



(19) **UA** (11) **58 481** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 08G 65/32, A 61K 47/48**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 96062250, 14.11.1994

(24) Дата начала действия патента: 15.08.2003

(30) Приоритет: 12.11.1993 US 151,481

(46) Дата публикации: 15.08.2003

(86) Заявка РСТ:
РСТ/US94/13013, 19941114

(72) Изобретатель:

Харис Дж. Милтон, US

(73) Патентовладелец:

ШЕАРВОТЕР КОРПОРЕЙШН, US

(54) ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ГИДРОЛИТИЧЕСКИ СТАБИЛЬНЫЙ АКТИВИРОВАННЫЙ ПОЛИМЕР, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ (ВАРИАНТЫ), БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ КОНЬЮГАТ

(57) Реферат:

Описано производное полиэтиленгликоля, которое активируют сульфоновым остатком для селективного присоединения к тиоловым остаткам молекул и поверхностей. Активированный ПЭГ водорастворим, гидролитически стабилен в течение длительного периода и образует с тиоловыми остатками гидролитически устойчивые связи. В восстановительных условиях такие связи обычно необратимы. Такое ПЭГ-производное может быть использовано для модификации характеристик веществ, включая модификацию

биологически активных молекул и поверхностей для биологической совместимости. Описаны также способы синтеза активного ПЭГ и получения конъюгатов активного ПЭГ с другими веществами, включая биологически активные вещества.

Официальный бюлетьн "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2003, N 8, 15.08.2003. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **58 481** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 08G 65/32, A 61K 47/48**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 96062250, 14.11.1994

(24) Effective date for property rights: 15.08.2003

(30) Priority: 12.11.1993 US 151,481

(46) Publication date: 15.08.2003

(86) PCT application:
PCT/US94/13013, 19941114

(72) Inventor:

Harris G.Milton, US

(73) Proprietor:

SHEARWATER CORPORATION, US

(54) **A WATER SOLUBLE HYDROLITICALLY STABLE ACTIVATED POLYMER, A METHOD FOR PREPARING THE ACTIVATED POLYETHYLENE GLYCOL (VARIANTS), A BIOLOGICALLY ACTIVE CONJUGATE**

(57) Abstract:

A polyethylene glycol derivative that is activated with a sulfone moiety for selective attachment to thiol moieties on molecules and surfaces is disclosed. The activated PEG is water soluble, hydrolytically stable for extended periods, and forms hydrolytically stable linkages with thiol moieties. The linkages generally are not reversible in reducing environments. The PEG derivative is useful for modifying the characteristics of substances including modifying

biologically active molecules and surfaces for biocompatibility. Methods for synthesizing the active PEG and for preparing conjugates of the active PEG and other substances, including biologically active substances, are also disclosed.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2003, N 8, 15.08.2003. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **58 481** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 08G 65/32, A 61K 47/48**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
96062250, 14.11.1994

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2003

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 12.11.1993 US 151,481

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.08.2003

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/US94/13013, 19941114

(72) Винахідник(и):
Харіс Дж. Мілтон , US

(73) Власник(и):
ШЕАРВОТЕР КОРПОРЕЙШН, US

(54) ВОДОРОЗЧИННИЙ ГІДРОЛІТИЧНО СТАБІЛЬНИЙ АКТИВОВАНИЙ ПОЛІМЕР, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АКТИВОВАНОГО ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЮ (ВАРІАНТИ), БІОЛОГІЧНО АКТИВНИЙ КОН'ЮГАТ

(57) Реферат:

Описано похідну поліетиленгліколю, яку активують сульфоновим залишком для селективного приєднання до тіолових залишків молекул і поверхонь. Активований ПЕГ водорозчинний, гідролітично стабільний протягом тривалого періоду й утворює з тіоловими залишками гідролітично стійкі зв'язки. У відновних умовах такі зв'язки звичайно

незворотні. Така ПЕГ-похідна може бути використана для модифікації характеристик речовин, включаючи модифікацію біологічно активних молекул і поверхонь для біологічної сумісності. Описані також способи синтезу активного ПЕГ і одержання кон'югатів активного ПЕГ з іншими речовинами, включаючи біологічно активні речовини.

Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к активным производным полиэтиленгликоля и родственным гидрофильным полимерам и к способам их синтеза для использования при модификации характеристик поверхностей и молекул.

Проводились исследования по использованию полиэтиленгликоля ("ПЭГ") в фармацевтических препаратах, искусственных имплантатах и других областях применения, где важное значение имеет биологическая совместимость. Чтобы обеспечить возможность присоединения ПЭГ к фармацевтическим веществам и имплантатам, а также к молекулам и поверхностям обычно для модификации физических или химических характеристик молекулы или поверхности, были предложены различные производные полиэтиленгликоля ("ПЭГ-производные"), содержащие активный остаток.

Так, например, для присоединения ПЭГ к поверхностям с целью регулирования смачивания, накопления статического электричества и присоединения к поверхности молекул других типов, включая белки и остатки белков, предложены ПЭГ-производные. В частности, были предложены ПЭГ-производные для присоединения к поверхностям пластмассовых контактных линз с целью уменьшить накопление белков и улучшить зрительное восприятие за счет уменьшения помутнения таких линз. Были предложены ПЭГ-производные для присоединения к искусственным кровеносным сосудам с целью уменьшить накопление белков и опасность закупорки. Предложены ПЭГ-производные для иммобилизации белков на поверхности, как при ферментном катализе химических реакций.

Кроме того, например, были предложены ПЭГ-производные для присоединения к молекулам, включая молекулы белков, с целью защиты молекулы от химического воздействия, для ограничения нежелательных побочных эффектов молекулы или для увеличения размеров молекулы, потенциально содействуя тем самым созданию полезных веществ, которые с медицинской точки зрения приносят определенную пользу, но в остальном бесполезны или даже вредны для живого организма. Небольшие молекулы, которые обычно выделялись бы через почки, удерживают в токе крови, если их размеры увеличивают присоединением биологически совместимого ПЭГ-производного. Белки и другие вещества, которые при их инъекции вызывают иммунную реакцию, можно в определенной мере скрыть от иммунной системы присоединением к белку ПЭГ-молекулы.

Были предложены также ПЭГ-производные для выделения по сродству, например, ферментов, из клеточной массы. При разделении по сродству ПЭГ-производное вводит функциональную группу для обратимого присоединения к ферменту, который содержится в клеточной массе. ПЭГ и продукт присоединения фермента выделяют из клеточной массы, а затем при необходимости фермент отделяют от ПЭГ-производного.

Сочетание ПЭГ-производных с белками отражает некоторые проблемы, с которыми приходится сталкиваться при присоединении ПЭГ к поверхностям и молекулам. У многих поверхностей и молекул число участков, доступных для реакций сочетания с ПЭГ-производным, до некоторой степени ограничено. Так, белки, как правило, располагают ограниченным числом реакционноспособных участков определенного типа, которые доступны для сочетания. Еще более проблематичным является то, что некоторые реакционноспособные участки могут быть ответственными за биологическую активность белка, как это бывает, когда фермент катализирует некоторые химические реакции. ПЭГ-производное, которое присоединено к достаточному числу таких участков, может оказывать неблагоприятное воздействие на активность белка.

Реакционноспособные участки, которые образуют места присоединения ПЭГ-производных к белкам, определяются структурой белка. Белки, включая энзимы, построены из различных последовательностей альфа-аминокислот, которые характеризуются общей структурой $H_2N-CHR-COOH$. Альфа-аминовый остаток (H_2N -) одной аминокислоты соединен с карбоксильным остатком ($-COOH$) смежной аминокислоты, образуя амидные мостики, которые могут быть представлены как $-(NH-CHR-CO)_n-$, где n может составлять сотни или тысячи. Фрагмент, обозначенный R , может содержать реакционноспособные участки, обуславливающие биологическую активность белка и место присоединения ПЭГ-производных.

Так, например, в лизине, который является аминокислотой, образующей часть главной цепи большинства белков, остаток $-NH_2$ находится в эпсилон-положении, а также в альфа-положении. Эпсилон-остаток $-NH_2$ в условиях щелочных значений pH свободен для реакций. Много усилий в данной области техники было направлено на создание ПЭГ-производных для присоединения к эпсилон-остатку $-NH_2$ лизиновой фракции белка. Общим у всех этих ПЭГ-производных является то, что такая лизиновая аминокислотная фракция белка обычно оказывается инертной, что может является недостатком там, где важное значение для активности белка имеет лизин.

В патенте США 5122614 на имя Zalipsky указано, что ПЭГ-молекулы, активированные оксикарбонил-N-дикарбоксимидной функциональной группой, в водных щелочных условиях могут быть присоединены посредством уретанового мостика к аминогруппе полипептида. Отмечено, что активированный ПЭГ-N-сукцинимидный карбонат образует с аминогруппами стабильные, стойкие к гидролизу уретановые мостики. Там же указано, что аминогруппа более реакционноспособна при щелочных величинах pH (8,0-9,5), а при пониженных значениях pH реакционная способность резко падает. Однако при значениях pH 8,0-9,5 также резко усиливается гидролиз несвязанного ПЭГ-производного. Zalipsky устраняет проблему повышения скорости взаимодействия несвязанного ПЭГ-производного с водой применением избытка ПЭГ-производного для связывания с поверхностью белка. Используя избыток, с ПЭГ связывают достаточное количество реакционноспособных эпсилон-аминовых участков для модификации белка до того, как у ПЭГ-производного

появляется благоприятная возможность оказаться гидролизированным и не способным к взаимодействию.

Способ Zalipsky приемлем для присоединения лизиновой фракции белка к ПЭГ-производному по одному активному участку этого ПЭГ-производного. Однако, если скорость гидролиза ПЭГ-производного оказывается существенной, присоединение по более чем одному активному участку ПЭГ-молекулы может стать проблематичным, так как простой избыток не снижает скорости гидролиза.

Так, например, линейный ПЭГ с активными участками на каждом конце присоединяется к белку одним концом, но если скорость гидролиза значительна, другой конец взаимодействует с водой и скорее оказывается заблокированным относительно нерекционноспособным гидроксильным остатком, который структурно обозначен как -ОН, чем образует "гантелеподобную" молекулярную структуру с присоединенными с каждого из концов белковыми или другими требуемыми группами. Подобная проблема возникает, если молекулу необходимо присоединить к поверхности с помощью ПЭГ-соединительного агента, поскольку ПЭГ вначале присоединяют к поверхности или он соединяется с молекулой, а противоположный конец ПЭГ-производного должен оставаться активным для последующей реакции. Если из-за гидролиза возникает сложная ситуация, тогда противоположный конец обычно становится инертным.

Кроме того, в патенте США 5122614 на имя Zalipsky описано несколько других ПЭГ-производных, взятых из ранее выданных патентов. Отмечается, что ПЭГ-сукциноил-М-гидроксисукцинимидный эфир образует сложноэфирные мостики, которые в водной среде обладают ограниченной стабильностью, что указывает, таким образом, на нежелательно короткий период полупревращения этого производного. Указано, что ПЭГ-цианурхлорид проявляет нежелательную токсичность и не обладают способностью для специфического взаимодействия с конкретными функциональными группами белка. Следовательно, ПЭГ-цианур-хлоридное производное может проявлять нежелательные побочные эффекты и может понижать белковую активность, поскольку по различным реакционноспособным участкам оно соединяется с рядом аминокислот различных типов. ПЭГ-фенилкарбонат, как сказано, образует токсичные гидрофобные фенольные остатки, которые обладают сродством с белками. О ПЭГ, активированном карбонилдимидазолом, говорится, что он слишком медленно взаимодействует с белковыми функциональными группами, требуя для достижения достаточной модификации белка большой продолжительности реакции.

Тем не менее для присоединения к функциональным группам аминокислот, отличными от эпсилон-остатка -NH₂ лизина, были предложены другие ПЭГ-производные. Гистидин включает реакционноспособный иминовый остаток, отвечающий формуле -N(H)-, но многие производные, взаимодействующие с эпсилон-остатком -NH₂, вступают также во взаимодействие с -N(H)-. Цистеин включает реакционноспособный тиоловый остаток, отвечающий формуле -SH, но ПЭГ-малеимидное производное, которое взаимодействует с этим остатком, подвергается гидролизу.

Как можно видеть из приведенных выше ссылок, затрачены значительные усилия на создание различных ПЭГ-производных, предназначенных для присоединения к лизиновой аминокислотной фракции различных белков, в частности к -NH₂-остатку. Продемонстрирована проблематичность синтеза и использования многих из этих производных. Некоторые образуют с белком нестабильные соединения, которые подвержены гидролизу и, следовательно, в водной среде, в такой, как ток крови, на очень длительный срок не сохраняются. Некоторые образуют более прочные соединения, но подвергаются гидролизу до образования такого соединения, а это означает, что реакционноспособная группа ПЭГ-производного может оказаться инертной еще до того, как может быть присоединен белок. Некоторые в определенной мере токсичны, поэтому менее пригодны для использования in vivo. Некоторые слишком медленно взаимодействуют, чтобы быть практически полезными. Некоторые вызывают потерю белком активности из-за присоединения по участкам, ответственным за активность белка. Некоторые не обладают специфическими свойствами на участках, к которым они присоединяются, что также может привести к потере требуемой активности и отсутствию воспроизводимости результатов.

Согласно изобретению предложены водорастворимые и гидролитически стабильные производные полиэтиленгликолевых ("ПЭГ") полимеров и родственные гидрофильные полимеры, содержащие по одному или несколько активных сульфоновых остатков. Эти полимерные производные с активными сульфоновыми остатками высоко селективны для сочетания не с аминными остатками, а с тиоловыми остатками молекул и на поверхностях, прежде всего при значениях pH приблизительно 9 или меньше. Сульфоновый остаток, связанный между полимером и сульфоновым остатком и связь между тиоловым остатком и сульфоновым остатком в восстановительных условиях обычно не обладают обратимостью и устойчивы к гидролизу в течение продолжительных периодов в водной окружающей среде при значениях pH приблизительно 11 или менее. Следовательно, такими активными сульфосодержащими полимерными производными в требуемых водных условиях можно модифицировать физические и химические характеристики самых разнообразных веществ.

Так, условия для модификации биологически активных веществ можно оптимизировать с учетом сохранения высокой степени биологической активности. Фармацевтические препараты, начиная аспирином и кончая пенициллином, можно успешно модифицировать присоединением активных сульфосодержащих полимерных производных, если эти фармацевтические вещества предварительно модифицируют с тем, чтобы они содержали тиоловые остатки. Также успешно можно модифицировать большие белки, включающие цистеиновые звенья, у которых имеются активные тиоловые остатки. Для введения цистеиновых групп по требуемым местам молекулы белка можно применять технику получения рекомбинантной ДНК ("генетической инженерии"). Эти цистеины можно сочетать с активными сульфосодержащими полимерными производными для создания гидролитически стабильных соединений с различными белками, которые обычно не содержат цистеиновых звеньев.

Специфические сульфоновые остатки для активированных полимеров по изобретению представляют собой те, у которых имеется по меньшей мере по два углеродных атома, связанных с сульфоновой группой $-SO_2-$, так, чтобы присутствовал реакционноспособный участок для тиолспецифических реакций сочетания при втором от сульфоновой группы углеродном атоме.

Более конкретно активные сульфоновые остатки представляют собой винилсульфон, активные этилсульфоны, включая галоидэтилсульфоны, и тиолспецифические активные производные этих сульфонов. Винилсульфоновый остаток может быть представлен структурно как $-SO_2-CH=CH_2$; активный этилсульфоновый остаток может быть структурно представлен как $-SO_2-CH_2-CH_2-Z$, где Z может обозначать галоидную или какую-либо другую отщепляемую группу, способную замещаться тиолом с образованием соединения сульфона или тиола $-SO_2-CH_2-S-W$, где W обозначает биологически активную молекулу, поверхность или какой-нибудь другой объект. Производными винил- и этилсульфонов могут служить и другие заместители при условии сохранения водорастворимости и тиолспецифической реакционной способности реакционноспособного участка у второго углеродного атома.

Изобретение включает гидролитически стабильные конъюгаты веществ, включающих тиоловые остатки, с полимерными производными, содержащими активные сульфоновые остатки. Так, например, водорастворимый, активированный сульфеном ПЭГ-полимер можно сочетать с биологически активной молекулой на ее реакционноспособном тиоловом участке. Химическая связь, посредством которой ПЭГ сочетают с биологически активной молекулой, включает сульфоновый остаток, присоединенный к тиоловому остатку, и имеет формулу ПЭГ- $-SO_2-CH_2-CH_2-S-W$, где W обозначает биологически активную молекулу независимо от того, являлся ли сульфоновый остаток перед сочетанием с ПЭГ винилсульфеном или активным этилсульфеном.

В объем изобретения включены также биологические материалы, у которых имеется поверхность, содержащая один или несколько реакционноспособных тиоловых участков и один или несколько водорастворимых, активированных сульфеном полимеров по изобретению, присоединенных к поверхности сульфеновой и тиоловой связью. Биологические материалы и другие вещества можно также сочетать с активированными сульфеном полимерными производными посредством связи, отличной от сульфеновой и тиоловой связи, такой, как обычная аминокислотная связь, в результате чего уходит более гидролитически стабильная активирующая группа, т.е. сульфоновый остаток, способная вступать в последующие реакции.

Изобретение включает способ синтеза активированных полимеров по изобретению. Серусодержащий остаток присоединяют непосредственно к углеродному атому полимера, а затем превращают в активный сульфоновый остаток. Альтернативно этому сульфоновый остаток может быть получен присоединением соединительного агента, на одном конце которого имеется такой сульфоновый остаток, к обычному активированному полимеру таким образом, что этот сульфоновый остаток содержится на конце полученного полимера.

Более конкретно водорастворимый полимер, включающий по меньшей мере один активный гидроксильный остаток, вступает во взаимодействие с образованием замещенного полимера, содержащего более реакционноспособный остаток. Этот полученный замещенный полимер вступает во взаимодействие с замещением этого более реакционноспособного остатка серусодержащим остатком, у которого имеются по меньшей мере два углеродных атома, причем сера в этом серусодержащем остатке связана непосредственно с углеродным атомом полимера. Далее серусодержащий остаток вступает в реакции с окислением серы, $-S-$, до сульфона, $-SO_2-$, и с образованием участка при втором углеродном атоме сульфосодержащего остатка, реакционной способности которого достаточно для образования связей с тиолсодержащими остатками.

Еще более конкретно способ синтеза активированных полимеров по изобретению включает взаимодействие полиэтиленгликоля с гидроксилактивирующим соединением с образованием сложного эфира или с галоидсодержащим производным с образованием галоидзамещенного ПЭГ. Затем полученный активированный ПЭГ вступает во взаимодействие с меркаптоэтанолам с замещением меркаптоэтанольным радикалом сложноэфирного остатка или галогенида. Серу в меркаптоэтанольном остатке окисляют до сульфона. Этанольный сульфен активируют либо активированием гидроксильного остатка, либо замещением этого гидроксильного остатка более активным остатком, таким, как атом галогена. Затем при необходимости активный этилсульфен полиэтиленгликоля можно конвертировать в винилсульфен отщеплением активированного гидроксила или другого активного остатка и введением углерод-углеродной двойной связи, смежной с сульфеновой группой $-SO_2-$.

Изобретение включают также способ получения конъюгата какого-либо вещества и полимерного производного, которое содержит активный сульфоновый остаток. Этот способ включает стадию образования связи между полимерным производным и веществом, причем такое связывание происходит между сульфеновым остатком и тиоловым остатком.

Таким образом, по изобретению предлагаются активированные полимеры, которые обладают специфической реакционной способностью, стабильностью в воде, стабильностью в восстановительных условиях и которые образуют более стабильные соединения с поверхностями и молекулами, включая биологически активные молекулы, чем те, что достигались ранее. Такой активированный полимер может быть использован для модификации характеристик поверхностей и молекул, когда важное значение имеет биологическая совместимость. Поскольку активированный полимер стабилен в водных условиях и образует с тиоловыми остатками стабильные соединения, для сохранения активности биологически активных веществ и для оптимизации скорости реакции сочетания полимера можно выбирать наиболее благоприятные реакционные условия.

Синтез, используемый для получения активных сульфенов полиэтиленгликоля и родственных полимеров,

включает по меньшей мере четыре стадии, на которых серу связывают с полимерной молекулой, а затем конвертируют посредством ряда реакций в активную сульфоновую функциональную группу. Молекула исходного ПЭГ-полимера включает по меньшей мере один гидроксильный остаток, -ОН, который способен принимать участие в химических взаимодействиях, и его рассматривают как "активный" гидроксильный остаток.

Более реакционноспособный остаток обычно следует получать по одному из двух путей: активированием или замещением гидроксила. Для любого специалиста в данной области техники очевидны и другие методы, но активирование или замещение гидроксила являются двумя наиболее часто используемыми техническими приемами. При активировании гидроксила водородный атом -H гидроксильного остатка -ОН замещают более активной группой. Обычно проводят взаимодействие кислоты или производного кислоты, такого, как галоидангидрид кислоты, с ПЭГ с получением реакционноспособного сложного эфира, в котором ПЭГ и кислотный остаток соединены через сложноэфирную связь. Такой кислотный остаток обычно более реакционноспособен, чем гидроксильный остаток. Типичными сложными эфирами являются сульфонатные, карбоксилатные и фосфатные эфиры.

Сульфониловые галоидангидриды кислот, которые пригодны для использования при практическом осуществлении изобретения, включают метансульфонилхлорид и п-толуолсульфонилхлорид. Метансульфонилхлорид отвечает формуле $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ и известен также как мезилхлорид. Метансульфо-ниловые сложные эфиры иногда называют мезилатами. Пара-толуолсульфонилхлорид отвечает формуле $\text{H}_3\text{CC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$ и известен также как тозилхлорид. Толуолсульфониловые сложные эфиры иногда называют тозилатами.

В реакции замещения гидроксильную группу -ОН молекулы ПЭГ целиком замещают более реакционноспособным остатком, обычно атомом галогена. Так, можно провести взаимодействие тионилхлорида, отвечающего формуле SOCl_2 , с ПЭГ с получением более реакционноспособного хлорзамещенного ПЭГ. Замещение гидроксильного остатка другим остатком в данной области техники иногда называют активированием гидроксила. Термин "активирование гидроксила" в данном описании следует понимать как обозначающий замещение, а также этерификацию и другие методы активирования гидроксила.

В области химической технологии термины "группа", "функциональная группа", "остаток", "активный остаток", "реакционноспособный участок" и "радикал" в некоторых случаях являются синонимами, и в данной области техники и в настоящем описании их используют для четкого обозначения поддающихся определению участков или звеньев молекулы и тех звеньев, которые выполняют некоторую функцию или проявляют активность и являются реакционноспособными в отношении других молекул или частей молекул. В этом смысле при сочетании с полимером белок или остаток белка можно рассматривать как молекулу или как функциональную группу либо остаток.

Термин "ПЭГ" в данной области техники и в настоящем описании используют для описания любого из нескольких конденсационных полимеров этиленгликоля, отвечающих общей формуле, структурно изображаемой как $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, которая может быть также представлена как $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)-\text{OH}$. ПЭГ известен также как полиоксиэтилен, полиэтиленоксид, полигликоль и полиэфиргликоль. ПЭГ может быть получен в виде сополимеров окиси этилена и многих других мономеров.

Полиэтиленгликоль используют для биологических целей, так как он обладает свойствами, которые весьма желательны и в целом приемлемы для биологических или биотехнических областей применения. ПЭГ обычно прозрачен, бесцветен, не обладает запахом, растворим в воде, термостабилен, инертен ко многим химическим реагентам, не гидролизует, не разрушается и нетоксичен. Полиэтиленгликоль считают биологически совместимым, то есть можно сказать, что ПЭГ способен к сосуществованию с живыми тканями и организмами, не принося им вреда. Более конкретно ПЭГ не обладает иммуногенностью, т.е., иными словами, ПЭГ не проявляет тенденцию вызывать иммунную реакцию организма. При присоединении к остатку, выполняющему в организме некоторую определенную функцию, ПЭГ проявляет тенденцию к маскировке этого остатка и способен ослаблять или устранять любую иммунную реакцию, благодаря чему организм способен переносить присутствие такого остатка. Таким образом, активированные сульфеном ПЭГ по изобретению должны быть практически нетоксичными и по существу не должны проявлять тенденции к возбуждению иммунной реакции или вызывать свертывание крови либо другие нежелательные эффекты.

Вторая стадия синтеза состоит в связывании серы непосредственно с углеродным атомом полимера и в такой форме, в которой ее можно конвертировать в этилсульфон или этилсульфоновое производное, обладающее сходными свойствами реакционноспособности. Термин "этил" относится к остатку, содержащему идентифицируемую группу из двух соединенных между собой углеродных атомов. Необходимо, чтобы второй углеродный атом в цепи активного сульфенового ПЭГ-производного в направлении от сульфеновой группы образовывал реакционноспособный участок для соединения тиоловых остатков с сульфеном. Такого результата можно достичь за счет взаимодействия активного участка, созданного на вышеупомянутой первой стадии, который обычно содержится в эфир- или галоидзамещенном ПЭГ, в ходе проведения реакции замещения со спиртом, который также содержит реакционноспособный тиоловый остаток, присоединенный к этиловой группе, т.е. тиоэтаноловый остаток. Этот тиоловый остаток окисляют до сульфена, а второй в направлении от сульфена в этильной группе углеродный атом конвертируют в реакционноспособный участок.

Соединения, включающие тиоловые остатки, -SH, представляют собой органические соединения, схожие со

спиртами, которые содержат гидроксильный остаток -ОН, за исключением того, что в тиолах кислородный атом по меньшей мере одного гидроксильного остатка замещен серой. Активирующий остаток ПЭГ-производного после первой реакции, который обычно представляет собой либо галоидный, либо кислотный остаток эфира, отщепляют от полимера и замещают спиртовым радикалом тиоэтанолового соединения. Серу этого тиолового остатка спирта связывают непосредственно с углеродным атомом полимера.

В качестве спирта следует использовать тот, что дает тиоэтаноловый остаток для прямого присоединения к углеродному атому полимерной цепи или который можно легко конвертировать в тиоэтаноловый остаток или замещенный остаток с аналогичными свойствами реакционной способности. Примером такого спирта служит меркаптоэтанол, который отвечает формуле $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ и который иногда называют также тиоэтанолом.

На третьей стадии синтеза для конверсии серы, которая присоединена к углероду, в сульфоновую группу, $-\text{SO}_2$, используют окислитель. Существует множество таких окислителей, включая перекись водорода и перборат натрия.

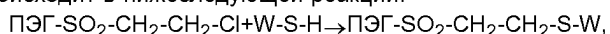
Может быть использован катализатор, такой, как вольфрамовая кислота. Однако образующийся сульфон находится не в той форме, которая активна для тиолселективных реакций, и необходимо удалять относительно неактивный гидроксильный остаток спирта, который присоединяли в ходе проведения реакции замещения на второй стадии.

На четвертой стадии гидроксильный остаток спирта, который присоединяли на второй стадии, конвертируют в более реакционноспособную форму либо путем активирования гидроксильной группы, либо путем замещения гидроксильной группы более реакционноспособной группой, как и на первой стадии этой реакционной последовательности. Замещение обычно производят галогенидом с получением галоидэтилсульфона или его производного, обладающего реакционноспособным участком у второго относительно сульфоновой остатка углеродного атома. Обычно второй углеродный атом этиловой группы следует активировать хлоридным или бромидным галогеном. Активирование гидроксила должно создавать участок аналогичной реакционной способности, такой, как остаток сульфонатного эфира. Приемлемыми реагентами являются кислоты, галоидангидриды кислот и другие, упомянутые ранее в связи с первой стадией этой реакционной последовательности, прежде всего тионилхлорид в случае замещения гидроксильной группы атомом хлора.

Получаемый полимерный активированный этилсульфон стабилен, может быть выделен в чистом виде и пригоден для тиолселективных реакций сочетания.

Как показано в примерах, ПЭГ-хлорэтилсульфон стабилен в воде при значениях pH приблизительно 7 или меньше, но тем не менее может быть успешно использован для тиолселективных реакций сочетания в условиях щелочных значений pH, вплоть до по крайней мере приблизительно 9.

В ходе проведения реакции тиолового сочетания возможно вытеснение хлорида тиоловым остатком, как это происходит в нижеследующей реакции:

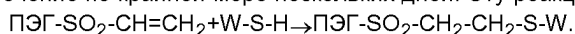


где W обозначает остаток, к которому присоединяется тиоловый остаток SH и который может быть биологически активной молекулой, поверхностью или каким-либо другим веществом. Однако, не руководствуясь какой-либо теорией, на основании поддающейся наблюдению кинетики реакции, как показано в примере 3, полагают, что хлорэтил и другие активированные этилсульфоны и реакционноспособные производные конвертируют в ПЭГ-винилсульфон и что с тиоловым остатком фактически связывают именно ПЭГ-винилсульфон или его производное. Тем не менее получаемая сульфоновая и тиоловая связь не отличима ни от активного ПЭГ-этилсульфона, ни от ПЭГ-винилсульфона, вследствие чего для присоединения к тиоловым группам активный этилсульфон можно использовать при значениях pH выше 7.

ПЭГ-винилсульфон также стабилен, может быть выделен в чистом виде и способен образовывать тиолселективные, гидролитически стабильные соединения, обычно за гораздо меньший период, чем галоидэтилсульфон или другой активированный этилсульфон, как это подробнее поясняется ниже.

На пятой стадии, которую можно добавить к синтезу, проводят взаимодействие активированного этилсульфона с любым из разнообразных оснований, таким, как гидроксид натрия или триэтиламин, с получением ПЭГ-винилсульфона или одного из его активных производных для использования в тиолселективных реакциях сочетания.

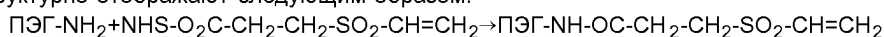
Как показано в нижеприведенных примерах, прежде всего в примере 3, ПЭГ-винилсульфон быстро взаимодействует с тиоловыми остатками и стоек к гидролизу в воде при значениях pH менее приблизительно 11 в течение по крайней мере нескольких дней. Эту реакцию можно представить следующим образом:



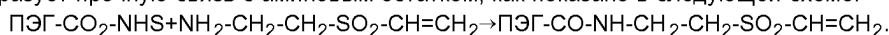
Тиоловый остаток присоединяют, как принято говорить, "через двойную связь". W-S-остаток присоединяют к концевому звену CH_2 этой двойной связи, углерод которой является вторым от сульфоновой группы SO_2 углеродным атомом. Водородный атом H присоединяется к группе CH с двойной связью. Однако при pH выше приблизительно 9 селективность сульфоновой остатка к тиолу уменьшается, и сульфоновый остаток становится несколько более реакционноспособен в отношении аминогрупп.

Согласно другому варианту вышеописанного синтеза активированные сульфеном ПЭГ-производные можно получать присоединением соединительного агента, содержащего сульфеновый остаток, к ПЭГ, активированному другой функциональной группой. Так, например, активированный амином ПЭГ, ПЭГ- MH_2 , при благоприятных условиях при pH приблизительно 9 или менее взаимодействует с небольшой молекулой, у которой на одном конце имеется сукцинимидиловый активный сложноэфирный остаток $\text{NHS-O}_2\text{C-}$, а на другом конце сульфеновый остаток, винилсульфон $-\text{SO}_2\text{-CH=CH}_2$. Активированный амином ПЭГ образует с сукцинимидиловым эфиром прочную связь. Получаемый ПЭГ активируют винилсульфеновым остатком на конце

и делают его гидролитически стабильным. Реакцию и полученный активированный винилсульфоном ПЭГ структурно отображают следующим образом:



Аналогичный активированный ПЭГ можно получить взаимодействием активированного амином ПЭГ, такого, как сукцинимидиловый активный сложный эфир ПЭГ, ПЭГ-CO₂-NHS, с небольшой молекулой, на одном конце которой имеется аминовый остаток, а на другом - винилсульфоновый остаток. Такой сукцинимидиловый эфир образует прочную связь с аминовым остатком, как показано в следующей схеме:



Активные ПЭГ-сульфоны по изобретению могут характеризоваться любой молекулярной массой и могут быть линейными или разветвленными с сотнями ответвлений. ПЭГ может быть замещенным или незамещенным при условии, что по крайней мере один реакционноспособный участок пригоден для замещения сульфоновыми остатками. Типичная средняя молекулярная масса ПЭГ составляет 200-100000, а его биологические свойства могут варьироваться в зависимости от молекулярной массы и от степени разветвленности и замещения, поэтому не все такие производные могут быть использованы для биологических или биотехнических целей. Для большинства биологических и биотехнических целей следует использовать практически линейный, прямоцепочечный ПЭГ-винилсульфон или бис-винилсульфон или же следует применять активированный этилсульфон, практически незамещенный, кроме винилсульфоновых или этилсульфоновых остатков и при необходимости других дополнительных функциональных групп. Для многих биологических и биотехнических областей применения такими заместителями обычно служат нерекционноспособные группы, такие, как водородный атом Н- и метил CH₃- ("м-ПЭГ").

ПЭГ может включать более одного присоединенного винилсульфонового остатка либо остатка-предшественника или один конец ПЭГ может быть заблокирован относительно нерекционноспособным остатком, таким, как метиловый радикал, -CH₃. Такая заблокированная форма может быть использована, например, если полимерные цепи желательно просто присоединить по различным тиоловым участкам вдоль белковой цепи. Присоединение ПЭГ-молекул к биологически активной молекуле, такой, как белок или другое фармацевтическое средство, или к поверхности иногда называют "ПЭГилированием".

Линейный ПЭГ с активными гидроксилами на каждом конце может быть активирован с каждого конца винилсульфоном либо его предшественником или же производными сходной реакционноспособности, в результате чего он становится бифункциональным. Такую бифункциональную структуру, например, ПЭГ-бис-винилсульфон, иногда называют гантельной структурой, которая может быть использована, например, в качестве мостика или распорки для присоединения биологически активной молекулы к поверхности или для присоединения более чем одной такой биологически активной молекулы к ПЭГ-молекуле. Стойкость сульфонового остатка к гидролизу делает его особенно пригодным для бифункциональных или гетеробифункциональных применений.

Другой областью применения ПЭГ-винилсульфона и его предшественника - является дендритный активированный ПЭГ, у которого множество ответвлений из ПЭГ присоединено к центральной, сердцевинной структуре. Дендритные ПЭГ-структуры могут быть высоко разветвленными; они общеизвестны как "звездчатые" молекулы. Звездчатые молекулы в целом описаны в патенте США 5171264, выданном на имя Merrill, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки. Сульфоновые остатки могут быть использованы для получения на конце ПЭГ-цепи, проходящей от сердцевины, активной функциональной группы и в качестве мостика для присоединения функциональной группы к лучам звездчатой молекулы.

ПЭГвинилсульфон и его предшественники и производные могут быть использованы для непосредственного присоединения к поверхностям и молекулам, у которых имеется тиоловый остаток. Однако более типично присоединение гетеробифункционального ПЭГ-производного, на одном конце которого имеется сульфоновый остаток, а у группы на противоположном конце - другой функциональный остаток, к поверхности или молекуле посредством другого остатка. В случае замещения одним из других активных остатков гетеробифункциональная гантельная структура ПЭГ может быть использована, например, для переноса белковой или другой биологически активной молекулы сульфоновыми мостиками на один конец и другим мостиком, таким, как аминовый мостик, на другой конец, в результате чего образуется молекула, проявляющая два различных действия. Гетеробифункциональный ПЭГ, у которого имеется сульфоновый остаток на одном конце и аминовый специфический остаток на другом конце, может присоединяться как к цистеиновому, так и к лизиновому фрагментам белков. При необходимости можно достичь прочной аминовой связи, и в этом случае гидролитически стабильный непрореагировавший сульфоновый остаток оказывается доступным для последующих тиолспецифических реакций.

Другие активные группы для гетеробифункциональных, активированных сульфоновым ПЭГ можно выбрать среди остатков самых разнообразных соединений. Для биологических и биотехнических применений заместители обычно следует выбирать из реакционноспособных остатков, которые, как правило, используют в химии ПЭГ для активирования ПЭГ, такие, как альдегиды, трифторэтилсульфонат, который также иногда называют трезилатом, n-гидроксилсукцинимидный эфир, цианурхлорид, цианурфторид, ацилазид, сукцинат, пара-дiazобензиловый группа, 3-(пара-diazофенилокси)-2-гидроксипропилоксигруппа и другие.

Примеры активных остатков, отличных от сульфона, представлены Davis и др. в патенте США 4179337; Lee и др. в патентах США 4296097 и 4430260; Iwasaki и др. в патенте США 4670417; Katre и др. в патентах США 4766106, 4917888 и 4931544; Nakagawa и др. в патенте США 4791192; Nitecki и др. в патентах США 4902502 и 5089261; Saifer в патенте США 5080891; Zalipsky в патенте США 5122614; Shadle и др. в патенте США 5153265; Rhee и др. в патенте США 5162430; в публикации заявки на Европейский патент 0247860 и в Международных

заявках US86/01252; GB89/01261; GB89/01262; GB89/01263; US90/03252; US90/06843; US91/06103; US92/00432 и US92/02047, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок.

Для любого специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что гантельные структуры, о которых речь шла выше, могут быть использованы для переноса самых различных заместителей и сочетаний заместителей. Можно модифицировать фармацевтические вещества, такие, как аспирин, витамины, пенициллин и другие многочисленные материалы; полипептиды, белки и фрагменты белков различных функциональности и молекулярной массы; клетки различных типов; поверхности для биоматериалов и почти любое вещество. Под используемым в описании термином "белок" следует понимать, среди прочего, пептиды и полипептиды, которые являются полимерами аминокислот. Термин "биоматериал" обозначает материал, обычно синтетического происхождения, а иногда полученный из пластмассы, который пригоден для имплантации в живой организм для восстановления поврежденных или больных частей организма. Примером биоматериала служат искусственные кровеносные сосуды.

Одно из прямоцепочечных ПЭГ-производных по изобретению для биологических и биотехнических целей отвечает базовой формуле $R-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_n-Y$. Предпочтительный ПЭГ-мономер OCH_2CH_2 вдоль главной полимерной цепи практически не замещен и не имеет боковых групп. Величина подстрочного символа "n" составляет от примерно 5 до 3000. Более типичный интервал равен от примерно 5 до 2200, что соответствует молекулярной массе от примерно 220 до 100000. Еще более типичен интервал от примерно 34 до 1100, что соответствует молекулярной массе в интервале от примерно 1500 до 50000. В большинстве областей применения приемлема молекулярная масса от примерно 2000 до 5000, что соответствует значению "n" от примерно 45 до 110.

В вышеприведенной формуле Y обозначает $-SO_2-$, $CH=CH_2$ или $-SO_2-CH_2-CH_2-X$, где X обозначает атом галогена. R обозначает группу, которая может быть той же, что и Y, или отличной от нее. R может представлять собой $HO-$, H_3CO- , $CH_2=CH-SO_2-$, $Cl-CH_2-CH_2-SO_2-$ или активирующую полимер группу, отличную от $CH_2=CH-SO_2-$, $Cl-CH_2-CH_2-SO_2-$, такую, как упоминаемая в отношении вышеперечисленных патентов и опубликованных заявок на патент.

Активные полимерные производные являются водорастворимыми и гидролитически стабильными и образуют с тиоловыми группами водорастворимые и гидролитически стабильные связи. Эти производные рассматривают как неограниченно растворимые в воде или как приближающиеся к неограниченной растворимости и как обеспечивающие способность молекул, которые в других условиях нерастворимы, переходить в раствор при образовании с ними конъюгатов.

Гидролитическая стабильность производных означает, что связь между полимером и сульфоновым остатком является водостойкой и что винилсульфоновый остаток не взаимодействует с водой при pH менее приблизительно 11 в течение продолжительного периода времени, составляющего по меньшей мере несколько дней, и потенциально неограниченного, как показано в нижеприведенном примере 3. Активированный этилсульфон можно конвертировать в винилсульфон в условиях щелочных значений pH с идентичной конечной стабильностью. Гидролитическая стабильность тиоловой связи означает, что конъюгаты активированного полимера и вещества, содержащего тиоловый остаток, в водной среде обладают стабильностью по месту сульфотиоловой связи в течение длительного периода времени при значениях pH ниже приблизительно 11. От многих белков можно ожидать утраты активности при щелочных значениях pH, равных 11 или выше, вследствие чего для любого специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что во многих областях применения активных сульфосодержащих ПЭГ-производных значения pH должны составлять менее 11, несмотря на стабильность сульфонового остатка при более высоких значениях pH.

Для возможности применения для модификации белков и других веществ необходима лишь стабильность сульфона в течение промежутка времени, достаточного для взаимодействия сульфона с реакционноспособным тиоловым остатком такого белка или другого вещества. Скорость реакции сульфонового остатка с тиолом в зависимости от значения pH может варьироваться, как это показано в нижеприведенном примере 2, и реакция может завершаться в течение от примерно 2 до 30 мин, т.е. значительно быстрее реакции гидролиза, если таковой имеет место. Можно ожидать, что время взаимодействия винилсульфона с тиолом находится в гораздо более широком интервале, поскольку он стабилен в течение длительного периода времени. Кроме того, как показано в нижеприведенном примере 3, в условиях щелочных значений pH хлорэтилсульфон не гидролизуют, а конвертируют в винилсульфон, который остается стабильным в течение нескольких дней и является еще более реакционноспособным в отношении тиоловых групп. Таким образом, в отношении модификации характеристик веществ активные этилсульфоны также можно рассматривать как гидролитически стабильные в течение длительного периода времени в широком интервале значений pH.

Полагают, что для подобных модификации и активирования активным сульфоновым остатком приемлемы другие водорастворимые полимеры, отличные от ПЭГ. Эти другие полимеры включают поливиниловый спирт ("ПВС"); другие полиалкиленоксиды, такие, как полипропиленгликоль ("ППГ") и тому подобное; полиоксиэтилированные полиолы, такие, как полиоксиэтилированный глицерин, полиоксиэтилированный сорбит и полиоксиэтилированная глюкоза и тому подобное. Полимеры могут представлять собой гомополимеры или статистические или блоксополимеры и тройные сополимеры на основе мономеров вышеуказанных полимеров, прямоцепочечные или разветвленные, замещенные или незамещенные, подобные ПЭГ, но обладающие по крайней мере одним активным участком, способным взаимодействовать с образованием сульфонового остатка.

В нижеследующем примере 1 представлен синтез, выделение и определение характеристик поли(этиленгликоль)-хлорэтилсульфона с последующим получением поли(этиленгликоль)-винилсульфона из хлорэтилсульфона. Другие полимерные сульфоны, реакционноспособный участок которых находится у второго

от сульфоновой группы углеродного атома, получают аналогично, поэтому стадии такой процедуры должны быть очевидными для любого специалиста в данной области техники, если основываться на нижеприведенном примере 1 и полимерах, перечисленных выше.

Пример 1: Синтез

Стадии реакции можно проиллюстрировать с помощью нижеследующих схем:

(1) ПЭГ-ОН+CH₃SO₂Cl→ПЭГ-OSO₂CH₃;

(2) ПЭГ-OSO₂CH₃+HSCH₂CH₂OH→ПЭГ-SCH₂CH₂OH;

(3) ПЭГ-SCH₂CH₂OH+H₂O₂→ПЭГ-SO₂CH₂CH₂OH;

(4) ПЭГ-SO₂CH₂CH₂OH+SOCl₂→ПЭГ-SO₂CH₂CH₂Cl;

(5) ПЭГ-SO₂CH₂CH₂Cl+NaOH→ПЭГ-SO₂-CH=CH₂+HCl.

Каждая из вышеприведенных реакций подробно описана ниже.

Реакция 1.

Реакция 1 представляет собой получение метансульфонилового эфира полиэтиленгликоля, который можно также называть метансульфонатом или мезилатом полиэтиленгликоля. Тозилат и галогениды могут быть получены по аналогичным процедурам, которые очевидны любому специалисту в данной области техники.

Для получения мезилата двадцать пять граммов ПЭГ с молекулярной массой 3400 сушили азеотропной перегонкой в 150мл толуола. Во время сушки ПЭГ отгоняли приблизительно половину толуола. В толуол и раствор ПЭГ добавляли сорок миллилитров сухого дихлорметана с последующим охлаждением на ледяной бане. В охлажденный раствор добавляли 1,230мл дистиллированного метансульфонилхлорида, что составляет 1,06 весового эквивалента гидроксильных групп ПЭГ, и 2,664мл сухого триэтиламина, что составляет 1,3 весового эквивалента гидроксильных групп ПЭГ. Термин "весовой эквивалент", используемый выше, можно понимать как "совместный вес", относящийся к весу соединения, которое взаимодействует с эквивалентным весом гидроксильных групп ПЭГ.

Реакционную смесь оставляли на ночь, причем в течение этого промежутка времени она нагревалась до комнатной температуры. В осадок выпадал гидрохлорид триэтиламина, и этот осадок удаляли фильтрованием. После этого выпариванием в роторном испарителе объем массы уменьшали до 20мл. Добавлением в 100мл холодного сухого этилового эфира осаждали мезилат.

Ядерно-магнитный резонансный (ЯМР) анализ показал 100%-ную конверсию гидроксильных групп в мезилатные группы.

Реакция 2.

Реакция 2 представляет собой получение поли(этиленгликоль)-меркаптоэтанола взаимодействием мезилата с меркаптоэтанолом. Это взаимодействие вызывает вытеснение метансульфонатного радикала из ПЭГ. Серу меркаптоэтанолового радикала присоединяют непосредственно к углероду углерод-углеродной главной цепи ПЭГ.

Двадцать граммов мезилата из реакции 1 растворяли в 150мл дистиллированной воды. Раствор мезилата и воды охлаждали погружением в ледяную баню. В охлажденный раствор добавляли 2,366мл меркаптоэтанола, что составляло 3 весовых эквивалента гидроксильных групп ПЭГ. Добавляли также 16,86мл 2N NaOH. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 3ч, т.е. это означает, что пары, поднимающиеся из реакционной смеси, непрерывно конденсировали и возвращали в реакционную смесь.

Полученный поли(этиленгликоль)-меркаптоэтанол трижды экстрагировали дихлорметаном, используя каждый раз приблизительно 25мл дихлорметана. Органические фракции собирали и сушили над безводным сульфатом магния. Объем массы уменьшали до 20мл и продукт осаждали добавлением в 150мл холодного сухого диэтилового эфира.

ЯМР-анализ ПЭГ-SCH₂CH₂OH в d₆-DMCO, в диметилсульфоксиде, давал нижеследующие пики: 2,57 частей/млн, триплет, -CH₂-S-; 2,65 частей/млн, триплет, -S-CH₂-; 3,5 частей/млн, синглет главной цепи и 4,76 частей/млн, триплет, -OH. Гидроксильный пик при 4,76 частей/млн указывал на 81%-ное замещение. Однако пик 2,65 частей/млн для -S-CH₂- указывал на 100%-ное замещение. Согласно наблюдениям гидроксильные пики часто дают заниженные значения процентного замещения, поэтому пик 2,65 частей/млн для -S-CH₂- считают более достоверным и подтверждающим 100%-ное замещение.

Реакция 3.

Реакция 3 представляет собой окисление поли(этиленгликоль)-меркаптоэтанольного продукта перекисью с конверсией серы, S, в сульфон, SO₂. Получают ПЭГ-этанолсульфон.

Двадцать граммов ПЭГ-SCH₂CH₂OH растворяли в 30мл 0,123M раствора вольфрамовой кислоты и охлаждали на ледяной бане. Раствор вольфрамовой кислоты готовили растворением кислоты в растворе гидроксида натрия с pH 11,5 и с последующим доведением значения pH до 5,6 добавлением ледяной уксусной кислоты. В раствор вольфрамовой кислоты и поли(этиленгликоль)-меркаптоэтанола добавляли двадцать миллилитров дистиллированной воды и 2,876мл 30%-ной перекиси водорода, что составляло 2,5 весового эквивалента гидроксильных групп, и в течение ночи реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры.

Окисленный продукт трижды экстрагировали дихлорметаном, используя каждый раз по 25мл дихлорметана. Собранные органические фракции промывали разбавленным водным раствором бикарбоната натрия и сушили над безводным сульфатом магния. Объем массы уменьшали до 20мл. ПЭГ-этанол-сульфоновый продукт осаждали добавлением в холодный сухой этиловый эфир.

ЯМР-анализ ПЭГ-SO₂CH₂CH₂OH в d₆-DMCO, в диметилсульфоксиде, давал нижеследующие пики: 3,25 частей/млн, триплет, -CH₂-SO₂-; 3,37 частей/млн, триплет, -SO₂CH₂-; 3,50 частей/млн, главная цепь; 3,77

частей/млн, триплет, $-\text{CH}_2\text{OH}$; 5,04 частей/млн, триплет, $-\text{OH}$. Гидроксильный пик при 5,04 частей/млн указывал на 85%-ное замещение. Однако пик при 3,37 частей/млн для $-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ указывал на 100%-ное замещение, и его считают более достоверным.

Реакция 4.

Реакция 4 представляет собой заключительную стадию синтеза, выделения и определения характеристик поли(этиленгликоль)-хлорэтилсульфона.

Для синтеза этого продукта двадцать граммов ПЭГ- $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, поли (этиленгликоль)-этанолсульфона, растворяли в 100мл свежеперегнанного тионилхлорида и кипятили с обратным холодильником в течение ночи.

Тионилхлорид перегоняли над хинолином. Перегонкой удаляли избыток тионилхлорида. Добавляли пятьдесят миллилитров толуола и 50мл дихлорметана и удаляли перегонкой.

Для выделения продукта ПЭГ-хлорэтилсульфовый раствор растворяли в 20мл дихлорметана и осаждали добавлением в 100мл холодного сухого этилового эфира. Осадок перекристаллизовывали из 50мл этилацетата, выделяя конечный продукт.

Для определения характеристик этого продукта использовали ядерно-магнитный резонансный анализ. ЯМР-анализ ПЭГ- $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ в d_6 -ДМСО, в диметилсульфоксиде, давал нижеследующие пики: 3,50 частей/млн, главная цепь; 3,64 частей/млн, триплет, $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$; 3,80 частей/млн, триплет, $-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$. Небольшой гидроксильный триплет примеси появлялся при 3,94 частей/млн. Расчет процентного замещения для этого спектра был затруднен из-за близости важных пиков к очень большому пику главной цепи.

Реакция 5.

Реакция 5 представляет собой конверсию поли(этиленгликоль)-хлорэтилсульфона из стадии реакции 4 в поли(этиленгликоль)-винилсульфон и выделение и определение характеристик винилсульфонового продукта.

ПЭГ-винилсульфон легко получали растворением твердого ПЭГ-хлорэтилсульфона в дихлорметановом растворителе с последующим добавлением двух эквивалентов NaOH. Раствор фильтровали для удаления основания и растворитель выпаривали, выделяя в качестве конечного продукта ПЭГ- $\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, ПЭГ-винилсульфон.

Характеристики ПЭГ-винилсульфона определяли ЯМР-анализом в d_6 -ДМСО, в диметилсульфоксиде. ЯМР-анализ давал нижеследующие пики: 3,50 частей/млн, главная цепь; 3,73 частей/млн, триплет, $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$; 6,21 частей/млн, триплет, $=\text{CH}_2$; 6,97 частей/млн, дублет дублетов, $-\text{SO}_2-\text{CH}-$. Пик 6,97 частей/млн для $-\text{SO}_2-\text{CH}-$ указывал на 84%-ное замещение. Пик 6,21 частей/млн для $=\text{CH}_2$ указывал на 94 %-ное замещение. Титрование меркаптоэтанола и 2,2'-дитиодипиридином указывало на 95%-ное замещение.

Пример 2: Тиолселективная реакционная способность

Пример 2 показывает, что ПЭГ-винилсульфон и его предшественник ПЭГ-хлорэтилсульфон значительно более реакционноспособны в отношении тиоловых групп ($-\text{SH}$), чем аминогруппы ($-\text{NH}_2$) или иминогруппы ($-\text{NH}-$). Соединения, содержащие тиоловые группы, представляют собой органические соединения, схожие со спиртами, которые содержат гидроксильные группы $-\text{OH}$, за исключением того, что в тиолах кислородный атом гидроксильной группы заменен серой.

Тиолы иногда называют также сульфгидридами или меркаптанами. ПЭГ-винилсульфон содержит винилсульфовую группу $-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$. ПЭГ-хлорэтилсульфон содержит хлорэтилсульфовую группу $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$.

Селективность в отношении тиолов при модификации белка важна, поскольку это означает, что цистеиновые звенья (содержащие $-\text{SH}$) должны быть модифицированы предпочтительнее лизиновых звеньев (содержащих $-\text{NH}_2$) и гистидиновых звеньев (содержащих $-\text{NH}-$). Селективность ПЭГ-винилсульфона в отношении тиолов означает, что ПЭГ может быть селективно присоединен к цистеиновым звеньям, таким образом сохраняя активность белка в случае особых белков и регулируя число ПЭГ-молекул, присоединенных к белку.

Относительную реакционную способность ПЭГ-винилсульфона в отношении тиоловых и аминогрупп определяли измерением скоростей реакции ПЭГ-винилсульфона с N- α -ацетиллизинметиловым эфиром и с меркаптоэтанола. N- α -ацетиллизинметиловый эфир представляет собой лизиновую модель, содержащую аминогруппу, сокращенно представляемую как Lys-NH_2 . Меркаптоэтанол служит в качестве цистеиновой модели, содержащей тиоловую группу и сокращенно представляемую как Cys-SH . Аналогично определяли относительную реакционную способность ПЭГ-хлорэтилсульфона. Эта молекула может служить как "защищенная" форма винилсульфона, так как она стабильна в кислоте, но при добавлении основания конвертируется в ПЭГ-винилсульфон.

Реакционную способность ПЭГ-винилсульфона и ПЭГ-хлорэтилсульфонового предшественника изучали при значениях pH 8,0, 9,0 и 9,5. Буферами для регулирования pH служили 0,1М фосфат для pH 8,0 и 0,1М борат для pH 9,0 и 9,5. Для замедления конверсии тиола в дисульфид при измерении реакционной способности меркаптоэтанола в оба буфера добавляли 5мМ раствора этилендиамина тетрауксусной кислоты (ЭДТК).

Для каждого из трех уровней щелочных значений pH в ходе проведения взаимодействия ПЭГ-производных по изобретению с Lys-NH_2 в 0,3мМ раствор Lys-NH_2 в соответствующем буфере при перемешивании добавляли 3мМ раствор ПЭГ-производного. За взаимодействием наблюдали добавлением флуоресцамина в реакционный раствор с получением флуоресцентного производного в результате взаимодействия с аминогруппами. Эту стадию наблюдения осуществляли добавлением 50мкл реакционной смеси в 1,950мл фосфатного буфера с pH 8,0 с последующим добавлением при интенсивном перемешивании 1,0мл раствора флуоресцамина. Раствор флуоресцамина представлял собой 0,3 мг флуоресцамина на 1мл ацетона.

Флуоресценцию измеряли спустя 10мин после смешения. Возбуждение оказывалось видимым при длине

волны 390нм. Излучение света происходило при 475нм. При pH 8,0 в течение 24ч никакой реакции не наблюдали ни для ПЭГ-винилсульфона, ни для ПЭГ-хлорэтилсульфона. При pH 9,5 реакция протекала медленно, но по истечении нескольких дней все аминокислоты оказывались прореагировавшими.

В ходе проведения взаимодействия ПЭГ-винилсульфона и ПЭГ-хлорэтилсульфонового предшественника с Cys-SH для каждого из трех уровней щелочных значений pH 2мМ раствор ПЭГ-производного добавляли в 0,2мМ раствор Cys-SH в соответствующем буфере. За реакцией наблюдали добавлением в реакционный раствор 4-дителипиридина. Этот 4-дителипидин взаимодействует с Cys-SH с образованием 4-тиопиридона, который поглощает ультрафиолетовые лучи.

Стадию наблюдения осуществляли добавлением 50мкл реакционной смеси в 0,950мл 0,1М фосфатного буфера с pH 8,0, содержавшего 5мМ ЭДТК, с последующим добавлением в тот же самый буфер одного миллилитра 2мМ 4-дителипиридина.

Поглощение лучей 4-тиопиридоном измеряли при 324нм. ПЭГ-винилсульфон, а также ПЭГ-хлорэтилсульфон проявляли реакционную способность в отношении Cys-SH, причем ПЭГ-винилсульфон показывал более значительную реакционную способность. При pH 9,0 реакция завершается по истечении двух минут в случае использования винилсульфопа и по истечении 15мин в случае использования хлорэтилсульфона. Однако эти реакции оказывались слишком быстрыми для определения точных констант скорости. При pH 8,0 реакции протекали медленнее, но все же завершались в течение одного часа для винилсульфона и в течение трех часов для хлорэтилсульфона.

Конверсия хлорэтилсульфона в винилсульфон значительно медленнее взаимодействия винилсульфона с Cys-SH. Таким образом, скорость взаимодействия хлорэтилсульфона с Cys-SH зависит, по-видимому, от скорости конверсии хлорэтилсульфона в винилсульфон. Тем не менее скорость такой реакции все же намного выше скорости взаимодействия с Lys-NH₂.

Вышеописанные исследования кинетики показывают, что ПЭГ-винилсульфон намного более реакционноспособен с тиоловыми группами, чем с аминокислотными группами, а это свидетельствует о том, что присоединение ПЭГ-винилсульфона к белку, содержащему как цистеиновые, так и лизинозные группы, происходит преимущественно за счет взаимодействия с цистеином. Поскольку реакционная способность с аминокислотными группами идентична реакционной способности с аминокислотными группами, реакционная способность гистидиновых подзвеньев должна быть также намного меньше реакционной способности с цистеиновыми подзвеньями. Кроме того, селективность в отношении тиоловых групп очевиднее при пониженных значениях pH в случае ПЭГ-хлорэтилсульфо-на и ПЭГ-винилсульфона, хотя реакции ПЭГ-хлорэтилсульфона оказываются несколько более замедленными.

Применимость многих ПЭГ-производных ограничена, так как они быстро взаимодействуют с водой, препятствуя тем самым попыткам присоединить это производное к молекулам и поверхностям в водных условиях. Нижеприведенный пример 3 показывает, что ПЭГ-винилсульфон и ПЭГ-хлорэтилсульфон обладают стабильностью в воде.

Пример 3: Гидролитическая стабильность

ПЭГ-винилсульфон растворяли в тяжелой воде, в окиси дейтерия D₂O, и вели наблюдения с помощью ЯМР-анализа. Реакции не происходило. В тяжелой воде, в которую добавляли боратный буфер до pH 9,0, раствор ПЭГ-хлорэтилсульфона образовывал ПЭГ-винилсульфон. Наблюдения посредством ЯМР-анализа показали, что после образования ПЭГ-винилсульфон оставался стабильным в тяжелой воде в течение трех дней.

ПЭГ-хлорэтилсульфон остается в воде стабильным до тех пор, пока раствор не становится основным, после чего он превращается в винилсульфон. Конверсия в винилсульфон продемонстрирована растворением ПЭГ-хлорэтилсульфона в воде при pH 7 и в боратном буфере при pH 9. ПЭГ-производное экстрагируют хлористым метилом. Удаление хлористого метилена с последующим ЯМР-анализом показали, что ПЭГ-хлорэтилсульфон стабилен при нейтральном pH 7,0 и взаимодействует с основанием с образованием ПЭГ-винил сульфона.

Винилсульфон стабилен в воде в течение нескольких дней даже при щелочных значениях pH. Высокие гидролитическая стабильность и тиолспецифическая реакционная способность ПЭГ-винилсульфона означают, что ПЭГ-винилсульфон и его предшественник могут быть использованы для модификации молекул и поверхностей в водных условиях, как показано в нижеприведенном примере 4.

Пример 4: Конъюгирование с белком

Модификацию белка демонстрировали присоединением ПЭГ-производного к бычьему сывороточному альбумину (BSA) двумя различными методами. BSA представляет собой белок. Природный немодифицированный BSA включает цистеиновые группы, которые не содержат тиоловых групп. Цистеиновые звенья связаны как дисульфидные мостики, S-S.

В первом методе в течение 24ч в 0,1М боратном буфере при pH 9,5 и комнатной температуре проводили взаимодействие м-ПЭГ-винил сульфона с молекулярной массой 5000 с немодифицированным BSA. Раствор содержал 1мг BSA и 1мг м-ПЭГ-винилсульфона с молекулярной массой 5000 на каждый миллилитр раствора. Результаты использования модельных соединений примера 2 показали, что лизинозные подзвенья (и, возможно, гистидиновые подзвенья) должны быть модифицированы в таких относительно щелочных условиях и в отсутствии свободных тиоловых групп, доступных для взаимодействия.

Присоединение к лизиновым подзвеньям демонстрировали двумя путями. Во-первых, хроматография с вытеснением по размерам показала, что молекулярная масса белка увеличивалась приблизительно на 50%, что указывало, таким образом, на присоединение к белку примерно 10 молекул ПЭГ. Во-вторых, анализ с

флуоресцамином показал, что число лизиновых групп в молекуле БСА уменьшалось приблизительно на десять.

Во втором методе БСА обрабатывали трибутилфосфином для восстановления дисульфидных связей S-S до тиоловых групп, -SH, которые доступны для взаимодействия. Затем модифицированный БСА при pH 8,0 и комнатной температуре в 0,1М фосфатном буфере обрабатывали в течение 1ч ПЭГ-хлорэтилсульфоном. Раствор содержал 1мг модифицированного БСА и 1мг м-ПЭГ-хлорэтилсульфона с молекулярной массой 5000 на миллилитр раствора. Результаты показали, что лизиновые группы в таких условиях оказывались нереакционноспособными. Однако тиоловые группы проявляли реакционную способность.

Присоединение ПЭГ к белку демонстрировали хроматографией с вытеснением по размерам, которая показала увеличение молекулярной массы белка приблизительно на 25%. Анализ с флуоресцамином указывал на отсутствие изменений числа лизиновых подзвеньев в белке, подтверждая таким образом, что присоединения ПЭГ к лизиновым подзвеньям не происходило. Тем самым подтверждалось замещение тиоловых групп.

Заявляемое изобретение описано на примере конкретных вариантов его выполнения. Однако вышеприведенное описание не следует рассматривать как ограничивающее объем изобретения приведенными в качестве примеров вариантами выполнения, и для любого специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что в них можно вносить изменения, не выходя при этом за существо и объем изобретения, которое описано выше. Напротив, изобретение включает все варианты, модификации и эквиваленты, которые могут подпадать под фактический объем изобретения, определяемый прилагаемой формулой изобретения.

Формула винаходу

1. Водорастворимый гидролитически стабильный активированный полимер, содержащий по меньшей мере один активный сульфоновый остаток, присоединенный к полимеру, выбранному из группы, состоящей из полиалкиленоксидов, полиоксиэтилированных полиолов и полиолефиновых спиртов, где указанный по меньшей мере один активный сульфоновый остаток является

- а) активным этилсульфоновым остатком;
- б) $\text{SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$, где X обозначает галоген;
- в) винилсульфоновой группой, происходящей из активного этилсульфонового остатка;
- г) $\text{CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$;
- д) $\text{NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$.

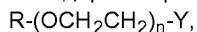
2. Водорастворимый полимер по п. 1, отличающийся тем, что полимер обладает гантельной структурой, включающей сульфоновый активный остаток по меньшей мере на одном конце главной полимерной цепи и активный остаток, который может быть таким же или отличным от указанного активного остатка на противоположном конце главной полимерной цепи.

3. Водорастворимый полимер по п. 2, отличающийся тем, что включает другой активный остаток на противоположном конце главной полимерной цепи, который реакционноспособен в отношении аминовых остатков.

4. Водорастворимый полимер по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один активный сульфоновый остаток способен образовывать связь с реакционноспособным остатком на поверхности биологически активной молекулы.

5. Водорастворимый полимер по п. 4, отличающийся тем, что реакционноспособный остаток представляет собой тиоловый остаток.

6. Водорастворимый полимер по п. 1, отличающийся тем, что имеет формулу



где n составляет 5-3000;

Y обозначает группу, выбранную из $\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$, и $\text{-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$, где X обозначает галоген, или производные этой группы;

R выбирают из группы, состоящей из HO- , $\text{H}_3\text{CO-}$, $\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$ и $\text{-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$, где X обозначает галоген.

7. Водорастворимый полимер по п. 1, отличающийся тем, что указанный полимер является полиэтиленгликолем.

8. Водорастворимый полимер по п. 6, отличающийся тем, что R представляет собой остаток, взаимодействующий с аминовым остатком, представленный группой $\text{X-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-}$, где X обозначает галоген.

9. Биологически активный конъюгат, состоящий из

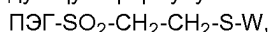
(а) одной, имеющей по меньшей мере одну реакционноспособную тиоловую группу, или двух биологически активных молекул, по меньшей мере одна из которых имеет реакционноспособную тиоловую группу, и

(б) водорастворимого гидролитически стабильного активированного полимера, содержащего по меньшей мере один активный сульфоновый остаток, присоединенный к полимеру, выбранному из группы, состоящей из полиалкиленоксидов, полиоксиэтилированных полиолов и полиолефиновых спиртов, где указанный по меньшей мере один активный сульфоновый остаток является

- а) активным этилсульфоновым остатком;
- б) $\text{SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$, где X обозначает галоген;
- в) винилсульфоновой группой, происходящей из активного этилсульфонового остатка;
- г) $\text{CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$;
- д) $\text{NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH=CH}_2$.

10. Биологически активный конъюгат по п. 9, отличающийся тем, что указанная биологически активная молекула является белком, имеющим цистеиновые группы.

11. Биологически активный конъюгат по п. 10, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет следующую формулу:



где W представляет собой биологически активную молекулу; и

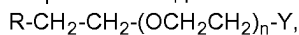
ПЭГ обозначает полиэтиленгликоль.

12. Биологически активный конъюгат по п. 9, отличающийся тем, что указанный конъюгат включает: две биологически активные молекулы, по меньшей мере одна из которых имеет реакционноспособный тиоловый остаток, а водорастворимый гидролитически стабильный активированный полимер представляет собой полимер с гантельной структурой, имеющий по меньшей мере один концевой активный сульфоновый остаток, который образует связь с тиоловым остатком указанной биологически активной молекулы, а другая биологически активная молекула образует связь с другим активным остатком на указанном полимере.

13. Биологически активный конъюгат по п. 12, отличающийся тем, что указанная биологически активная молекула выбрана из группы, включающей белки, фармацевтические вещества, клетки, витамины и их комбинации.

14. Биологически активный конъюгат по п. 13, отличающийся тем, что указанный биологически активный конъюгат включает водорастворимый полимер, имеющий активный сульфоновый остаток, который селективен в отношении реакции с тиоловым остатком, и активный остаток, который селективен в отношении реакции с аминным остатком, и два белка, причем первый белок, имеющий тиоловый остаток, который образует с сульфоновым остатком указанного полимера гидролитически стабильную связь, и второй белок, содержащий аминный остаток, у которого аминный остаток образует связь с другим активным остатком указанного полимера.

15. Биологически активный конъюгат по п. 9, отличающийся тем, что указанный гидролитически стабильный биологически активный конъюгат является продуктом взаимодействия 1) по меньшей мере одной биологически активной молекулы формулы W-SH, где W представляет собой остаток биологически активной молекулы, а SH-представляет собой реакционноспособный тиоловый остаток, и 2) производного полиэтиленгликоля, активированного одним или несколькими сульфоновыми остатками и имеющего формулу



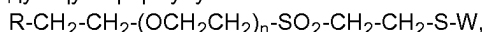
где n - составляет 5 – 3000;

Y обозначает -SO₂-CH=CH₂ или SO₂-CH₂-CH₂-X, где X обозначает галоген;

значения R выбирают из группы, состоящей из HO-, H₃CO-, X-CH₂-CH₂-SO₂-, где X обозначает галоген, и CH₂=CH-SO₂-, где реакционноспособный остаток присоединен к по меньшей мере одному активированному сульфоновому остатку.

16. Биологически активный конъюгат по п. 15, отличающийся тем, что указанная биологически активная молекула является белком, а реакционноспособный тиоловый остаток содержится в цистеиновом остатке указанного белка.

17. Биологически активный конъюгат по п. 15, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет следующую формулу:

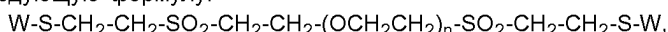


где n составляет 5-3000;

значения R выбирают из группы, состоящей из HO- и H₃CO-;

W представляет собой остаток биологически активной молекулы.

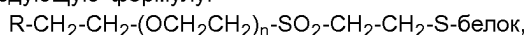
18. Биологически активный конъюгат по п. 15, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет следующую формулу:



где n составляет 5-3000;

W представляет собой остаток биологически активной молекулы.

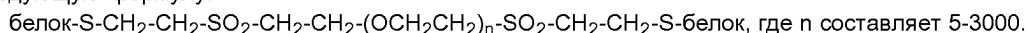
19. Биологически активный конъюгат по п. 15, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет следующую формулу:



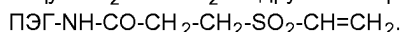
где n составляет 5-3000;

значения R выбирают из группы, состоящей из HO- и H₃CO-.

20. Биологически активный конъюгат по п. 15, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет следующую формулу:



21. Способ получения активированного полиэтиленгликоля, имеющего активную винилсульфоновую группу, предусматривающий взаимодействие активированного амином полиэтиленгликоля с молекулой, которая имеет сукцинимидильную активную эфирную единицу NHS-O₂C на одном терминальном конце и винилсульфоновую единицу -SO₂-CH=CH₂ на другом конце, с получением:



22. Способ получения активированного полиэтиленгликоля, имеющего активную винилсульфоновую группу, предусматривающий взаимодействие сукцинимидилового активного сложного эфира полиэтиленгликоля с молекулой, которая имеет аминогруппу -NH₂ на одном конце и винилсульфоновую группу -SO₂-CH=CH₂, с получением:

ПЭГ-CO-NH-CH₂-CH₂-SO₂-CH=CH₂.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2003, N 8, 15.08.2003. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U A 5 8 4 8 1 C 2

U A 5 8 4 8 1 C 2