: M-PEOZ-T-丙酸 NHS 酯(M-PEOZ-T-SPA)的合成



于 0°C 下向来自上面的制备的 M-PEOZ-T- CO_2H (M_n 910 Da, 2.0g, 2.20mmol)/二氯甲烷(44mL)的溶液中加入 N -羟基琥珀酰亚胺(0.467g, 2.26mmol)和 DCC (0.467g, 2.26mmol)。在冷态搅拌 2 小时后, 使混合物升温至室温并搅拌整夜。用针头过滤器过滤混合物并将滤液加到二乙醚中得到白色粉末。产物通过真空过滤收集并在真空下干燥(2.0g, 产率 89%)。琥珀酰亚胺基的连接得到 ^1H NMR 谱的证实, 该谱示出除普通的主链峰外还在 2.86ppm (s, 2H)处有琥珀酰亚胺基质子。为确定产率, 将化合物(M_n 计算值 1025 Da, 0.4g, 0.39mmol)在二氯甲烷(4mL)中用苯乙胺(0.15mL, 1.17mmol)和三乙胺(0.16mL, 1.17mmol)处理。搅拌整夜后, 混合物被过滤并加到二乙醚中。白色粉末被过滤并用真空干燥。根据凝胶渗透色谱, 转化产率为 99%。

实施例 14: 经由硫醇盐合成 M-PEOZ-硫代- NH_2



tBoc 酯的合成

向 2-乙基-2-噁唑啉(5.05mL, 0.05mol)/氯苯(25mL)溶液中加入三氟甲磺酸甲酯(0.283mL, 0.0025mol)。室温搅拌 10 分钟后将混合物加热至 110℃并保持 30 分钟,然后冷却至 0℃。为获得终止试剂,在 0℃下向叔丁醇钾(0.561g, 0.005mol)/氯苯(5mL)悬浮液中逐滴加入 Boc-半胱胺(0.84mL, 0.0075mol)。混合物在冷态搅拌 1 小时以得到澄清溶液后,在 0℃下用注射器逐滴加入 M-PEOZ⁺/氯苯溶液。混合物在冷态搅拌 4 小时,然后于室温搅拌 18 小时。将混合物缓慢加到二乙醚中,得到白色沉淀。轻轻倒出醚,将残余物溶解在水中,然后用二氯甲烷萃取。合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过加到醚中沉淀。过滤混合物,残余的白色粉末在真空下干燥得到 4.0g 目标化合物,产率为 87%。

NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl₃) 在 1.12ppm (s, 3H, **CH**₃**CH**₂**CO**-)、2.31ppm (s) 和 2.41ppm (s) (总面积 2H, **CH**₃**CH**₂**CO**-)、及 3.47ppm (s, 4H, -**NCH**₂**CH**₂**N**-)处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm 和 3.03ppm 处的两个单峰出现(**CH**₃-**NCH**₂**CH**₂)。Boc 半胱胺端基峰出现在 1.44ppm (s, 9H, -**CH**₂**NHBoc**)、2.67ppm (m, 2H, -**SCH**₂**CH**₂**NHBoc**)、2.71ppm (m, 2H, -**CH**₂**SCH**₂**CH**₂**NHBoc**)和 3.32ppm (m, 2H, -**SCH**₂**CH**₂**NHBoc**)处。根据 NMR 积分,粗混合物含约 8%的 M-PEOZ-OH 物类。GPC 产生 Mn=1790 Da、PD=1.07 的尖锐峰。

胺的合成

在 0℃及剧烈搅拌下将盐酸(二氧六环中的 4M 溶液, 34.0mL)加到含 M-PEOZ-T-NH(Boc) (Mn 1850 Da, 3.218g, 1.74mmol)的烧瓶中。使混合物升温至室温并搅拌 1 小时。通过旋转蒸发浓缩混合物并用水(50mL)稀释,调节 pH 至 ~13。所得水溶液用二氯甲烷萃取三次。合并的有机相用 Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,在醚中沉淀以得到白色粉末,过滤该白色粉末并在真空下干燥,得到 2.5g 产物。通过离子交换色谱用 CM 琼脂糖凝胶 FF 介质进行进一步纯化。通过柱纯化收集两个馏分。一个 0.2g 的馏分含纯胺聚合物,第二个 2.2g 的馏分含胺聚合物和 8%的从前一步骤带来的杂质(M-PEOZ-OH)。

^1H NMR (Varian, 500MHz, 10mg/mL CDCl_3) 在 1.14ppm (m, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$)、2.32ppm (m)和 2.41 (s) (总面积 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$)、及 3.47ppm (m, 4H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$)处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm 和 3.03ppm 处的两个单峰出现($\text{CH}_3-\text{NCH}_2\text{CH}_2$)。末端半胱氨基峰见于 2.69ppm (m, 4H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)和 2.91ppm (m, 2H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)处。Boc 基团的移除通过 1.44ppm (s, 9H, $-\text{CH}_2\text{NHBoc}$)处峰的消失得到证实。GPC 示出 Mn 值为 1700 Da, PDI 为 1.10。

实施例 15: M-PEOZ-T-SCM (M-PEOZ-S- CH_2 - CO_2 -NHS)的合成

酸的合成

在氩气下混合氯苯(100mL)与 2-乙基-2-噁唑啉(39.7g, 0.4mol, 50eq.)并于 0℃ 搅拌 30 分钟。搅拌下向烧瓶中加入三氟甲磺酸甲酯(1.31g, 1eq.)，继续在 0℃ 搅拌 30 分钟、在 25℃ 搅拌 30 分钟、在 42℃ 搅拌 1 小时、然后在 80℃ 搅拌 3.5 小时。使混合物冷却至室温。在单独的烧瓶中通过混合叔丁醇钾(2.25g, 5eq.)和 2-巯基乙酸甲酯(2.9g, 6eq.)及氯苯(100mL)并于 0℃ 搅拌 1 小时制备终止混合物。将聚合混合物加到终止混合物中并于室温搅拌整夜。混合物用二氯甲烷(50mL)稀释，过滤并加到二乙醚(750mL)中。轻轻倒出上清液，收集沉淀，在真空下干燥 1 小时。将粉末溶解在 100mL 0.1M NaOH 中并搅拌 4 小时。通过加入 25mL 0.5M HCl 使混合物酸化。水溶液用二氯甲烷萃取(150mL $\times$ 3 次)，用 MgSO_4 干燥，浓缩至 50mL，并在二乙醚(400mL)中沉淀。所得白色粉末在真空下干燥。

所得酸通过 DEAE 离子交换色谱纯化得到纯酸(如 GFC 色谱所示)。NMR 表明 1.30 和 4.19ppm 处酯的甲基和亚甲基峰已分别消失。

NHS 酯的合成

于 0℃ 下向含溶解在二氯甲烷 (60mL) 中的 M-PEOZ-T-CM (M-PEOZ-S- CH_2 - CO_2H , Mn 4970 Da, 6.0g, 1.21mmol)的溶液中加入 *N*-羟基琥珀酰亚胺(0.139g, 1.21mmol)和 DCC (0.249g, 1.21mmol)。在此温度搅拌 2 小时后，使该澄清的无色混合物升温至室温并搅拌整夜。含白色沉淀的混合物用针头过

滤器过滤。搅拌下将滤液加到二乙醚中，得到白色粉状沉淀。残余物用烧结玻璃漏斗收集并在真空下干燥，得到 5.2g 所需产物(产率 85%)。

^1H -NMR: 羧基琥珀酰亚胺的连接得到 ^1H NMR 谱的证实, 该谱表明除 PEOZ 的普通的主链峰外还在 2.87ppm (s, 4H)处有琥珀酰亚胺基质子。

为确定转化产率, 将该化合物(Mn 计算值 5070 Da, 0.100g, 0.0197mmol)在二氯甲烷(2mL)中用苯乙胺(0.012mL, 0.0987mmol)和三乙胺(0.014mL, 0.0987mmol)处理。搅拌整夜后, 混合物被过滤并加到二乙醚中。过滤白色粉末并用真空干燥, 得到定量产率的所需酰胺。根据 GFC, 转化产率为 95+%。

实施例 16: 硫代 NHS 酯的水解速率

硫代 NHS 酯 M-PEOZ-T-SCM 5K 和 M-PEOZ-T-SPA 5K 的反应性在 pH 8 的硼酸盐缓冲溶液中评价。精确称量的两种酯的样品, 置于 100mL 容量瓶中, 并溶解在 pH 8 的硼酸盐缓冲溶液(0.2M)中。先每 1 分钟、后每 10 分钟从各烧瓶中取等分试样并通过 UV-分光光度计于 260nm 的最大吸收波长(λ_{max})下分析。以吸光度值增加的速率对时间作图。从这些计算确定最大吸光度值的 50%时的速率。M-PEOZ-T-SCM 5K 和 M-PEOZ-T-SPA 5K 的 $t^{1/2}$ 计算值分别为<1 分钟和 15 分钟。

实施例 17: M-PEOZ-OCO₂-NHS 与 GCSF 的偶联

按如下所述使单官能衍生物 M-PEOZ-OCO₂-NHS 与靶分子(本实施例中为 GCSF)偶联。溶解在 1ml 0.2M 的硼酸钠缓冲溶液(pH 8.5)中的 4mg GCSF (0.215 μmol , MW=18.6 kDa)与每 GCSF 氨基(总共 5 个赖氨酸加 α -胺) 3 当量的 M-PEOZ-OCO₂-NHS 在室温下反应 60 分钟。在这些反应条件下, 单官能 POZ 衍生物与 GCSF 上的氨基间的反应主要发生在更裸露的亲核胺上。

GCSF 的修饰通过 RP-HPLC 采用 C18 Agilent 分析柱分析, 该柱平衡于 60% 的缓冲溶液 A (HPLC 级水, 含 0.05% 的 TFA)中并用 1% 的缓冲溶液 B/min (70% CH₃CN 和 0.05% TFA)的线性梯度以 1ml/min 的流速洗脱 30 分钟。洗脱的物质

通过 280nm 下的吸光度检测。GCSF-POZ 偶联物呈非对称峰被洗脱, 保留时间为 18.8 分钟, 其表明了 GCSF-POZ 偶联物在与 GCSF 分子偶联的 POZ 分子数方面的不均一性。氨基含量的 Habeeb 分析表明 70% 的蛋白质氨基不再是游离的。

若干偶联物的形成通过 SDS-PAGE 及通过尺寸排除 HPLC 确认。SDS-PAGE 实验用 Pharmacia Phast System 进行。微型凝胶(12%的聚丙烯酰胺)上施加恒定电压(200V), 并按 Laemmli 的方法制备。对于蛋白质染色, 将凝胶置于 Coomassie 蓝色溶液中, 而对于聚合物染色, 使用碘化钡溶液。聚合物染色基于碘化钡络合物的形成(Kurfust, M.M., 1992, *Analytical Biochemistry*, 200, 244-248)。SDS-PAGE 数据显示出若干条带, 表明获得了化学上不同的分子 GCSF 偶联物的混合物, 这样的偶联物包含一个、两个或三个 POZ 分子。

尺寸排除 HPLC 分析用 Biosep SEC S2000 分析柱进行, 该柱用 0.1M 磷酸钠、0.2M 氯化钠(pH 7.2)和 20% 乙腈的等强度流动相以 0.5ml/min 的流速洗脱。洗脱的物质通过 280nm 下的吸光度检测。色谱在 5.75min 处呈现出洗脱峰, 其对应着比天然蛋白质(洗脱峰在 9.00min 处)高的分子量, 表明形成了 GCSF-POZ 偶联物。

实施例 18: M-PEOZ-OCO₂-NHS 与核糖核酸酶 A 的偶联

按如下所述使单官能 POZ 衍生物 M-PEOZ-OCO₂-NHS 与靶分子(本实施例中为核糖核酸酶 A (RNase A))偶联。溶解在 1ml 0.2M 的硼酸钠缓冲溶液(pH 8.5)中的 5mg RNase A (0.36 μ mol, MW 13 kDa)与每 RNase A 氨基(总共 5 个赖氨酸加 α -胺)3 当量的 M-PEOZ-OCO₂-NHS 反应。反应在室温下进行 60 分钟。RNase A 修饰的程度通过 RP-HPLC 采用 C4 Agilent 分析柱分析, 该柱平衡于 80% 的缓冲溶液 A (HPLC 级水, 含 0.05% 的 TFA)中并用 1% 的缓冲溶液 B/min (90% CH₃CN 和 0.05% TFA)的线性梯度以 1ml/min 的流速洗脱 30 分钟。洗脱的物质通过 280nm 下的吸光度检测。色谱表明有少量(<10%)未被修饰的蛋白质。POZ-修饰蛋白质的峰很宽, 表明了 RNase A-POZ 偶联物在与 RNase A 分子偶联的 POZ 分子数方面的不均一性。氨基含量的 Habeeb 分析表明 RNase A 上 26% 的氨基被修饰。

若干偶联物的形成通过 SDS-PAGE 及通过尺寸排除 HPLC 确认。SDS-PAGE 实验用 Pharmacia Phast System 进行并按上面的实施例所述染色。同 GCSF 结果一样，SDS-PAGE 数据显示出若干条带，表明有若干不同的 RNase A-POZ 偶联物。尺寸排除 HPLC 分析用 Biosep SEC S2000 分析柱按上面的实施例所述进行。色谱较早出现宽峰，其对应着比天然蛋白质高的分子量，这与 RNase A-POZ 偶联物的形成相一致。

实施例 19: M-PEOZ-马来酰亚胺和邻二硫吡啶的制备

本实施例中自 M-PEOZ-NH₂ (见上)制备单官能 POZ 衍生物 M-PEOZ-马来酰亚胺。向 100mg (0.55mmol, 3eq) 4-马来酰亚胺丁酸中加入无水氯仿中的 126mg HOBT (1.09mmol)和 226mg DCC (1.09mmol)。3 小时后加入 16mg (0.00254mmol) M-PEOZ-NH₂。所得溶液在室温下保持整夜。反应混合物用 0.1N HCl 洗涤，干燥，并真空蒸发。加入乙醚，通过过滤收集沉淀并干燥。反应产率为 65%。

以同样的方式通过在氯仿中于室温下及三乙胺(3 eq.)存在下偶联琥珀酰亚胺丙酸二硫吡啶(SPDP) (3 倍过量)与 M-PEOZ-NH₂ 5 小时制备邻二硫吡啶(OPSS)试剂。最终产物在醚中沉淀获得，产率为 65%。

实施例 20: M-PEOZ-马来酰亚胺、M-PEOZ-OPSS、PEG-马来酰亚胺和 PEG-OPSS 与硫醇的反应的比较

为评价 M-PEOZ-马来酰亚胺和 M-PEOZ-OPSS 的反应性以及比较 M-PEOZ-马来酰亚胺和 M-PEOZ-OPSS 衍生物与它们的相应的 PEG 衍生物的反应性，将 PEOZ 和 PEG 聚合物偶联到含半胱氨酸的三肽谷胱甘肽上。与谷胱甘肽的反应用本领域中熟知的 Ellman's 分析监测。在 0.1M pH=7 的磷酸盐缓冲溶液(含 5mM EDTA)中制备 20mM PEOZ 或 PEG 衍生物和 2mM 硫醇的溶液。取等分试样(30μl)并通过加入到 920μl pH 7 的缓冲溶液猝灭。加入 50 微升 DTNB，5 分钟后测定 420nm 下的吸光度来评价剩余的硫醇。半胱氨酸修饰的程度在表 4 中给出。

表 4	
偶联物	硫醇修饰程度
M-PEOZ-马来酰亚胺	58%
PEG-马来酰亚胺	73%
M-PEOZ-OPSS	27%
PEG-OPSS	10%

实施例 21: M-PEOZ-对硝基苯基碳酸酯和 PEG-对硝基苯基碳酸酯的水解和氨解研究

M-PEOZ-对硝基苯基碳酸酯和相应的 PEG-对硝基苯基碳酸酯的水解速率通过释放在 0.1M pH 8 的硼酸盐缓冲溶液中的对硝基苯酚在室温和 412nm 下的 UV 吸光度或聚合物对胺的反应性评价。本实施例中向活化的 PEOZ 或 PEG 溶液中加入 Gly-Gly (Gly-Gly/聚合物比率 1:1) 的溶液。表 5 以半衰期记载了水解和氨解速率。

表 5		
活化的聚合物	水解 pH 8 半衰期(min.)	被 Gly-Gly 氨解 pH 8 半衰期(min.)
M-PEOZ-对硝基苯基碳酸酯	31	19
PEG-对硝基苯基碳酸酯	40	25

实施例 22: M-PEOZ-O-CH₂-CO₂H 的制备

在 60ml 甲苯中共沸蒸馏 M-PEOZ-OH (1.5g, 0.00024mol, 1eq); 除去 30ml 蒸馏物。使反应混合物缓慢冷却至室温, 然后加入 0.5ml (0.5mmol) 1.0M 的叔丁醇钾/叔丁醇溶液。所得混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后加入 94mg (0.48mmol) 溴代乙酸叔丁酯。将所得混浊混合物加热至回流, 冷却并于室温下搅拌 18 小时。反应混合物通过 Celite 过滤并在真空下除去溶剂。残余物在乙醚中沉淀。产物于 4℃ 离心, 洗涤三次并除去溶剂。NMR 中叔丁基峰(1.47ppm)与末端甲基峰的比较表明为定量转化。

将所得羧酸叔丁酯溶解在 CH₂Cl₂/三氟乙酸/水(50ml/0.1ml/100ml)的混合物中，溶液于室温搅拌 3 小时。然后在真空下除去溶剂以完全除去 TFA，然后在乙醚中离心，得到 900mg 产物(60%)。NMR 表明叔丁基峰已消除而在 4.08ppm 处观察到新的亚甲基峰。

通过阴离子交换色谱从过量的 M-PEOZ-OH 中纯化羧酸。将 900mg 产物装入预平衡的柱(QAE 50)中，流速为 1ml/min。用水进行等强度洗脱直至 M-PEOZ-OH 被完全洗脱。将溶剂换为 0.01N 的 NaCl 并收集产物。馏分通过 I₂ 分析鉴定。在真空下浓缩馏分至 30ml 并用 CH₂Cl₂ 洗涤六次(40ml × 6)。产量为 600mg。

实施例 23: M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS 的制备

将 M-PEOZ-COOH (600mg, 0.11mmol)溶解在 15mL 二氯甲烷中，并加入 N-羟基琥珀酰亚胺(104mg, 0.9mmol)和 DCC (185mg, 0.9mmol)。让反应混合物反应 24 小时，然后通过加入乙醚沉淀产物，通过过滤收集产物并干燥。根据用于测定残余 NH₂ 基团的 TNBS 测得的作为底物的甘氨酸-甘氨酸的氨基修饰率确定活化度为 85%。

实施例 24: M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS 和 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS 的水解和氨解研究

M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS 和 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS 的水解速率通过测定释放在 0.1M pH 8 的硼酸盐缓冲溶液中的 N-羟基琥珀酰亚胺在室温和 260nm 下的 UV 吸光度来评价。为评价聚合物对胺的反应性，向 M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS 和 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS (按本领域中熟知的那样制备)溶液中加入 Gly-Gly (Gly-Gly/聚合物比率 1:1)的溶液,以用于比较。表 6 以半衰期记载了水解和氨解。

表 6		
活化的聚合物	水解 pH 8 半衰期(min.)	被 Gly-Gly 氨解 pH 8 半衰期(min.)

M-PEOZ-O-CH ₂ -CO ₂ -NHS	6.3	4
PEG-O-CH ₂ -CO ₂ -NHS	7.0	2

实施例 25: M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS 与 GCSF 的偶联

溶解在 1ml 0.2M 的硼酸钠缓冲溶液(pH 8.5)中的 2.5mg GCSF (0.134 μ mol, MW=18.6kDa)与每 GCSF 氨基(总共 5 个赖氨酸加 α -胺) 3 当量的 M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS 在室温下反应 60 分钟。在这些条件下,修饰主要发生在更裸露的亲核胺上。

GCSF 的修饰通过 RP-HPLC 采用 C18 Agilent 分析柱分析。洗脱剂 A 为含 0.05% TFA 的 H₂O,洗脱剂 B 为含 0.05% TFA 的乙腈。流速为 1ml/min,检测在 280nm 下进行。所用梯度为 0 分钟时 B 为 30%; 30 分钟内 B 从 30%变到 80%, 3 分钟内 B 从 80%变到 30%。色谱表明无游离蛋白质存在,且在比游离 GCSF 晚的保留时间下出现宽峰,表明存在 GCSF-POZ 的多种形式。

若干偶联物的形成通过尺寸排除 HPLC 确认。尺寸排除 HPLC 分析用 Agilent GF-250 柱进行,该柱用 0.1M 磷酸钠、0.2M 氯化钠(pH 7.2)和 20%乙腈的等强度流动相以 0.3ml/min 的流速洗脱。色谱呈现出宽洗脱峰,这对应着比天然 GCSF 具有更高分子量的 GCSF-POZ 偶联物,并与广泛的偶联和质量的增加相一致。

实施例 26: 经 M-POZ-O-CH₂-CO₂-NHS 和 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS 修饰的酶的性质比较

为评价因与本公开的 POZ 衍生物和本领域中熟知的相应 PEG 聚合物的聚合对酶性质的影响,将三种不同的酶——核糖核酸酶 A、尿酸酶和过氧化氢酶用 M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS (6kDa)和 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS (5.5kDa)修饰。为便于比较,各酶在就聚合物-酶比率、缓冲溶液、pH 和反应温度方面而言相似的条件 下被修饰。

用上述 POZ 和 PEG 聚合物修饰酶的条件为 0.2M、pH 8.5、硼酸盐缓冲溶液。修饰所用 POZ 和 PEG 聚合物的量根据各酶中总共可利用的氨基的计算值来计算。例如,核糖核酸酶 A 的分子量为 13.7kDa,有 11 个可利用的氨基;尿酸酶

的分子量为 130kDa, 有 100 个可利用的氨基; 过氧化氢酶的分子量为 240kDa, 有 112 个可利用的氨基。

室温下分别以 2/1 和 1/1 的聚合物-蛋白质氨基摩尔比向三种酶溶液 (2.5mg/ml) 中加入 M-POZ-O-CH₂-CO₂-NHS 或 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS 固体。天然形式的核糖核酸酶、尿酸酶和过氧化氢酶的蛋白质浓度分别用 9.45×10^3 、 13×10^3 和 1.67×10^5 的摩尔消光系数在 280nm 下用分光光度法评价。30 分钟后, 通过凝胶过滤色谱 Sephadex G-75 柱用 0.1M pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液作洗脱剂从未反应的聚合物和 N-羧基琥珀酰亚胺中纯化聚合物-酶偶联物。

用比色法通过 TNBS 分析评价蛋白质修饰度并以偶联的氨基对蛋白质上存在的总的氨基的百分数表示。天然和经修饰的酶的酶活性按如下评价: 核糖核酸酶活性通过 Crook 等(Biochem J. 1960 Feb; 74: 234-8)的方法分析; 尿酸酶活性通过 Mahler 的方法测定(Anal Biochem. 1970 Nov; 38(1): 65-84); 过氧化氢酶按 Beers 和 Sizer 报道的方法分析(J. Biol. Chem. 1952 Mar; 195(1): 133-40)。

核糖核酸酶(RNase)、尿酸酶和过氧化氢酶的结果分别在表 7A-C 中给出。

表 7A			
产物	NH ₂ :聚合物 摩尔比	%修饰	%活性
RNase	不适用	不适用	100
POZ/RNase	1:1	23	50
POZ/RNase	2:1	36	30
PEG/RNase	1:1	60	15
PEG/RNase	2:1	80	10
表 7B			
产物	NH ₂ :聚合物 摩尔比	%修饰	%活性
尿酸酶	不适用	不适用	100

POZ/尿酸酶	1:1	58	37
POZ/尿酸酶	2:1	70	12
PEG/尿酸酶	1:1	52	11
PEG/尿酸酶	2:1	61	8
表 7C			
产物	NH ₂ :聚合物 摩尔比	%修饰	%活性
过氧化氢酶	不适用	不适用	100
POZ/过氧化氢酶	1:1	35	90
POZ/过氧化氢酶	2:1	37	88
PEG/过氧化氢酶	1:1	43	85
PEG/过氧化氢酶	2:1	46	79

发现当用 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS 修饰时比用 M-POZ-O-CH₂-CO₂-NHS 修饰时核糖核酸酶被修饰的程度高并因此有更高的活性损失。在尿酸酶中, 使用 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS 和 M-POZ-O-CH₂-CO₂-NHS 时的修饰度和活性损失相似; 但在受试的两种摩尔比下 POZ 偶联物表现出略高的活性。对于过氧化氢酶, 使用 PEG-O-CH₂-CO₂-NHS 和 M-POZ-O-CH₂-CO₂-NHS 时的修饰程度相似, 且注意到两种情况下酶活性的损失均较小, 且在受试的两种摩尔比下 POZ 偶联物的活性比 PEG 偶联物更高。

实施例 27: TGase 下 M-PEOZ-NH₂ 与 G-CSF 的偶联

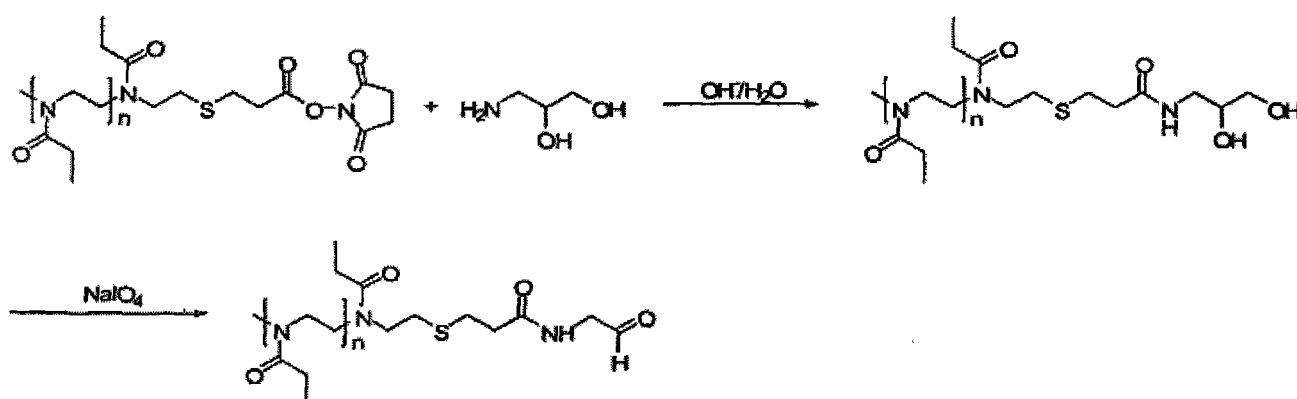
本实施例中检查了使用酶 TGase 时 POZ-NH₂ 对 G-CSF 的位点特异性修饰。也用 PEG-NH₂ 和相同的试剂浓度进行相同的反应作为比较。

如上所述从产物 M-PEOZ-OH 开始制备单官能烷基胺 M-PEOZ 衍生物。TGase-催化的 M-PEOZ-NH₂ 和 PEG-NH₂ 与 G-CSF 的偶联在 0.1M pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液中于室温进行 18 小时, 其中使用 1.6mg G-CSF、50mg 任一胺和

2mg/ml TGase (市场上可获得)。在这些条件下, G-CSF 与 M-PEOZ-NH₂ 没有显著或明显的偶联发生(如反相色谱所示; 详情见上), 而 PEG-NH₂ 给出明显的偶联。

当向 M-PEOZ-NH₂ 的反应混合物中再加入 2mg/ml TGase 酶时, 天然 G-CSF 蛋白质峰将减小并观察到代表偶联物 M-PEOZ-G-CSF 的新峰。

实施例 28: M-PEOZ 醛的制备



二醇的制备

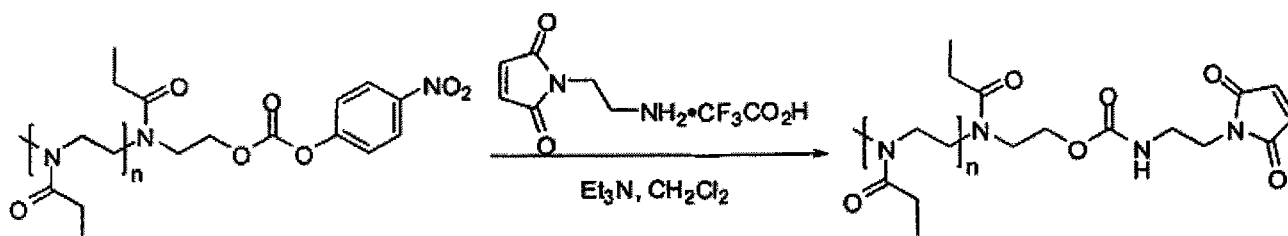
在细颈瓶中制备 3-氨基-1,2-丙二醇(1.41gm, 15mmol)/0.1M pH 8.0 的硼酸缓冲溶液(3mL)。用浓 HCl 调节溶液 pH 至 pH 9。剧烈搅拌下向该溶液中加入如上所述制备的 M-PEOZ NHS 酯(1.00gm, 0.197mmol)。加入 1N NaOH 使溶液 pH 保持在 9。溶液在室温下搅拌三小时。用 1N HCl 调节溶液 pH 至 pH 6.8。向溶液中加入氯化钠(3gm)。向溶液中加入水(1mL), 然后用二氯甲烷萃取三次(3×10mL)。弃去水相。有机层用无水硫酸镁干燥, 过滤并通过旋转蒸发浓缩。浓缩溶液在二乙醚(100mL)中沉淀。所得粉末在高真空下干燥整夜。产量: 0.7gm。根据 NMR, 取代度为 96%; 根据 GFC, 取代度为 95%。在 DMSO-d₆ 中的 NMR: -C(=O)NHCH₂CH(OH)CH₂OH: 1H, δ4.49, t; -C(=O)NHCH₂CH(OH)CH₂OH: 1H, δ4.70, d; -C(=O)NHCH₂CH(OH)CH₂OH: 1H, δ7.87, t (分辨率不良)。

氧化成醛

将二醇(0.500gm, 0.112mmol)溶解在水(8mL)中。通过加入 0.1N NaOH 调节溶液 pH 至 6.85, 然后加入高碘酸钠(27.9mg, 0.130mmol)。溶液于室温搅拌一小

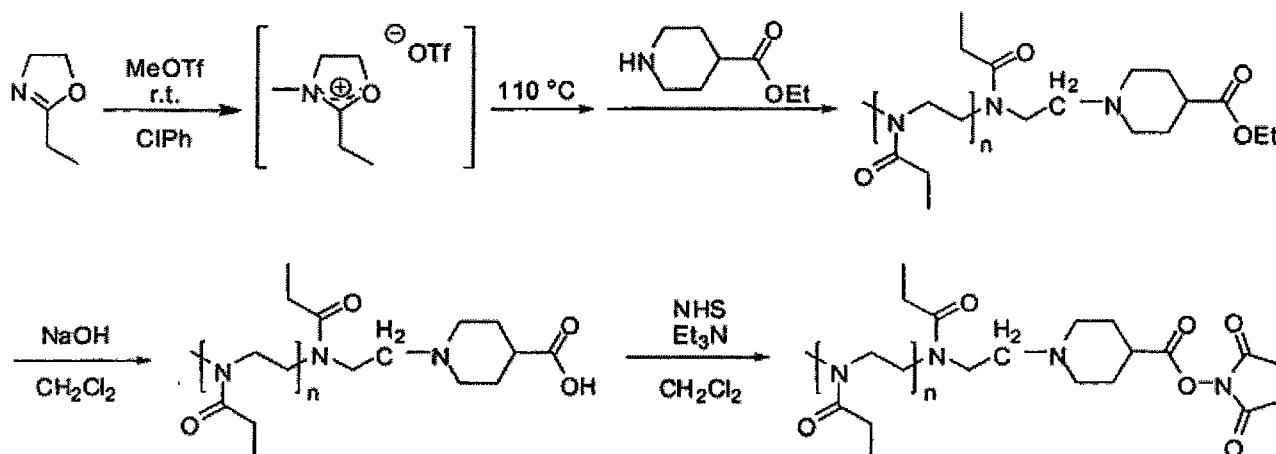
时。向溶液中加入水(2mL)和 NaCl (2gm)。用二氯甲烷萃取溶液三次(3×10mL)。合并的有机层用无水硫酸钠干燥。过滤混合物,然后在减压下浓缩滤液。残余物通过加到乙醚(50mL)中而沉淀。过滤后所得粉末在高真空下干燥。产量: 0.47gm。GPC 测得 Mn 为 4840 Da。根据 CDCl₃ 中的 NMR, 醛取代度为 89%。CDCl₃ 中的 ¹H-NMR: -C(=O)NHCH₂CHO, 1H, δ9.635, s; -C(=O)NHCH₂CHO, 2H, δ4.175, q (分辨率差)。

实施例 29: 从 M-PEOZ-PNPC 合成 M-PEOZ 马来酰亚胺 2K



向二氯甲烷(5mL)中 *N*-(2-氨基乙基)马来酰亚胺三氟乙酸盐(0.065g, 0.255mmol)和三乙胺(0.097mL, 0.696mmol)的混合物中加入如上所述制备的 M-PEOZ 对硝基苯基碳酸酯(Mn 2150 Da, 0.500g, 0.232mmol)。室温搅拌 18 小时后,混合物被过滤,然后逐滴加入二乙醚中,得到淡黄色沉淀。轻轻倒出溶剂,固体物在真空下干燥,得到定量产率。除普通的主链峰外,¹H NMR 谱还表明在 4.15ppm (br s, 2H)处有末端亚甲基质子(-CH₂-OCO-NH-)且在 6.72ppm (s, 2H)处有与马来酰亚胺有关的质子。通过比较引发甲基和马来酰亚胺的积分,确定产率为 ~80%。

实施例 30: 经由异烟酸乙酯合成 M-PEOZ NHS 酯



乙酯的合成

在室温下向 2-乙基-2-噁唑啉单体(50.47mL, 0.500mol)/氯苯(250mL)溶液中加入三氟甲磺酸甲酯(2.83mL, 25.0mmol)。搅拌 10 分钟后, 将反应混合物加热至 110℃并保持 40 分钟。将反应混合物冷却至 0℃, 然后加入异烟酸乙酯(11.55mL, 75.0mmol)。所得混合物于室温搅拌 2 小时后, 在醚(1500mL)中沉淀, 得到 57g 白色粉末。将沉淀溶解在 200mL H₂O 中, 然后用 200mL 二氯甲烷萃取三次。合并的有机层用 MgSO₄ 干燥, 过滤并在真空下浓缩。将稠油状残余物溶解在 CH₂Cl₂ (100mL)中并在二乙醚(1000mL)中沉淀。轻轻倒出溶剂后, 残余物经真空干燥得到 43.5g 白色粉末, 产率为 86%。NMR (500MHz, 10mg/ml CDCl₃)在 1.12ppm (s, 3H, CH₃CH₂CO-)、2.31ppm (小 s)和 2.41ppm (大 s) (总面积 2H, CH₃CH₂CO-)、及 3.46ppm (s, 4H, -NCH₂CH₂N-)处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.9ppm (小)和 3.03ppm (大)处的两个单峰出现(CH₃-NCH₂CH₂)。哌啶峰出现在 1.68ppm (br s, 3H)、1.90ppm (br s, 2H)、2.15ppm (br s, 2H)和 2.84ppm (br s, 2H)处。末端乙酯峰出现在 1.26ppm (t, 3H, *J*=7.0MHz, -C(=O)OCH₂CH₃)和 4.13ppm (q, 2H, *J*=6.5MHz, -C(=O)OCH₂CH₃)处。GPC 表明 Mn=1770Da, PD=1.06。MALDI 给出 Mn=2050 Da, PD=1.02。

酸的合成

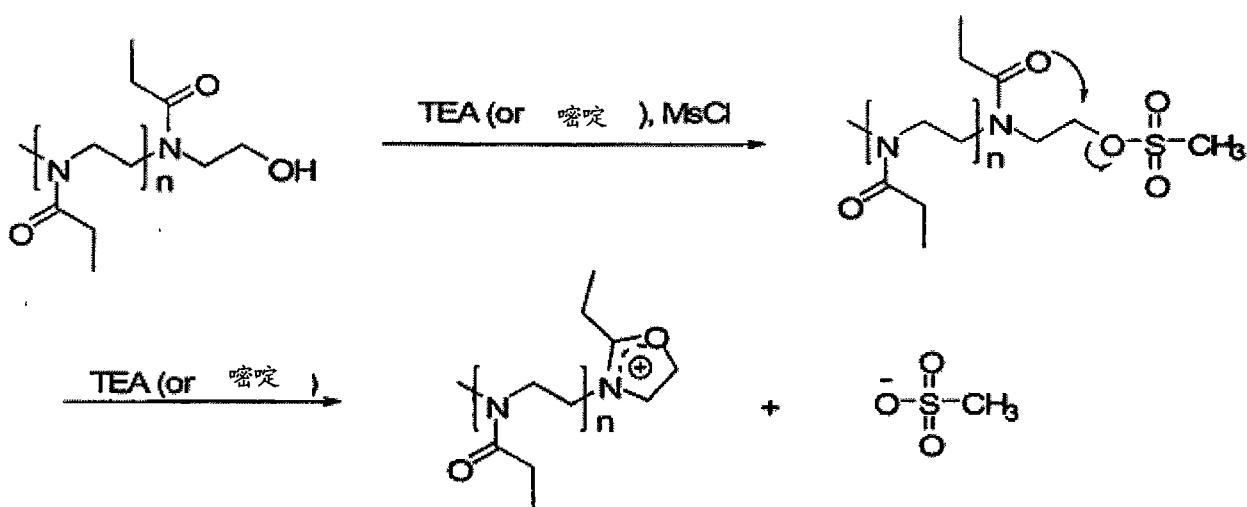
将 M-PEOZ 乙酯(Mn=2050Da, 10.0g, 4.89mmol)溶解在 H₂O (60mL)中。加入 NaOH (0.977g, 24.4mmol)/H₂O (20mL)溶液, 混合物被搅拌 40 分钟。用 5%的 HCl 水溶液酸化混合物, 然后用二氯甲烷萃取。合并的有机相用硫酸钠干燥, 过滤,

浓缩并通过加到醚中沉淀。轻轻倒出醚，残余物在真空下干燥得到 9.0g 白色粉末，产率为 91%。 ^1H NMR 表明水解后乙酯基峰已完全消失。

NHS 酯的合成

在 0°C 下向 M-PEOZ- CO_2H (Mn 2020Da, 3.0g, 1.49mmol)/二氯甲烷(50mL)的溶液中加入 *N*-羟基琥珀酰亚胺(0.173g, 1.50mmol)和 DCC (0.310g, 1.5mmol)。在冷态搅拌 2 小时后，使混合物升温至室温并搅拌整夜。过滤混合物并将滤液加到二乙醚中，得到白色粉末。通过过滤收集产物并在真空下干燥(2.8g, 产率 93%)。 ^1H NMR 谱在 2.89ppm (s, 2H)处呈现出琥珀酰亚胺基质子并有普通的主链峰。

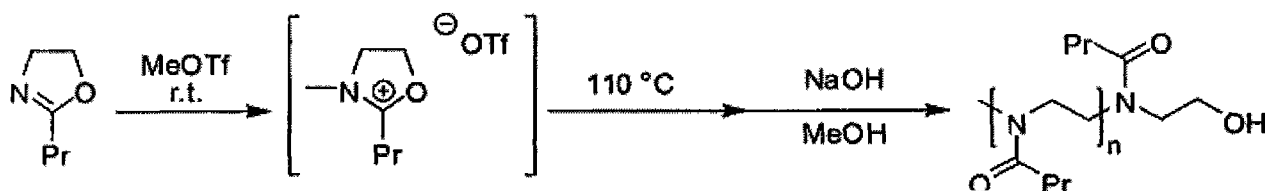
实施例 31: 尝试制备 M-PEOZ-甲磺酸盐



按如上所述制备 M-PEOZ-OH 2K。将 M-PEOZ-OH 2K (1.00gm, 0.608mmol) 溶解在无水乙腈(20mL)中并在旋转蒸发器上蒸发至近干。将残余浆料再次溶解在乙腈(20mL)中并通过旋转蒸发蒸发至近干。加入无水二氯甲烷(5mL)。在缓慢的氩气流下先后加入三乙胺(169.3 μL , 1.215mmol)和甲磺酰氯(84.6 μL , 1.094mmol)。溶液在氩气氛下于室温搅拌整夜。通过旋转蒸发浓缩溶液。通过加到二乙醚中使浓缩溶液沉淀。收集沉淀并在高真空下干燥。产量: 0.6gm。 CDCl_3 中的 NMR 表明有 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$ (δ 4.44) 的峰, 但面积与仅有约 50% 转化的情况相一致。 $-\text{OMs}$ 的低取代归因于形成甲磺酸盐后形成噁唑啉盐离子的副反应。 CDCl_3

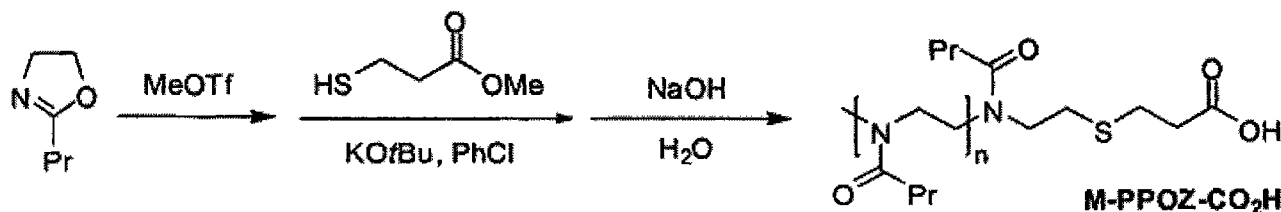
中的NMR在 $\delta 5.01$ (2H, t, 带正电荷的五员环: $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$)和 $\delta 4.44$ (2H, t, 相同的五员环: $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$; 位移与 $-\text{CH}_2-\text{OMs}$ 同)处呈现出峰。

实施例 32: M-PPOZ-OH 的合成



向刚干燥并蒸馏的 2-正丙基-2-噁唑啉(0.500g, 4.42mmol)与刚干燥并蒸馏的氯苯(2mL)的混合溶液中加入三氟甲磺酸甲酯(MeOTf, 25.0 μ L, 0.221mmol)。搅拌 10 分钟后,将混合物加热至 110 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 20 分钟。将混合物冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$ 并用 NaOH (0.044g, 1.11mmol)/甲醇(2mL)溶液终止。NMR (500MHz, 10mg/mL CDCl_3) 在 0.95ppm (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$)、1.65ppm (s, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$)、2.25ppm (小 s) 和 2.34ppm (大 s) (总面积 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$)、及 3.45ppm (s, 4H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$)处呈现出普通的主链峰。引发甲基峰以 2.94ppm (小)和 3.03ppm (大)处的两个单峰出现($\text{CH}_3-\text{NCH}_2\text{CH}_2$, 总面积 3H)。末端亚甲基($-\text{OCH}_2-\text{OH}$)出现在 3.8ppm 处。粗混合物的 GPC 表明 $M_n=1760$ Da, $PD=1.1$ 。

实施例 33: M-PPOZ-硫代丙酸的合成



按如上所示用 2-丙基-2-噁唑啉(5.66mL, 50mmol)和三氟甲磺酸甲酯(0.808mL, 7.14mmol)在氯苯(25mL)中加热至 110 $^{\circ}\text{C}$ 保持 25 分钟并然后冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$ 制备 M-PEOZ $^+$ 。为获得终止试剂,在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下向叔丁醇钾(1.60g, 14.3mmol)/氯苯(14mL)悬浮液中逐滴加入 3-巯基丙酸甲酯(3.09mL, 28.6mmol)。混合物在冷态搅拌 2 小时后,用注射器逐滴加入 M-PEOZ $^+$ /氯苯溶液。混合物在冷态搅拌 4 小时,

然后于室温搅拌 18 小时。加入水(30mL)并通过加入 5%的 HCl 水溶液使混合物酸化(pH~3)。用旋转蒸发除去挥发物(包括氯苯)。所得水溶液用 H₂O (60mL)和固体 NaOH (1.43g, 35.7mmol)稀释。搅拌 1 小时后, 用 5%的 HCl 水溶液使混合物酸化, 然后用二氯甲烷萃取。合并的有机相用硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩并通过加到醚中沉淀。轻轻倒出醚, 残余物在真空下干燥得到粘稠而澄清的黄色油。GPC 呈现出单个主峰, Mn 为 867 Da, PD 为 1.01。GFC 表明粗产物含两种不同的物类: M-PPOZ-T-CO₂H (80%)和 M-PPOZ-T-OH (20%)。

实施例 34: M-PEOZ-T-视黄酸的合成

将视黄酸(0.0102g, 0.0425mmol)和羟基苯并三唑(HOBt, 0.0115g, 0.0849 mmol)溶解在乙腈(10mL)中并用旋转蒸发共沸。将残余物再溶解在二氯甲烷(3mL)中。加入固体 DCC (0.0088g, 0.0425mmol), 混合物搅拌 2 小时。向混合物中加入 M-PEOZ-NH₂ 4300Da (0.122g, 0.0283mmol)并搅拌 40 小时。将混合物缓慢加到二乙醚中, 得到浅黄色粉末。过滤产物并干燥, 得到 0.0823g 产物, 产率为 63%。

实施例 35: 用 M-PEOZ-SCM 修饰 Ara-C 及偶联物活性

POZ-偶联

将 M-PEOZ-O-CH₂-CO₂-NHS (M-PEOZ-SCM 5000) (180mg, 0.034mmol)溶解在 11mL 吡啶中并于 0℃下加到事先溶解在 5mL 无水吡啶中的胞嘧啶阿拉伯糖(Ara-C) (5.7mg, 0.023mmol) 溶液中。所得溶液于室温搅拌 72 小时。反相 HPLC (C-18 柱)表明反应完全。蒸发除去溶剂后将产物溶解在二氯甲烷(5mL)中并逐滴加到 150mL 醚中。于 4℃离心收集沉淀并在真空下干燥。产量 150mg, 产率 80%。NMR 呈现出 M-PEOZ 主链的普通峰(见上)及在 7.31、7.67、8.16 和 8.62ppm 处呈现出 Ara-C 的嘧啶质子峰。将偶联物暴露于 pH 8 缓冲溶液后显示 Ara-C 缓慢释放(24 小时后释放 15%), 故该偶联物可被视为前药。

偶联物活性

将按标准程序培养的人子宫颈癌细胞(HeLa)接种在 24 孔细胞培养板的各孔中。24 小时后更换新鲜的培养基并用浓度渐增的 M-PEOZ-Ara-C 或游离的 Ara-C (20mM, Ara-C 中)的水溶液处理细胞。将细胞在标准条件下孵育 72 小时。进行台盼蓝检测确定细胞活力。该检测发现偶联的 Ara-C 对 Hela 细胞有细胞毒性, 但比游离的 Ara-C 的细胞毒性低约 30 倍, 这与偶联物的缓慢释放过程相一致。与以类似方式制备的 PEG-Ara-C 的比较表明, PEG-和 POZ-偶联物具有相似的性质。

实施例 36: H-PEOZ-S-CH₂CH₂-CO₂H 的合成

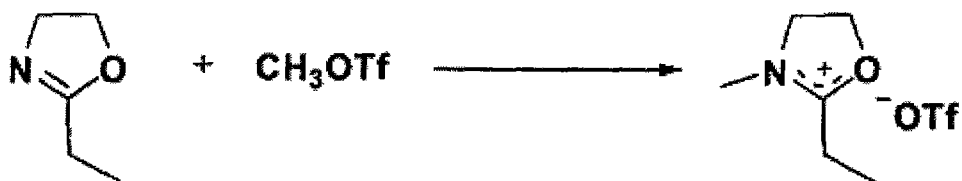
在环境温度和氩气下混合氯苯(25mL)与 2-乙基-2-噁唑啉(9.92g, 0.1mol, 200eq.)并冷却至 0℃。搅拌下加入三氟甲磺酸(0.075g, 1eq.), 反应混合物被搅拌 30 分钟。然后将混合物加热至 80℃并搅拌 7 小时。通过使叔丁醇钾(168mg, 3eq.)与 3-巯基丙酸甲酯(0.360g, 6eq.)在 0℃下反应 6 小时单独制备终止混合物。将终止混合物在 0℃下加到聚合反应中, 然后于室温搅拌整夜。然后将溶液与 50mL 0.25M 的氢氧化钠混合并搅拌一小时。分离水层, 用氯化钠饱和, 并用二氯甲烷萃取(250mL × 3)。通过旋转蒸发除去二氯甲烷, 聚合物在真空下干燥。

所得酸通过 DEAE 色谱纯化, 得到 1.5 克白色粉末。质子 NMR 在 1.12ppm (m, 3H, CH₃CH₂CO-), 2.31ppm (m)和 2.41ppm (s) (面积 2H, CH₃CH₂CO-), 及 3.47ppm (m, 4H, -NCH₂CH₂N-)处呈现出普通的主链峰。丙酸酯亚甲基峰出现在 2.74、2.81 和 2.85ppm 处。GFC 呈现出单个峰。GPC 给出 Mn 为 15,200Da, PD 为 1.09。

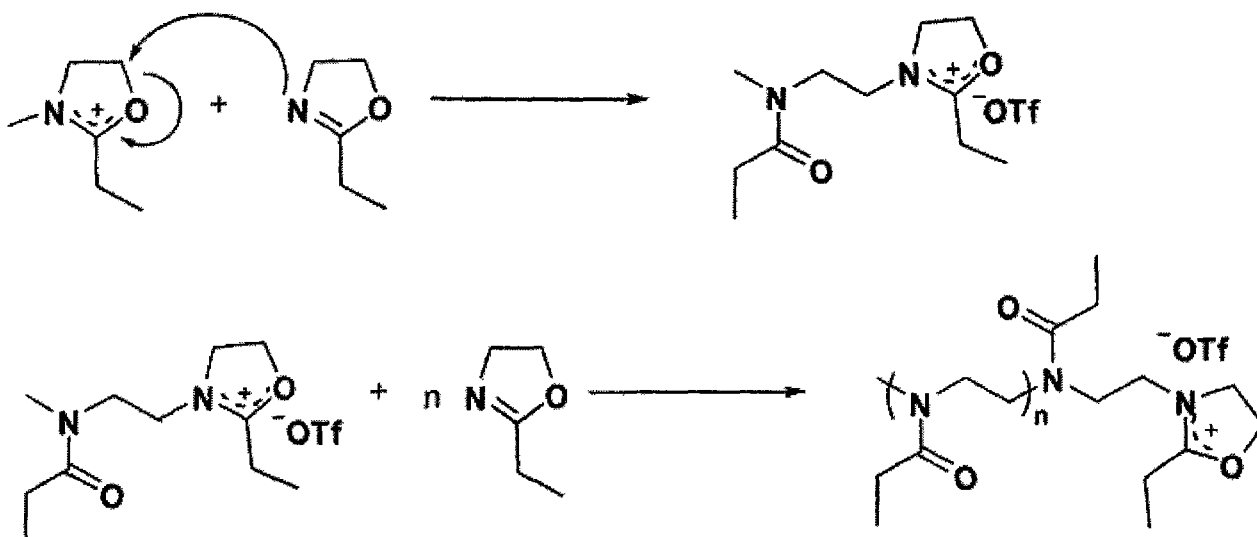
前面的描述说明和描述了本公开的化合物和应用的某些实施方案。此外, 本公开仅示出和描述了所述化合物和应用的示例性实施方案, 如上面所提到的, 应理解本公开的公开能用于各种其他组合、变型 and 环境中并能与上面的公开和/或相关领域技能或知识相适应地在本文中所明确的构思范围内变化和改变。上文中描述的实施方案还意在说明已知的实施本发明的最佳方式以及使本领域技术人员能以这样或那样的实施方案及本发明的特定应用或用途所需的各种变型

利用本发明。因此，本说明书非意在限制本发明于本文中所公开的形式。本文中引用的所有参考文献通过引用结合到本文中，就好像完全是本公开中给出的一样。

引发



增长



终止

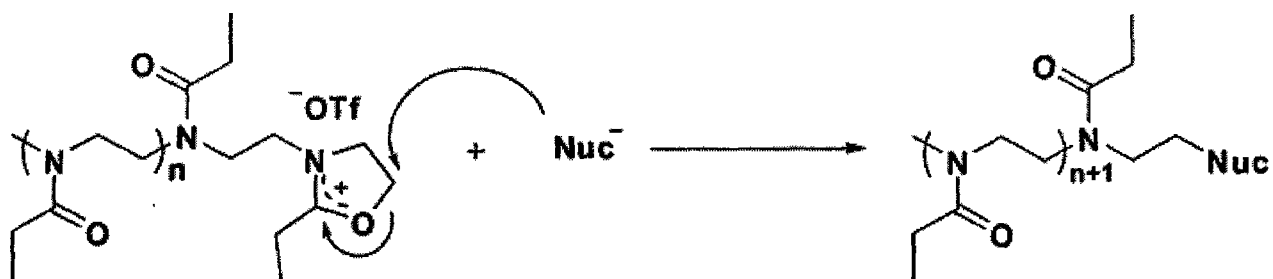


图1: 2-烷基-2-噁唑啉(即2-乙基-2-噁唑啉)聚合的活性阳离子机制, 其中 $-\text{OTf}$ 为 $-\text{OSO}_2\text{-CF}_3$ 或“三氟甲磺酸酯”, Nuc^- 为带负电荷的亲核试剂。

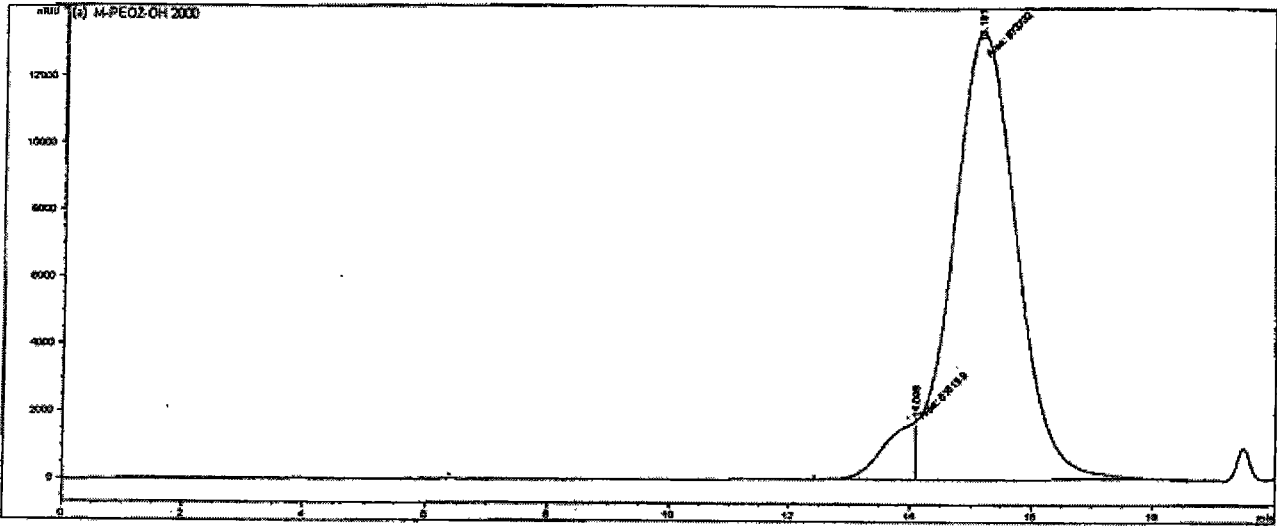


图2A

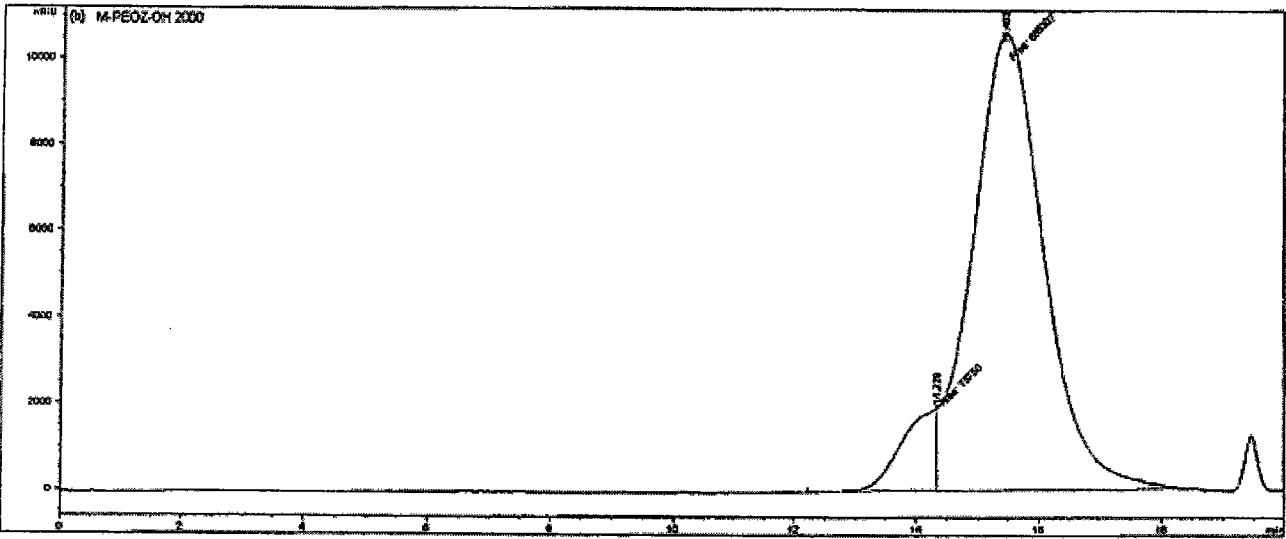


图2B

图 2A 和图 2B 示出了通过现有技术的方法制得的 M-PEOZ-OH 2000 的凝胶渗透色谱。

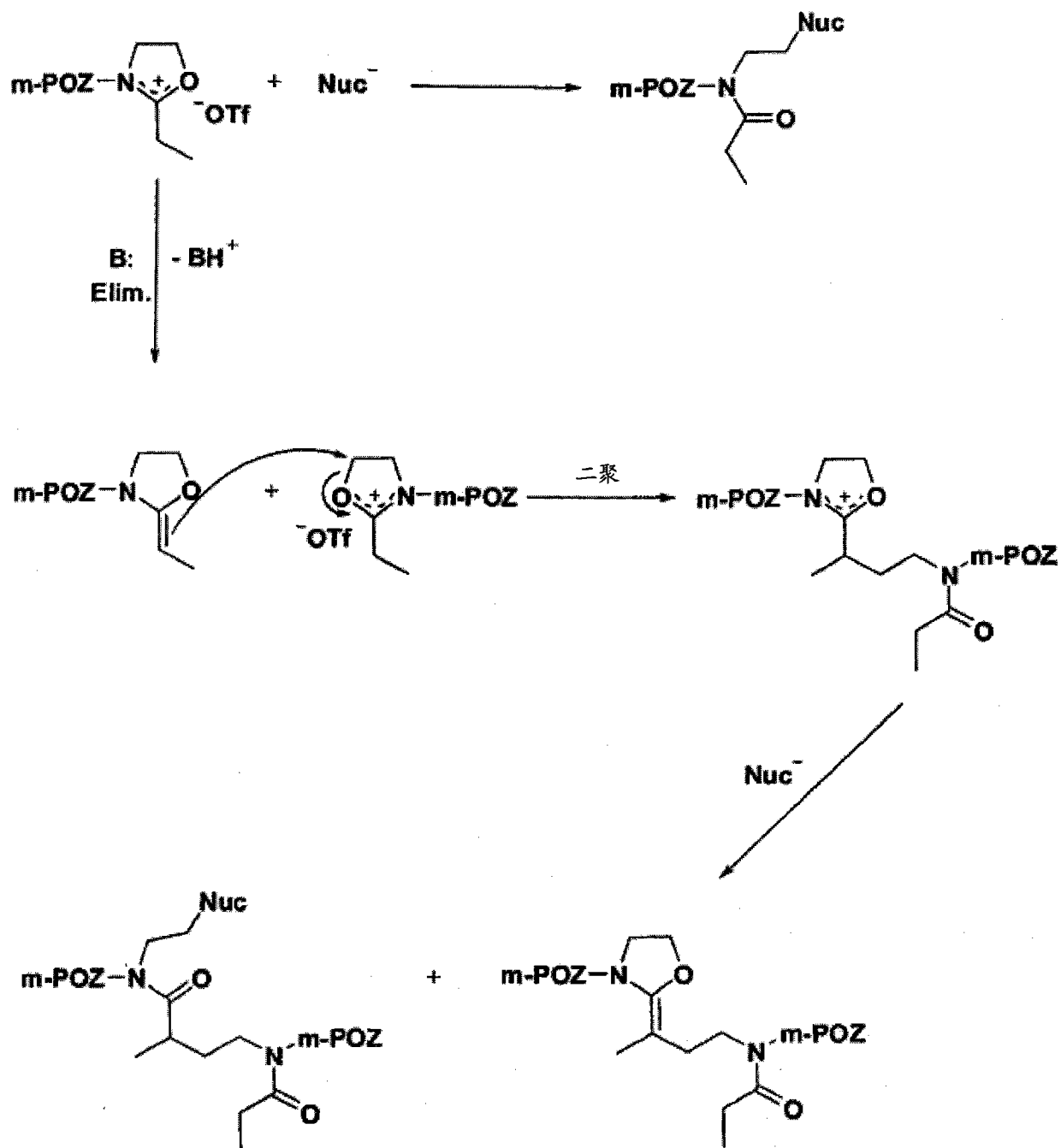


图 3: 2-乙基-2-噁唑啉的聚合过程中链转移的消除-二聚机制。

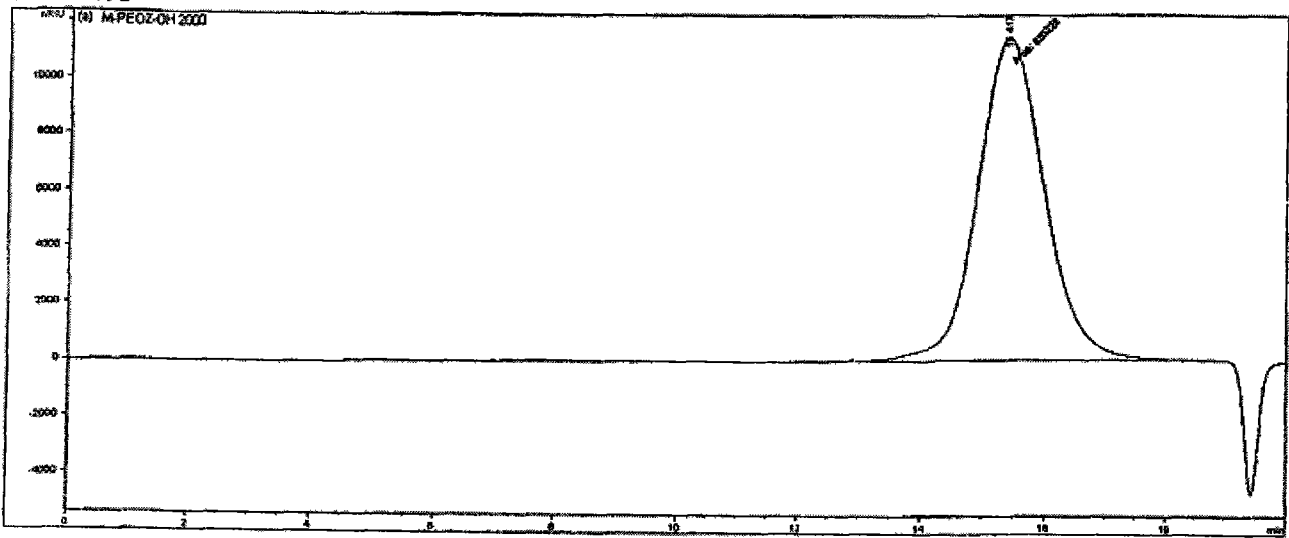


图 4A

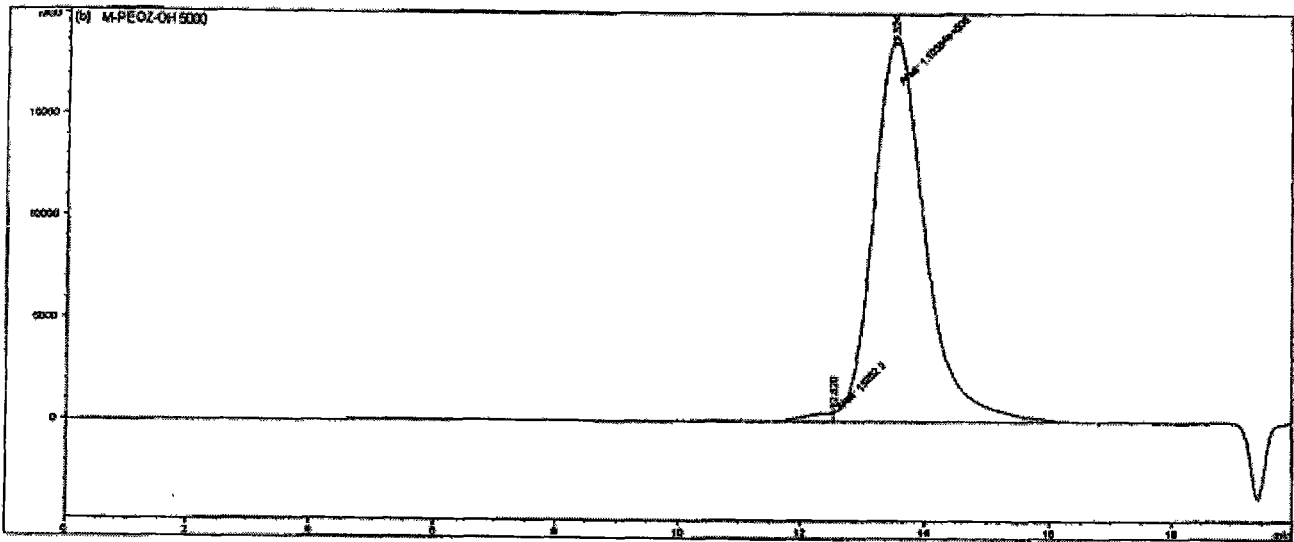


图 4B

图 4A 和 4B 示出了通过本发明的优化条件制得的 M-PEOZ-OH 2000 (图 4A)和 M-PEOZ-OH 5000 (图 4B)的凝胶渗透色谱。