



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96195836.7

[43]公开日 1998年9月2日

[11] 公开号 CN 1192152A

[22]申请日 96.5.24

[30]优先权

[32]95.6.6 [33]US[31]08 / 468,947

[86]国际申请 PCT / US96 / 07756 96.5.24

[87]国际公布 WO96 / 39160 英 96.12.12

[85]进入国家阶段日期 98.1.24

[71]申请人 生物测量公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 沙拉比·W·沙拉比

史蒂文·A·杰克逊

弗朗西斯·伊格内修斯

雅克-皮埃尔·莫罗

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图页数 0 页

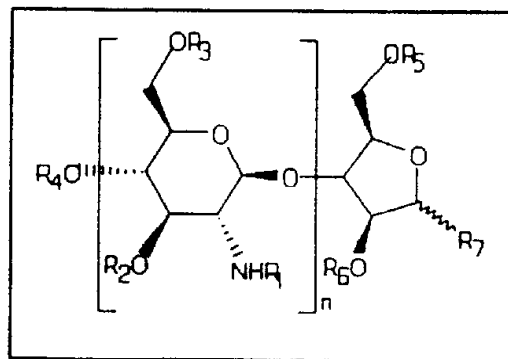
[54]发明名称 聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)的N-酰化衍生物和多肽的离子型分子缀合物

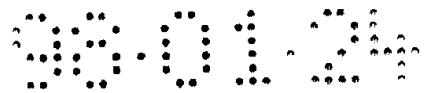
[57]摘要

一种包含 N-酰化衍生物的共聚物, 以及一种包含上述共聚物和一种多肽的组合物, 上述多肽至少包括一个有效离子化胺, 其中存在于上述组合物中的上述多肽的重量的至少百分之五十是以离子键合到上述聚合物。

权 利 要 求 书

1. 一种包括聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)的N-酰化衍生物的共聚物, 其中上述聚(S-氨基-X-脱氧-D-葡萄糖)百分之一到五十的自由胺由一种第一类酰化基团酰化, 上述第一类酰化基团是 COE₁, 其中 E₁ 选自 C₃₋₃₃ 羧烷基, C₃₋₃₃ 羧烯基, C₇₋₃₉ 羧芳烷基, 以及 C₉₋₃₉ 羧芳烯基, 上述聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)百分之五十到九十九的自由胺由一种第二类酰化基团酰化, 上述第二类酰化基团是 COE₂, 其中 E₂ 选自包括 C₁₋₃₀ 烷基, C₂₋₃₀ 烯基, C₆₋₃₇ 芳烷基以及 C₈₋₃₇ 芳烯基, 条件是上述聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)的至少一个自由胺由上述第一类酰化基团酰化, 并且上述聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)多至百分之三十的自由羟基由上述第一类酰化基团或上述第二类酰化基团酰化。
2. 权利要求1所述的一种共聚物, 其中上述共聚物通过凝胶渗透层析确定具有大约3,000到90,000道尔顿的分子量。
3. 权利要求1所述的一种共聚物, 其中上述聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)超过百分之九十的上述自由胺由上述第一类酰化基团或上述第二类酰化基团酰化。
4. 权利要求1所述的一种共聚物, 其中上述聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)百分之十到三十的上述自由胺由上述第一类酰化基团酰化。
5. 权利要求1所述的一种共聚物, 其中上述共聚物有下面的通式:





其中:

R_1 , 对于每一个单独的重复单元, 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

5 R_2 , 对于每一个单独的重复单元, 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

R_3 , 对于每一个单独的重复单元, 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

R_4 , 选自包括第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

R_5 , 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

10 R_6 , 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

R_7 , 选自 COH 和 CH_2OR_8 ;

R_8 , 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

n 在 2 和 200 之间; 并且

15 对于上述单元的百分之一到五十, R_1 是第一类酰化基团, 并且对于上述重复单元的百分之五十到九十九, R_1 是第二类酰化基团, 条件是对至少一个重复单元, R_1 是第一类酰化基团。

6. 权利要求 1 所述的一种共聚物, 其中上述第一类酰化基团是 COE_1 , 其中 E_1 是 $C_3 - C_{33}$ 羧烷基。

20 7. 权利要求 6 所述的一种共聚物, 其中上述第一类酰化基团是琥珀酰基。

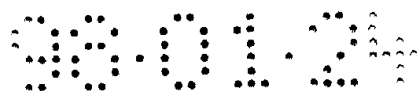
8. 权利要求 7 所述的一种共聚物, 其中上述第二类酰化基团是乙酰基并且 R_7 是 COH 或 CH_2OH 。

25 9. 一种含有上述权利要求 1 所述的共聚物和一种多肽的组合物, 上述多肽至少包括一个有效离子化胺, 其中至少百分之五十重量的存在于上述组合物中的多肽离子键合到上述聚合物。

10. 权利要求 9 所述的一种组合物, 其中上述组合物包含其重量百分之五到五十的上述多肽。

30 11. 含有上述权利要求 5 所述的共聚物和一种多肽的组合物, 上述多肽至少包括一个有效离子化胺, 其中至少百分之五十重量的存在于上述组合物中的多肽离子键合到上述共聚物。

12. 权利要求 11 所述的一种组合物, 其中上述组合物包含其重量百分之



五到五十的上述多肽。

13. 权利要求 12 所述的一种组合物，其中上述多肽是促生长素抑制素或一种促生长素抑制素类似物。

5 14. 权利要求 10 所述的组合物，其中上述第一类酰化基团是琥珀酰基并且上述第二类酰化基团是乙酰基。

15. 合成一种共聚物的方法，上述方法包括以下步骤：

用一种弱酸与脱乙酰几丁质反应产生一种低分子量多糖；

10 用一种第一类酰化试剂与上述低分子量多糖百分之一到五十的自由胺反应，上述第一类酰化试剂选自 $C_4 - C_{34}$ 聚羧烷烃， $C_4 - C_{34}$ 聚羧烯烃， $C_8 - C_{40}$ 聚羧芳烷烃， $C_{10} - C_{40}$ 聚羧芳烯烃，或其一种酰化衍生物；并且

用一种第二类酰化试剂与上述低分子量多糖百分之五十到一百的自由胺反应，上述第二类酰化试剂选自 $C_2 - 31$ 单羧烷烃， $C_3 - 31$ 单羧烯烃， $C_7 - 38$ 单羧芳烷烃， $C_9 - 35$ 单羧芳烯烃，或其一种酰化衍生物。

15 16. 权利要求 15 所述的一种方法，其中酰化的上述自由胺百分含量通过使用自由胺检测试剂测定。

17. 权利要求 15 所述的一种方法，其中上述第一类酰化试剂是琥珀酸酐，上述第二类酰化试剂是乙酸酐，并且上述弱酸是亚硝酸。

18. 合成一种组合物的方法，上述方法包括下列步骤：

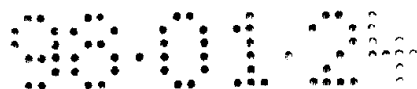
用一种弱酸与脱乙酰几丁质反应产生一种低分子量多糖；

20 用一种第一类酰化试剂与上述低分子量多糖百分之一到五十的自由胺反应，上述第一类酰化试剂选自 $C_4 - C_{34}$ 聚羧烷烃， $C_4 - C_{34}$ 聚羧烯烃， $C_8 - C_{40}$ 聚羧芳烷烃， $C_{10} - C_{40}$ 聚羧芳烯烃，或其一种酰化衍生物；

25 用一种第二类酰化试剂与上述低分子量多糖百分之五十到一百的自由胺反应，上述第二类酰化试剂选自 $COOH$ ， $C_2 - 31$ 单羧烷烃， $C_3 - 31$ 单羧烯烃， $C_7 - 38$ 单羧芳烷烃， $C_9 - 35$ 单羧芳烯烃，或其一种酰化衍生物；用一种碱中和上述酰化的低分子量多糖；并且把上述中和的低分子量酰化多糖与一种多肽盐混合，其中上述多肽盐至少包含一个离子化胺，以形成多肽-共聚物离子型缀合物。

30 19. 权利要求 18 所述的一种方法，其中酰化的上述自由胺百分含量通过使用自由胺检测试剂测定。

20. 权利要求 18 所述的一种方法，其中上述第一类酰化试剂是琥珀酸酐，上述第二种酰化试剂是乙酸酐，并且上述弱酸是亚硝酸。



说 明 书

聚(2 - 氨基 - 2 - 脱氧 - D - 葡萄糖)

的 N - 酰化衍生物和多肽

的离子型分子缀合物

5

已开发出聚合物药物递送系统用于多肽药物的控制释放。例如，使用以微囊，膜或棒状形式的诸如聚(DL - 乳酸)，聚(乙醇酸)，聚(乳酸 - 乙醇酸)，和聚(ϵ - 羟基己酸内酯)等合成聚酯来释放生物活性多肽。参看例如，美国

10

除了合成聚合物链之外，天然聚合物以及它们的衍生物也已用作类似的由酶降解解离的持续释放组合物的成分。此类天然聚合物的一个例子是那些基于几丁质，一种聚(N - 乙酰葡萄糖胺)的物质。然而，由于几丁质是水不溶的，有人检测了基本上基于一种部分去乙酰化的几丁质，例如脱乙酰几丁质的水溶性衍生物。参看例如，Sanford, P.A.等编辑，几丁质和脱乙酰几丁质

15

20

进展(Advances in Chitin & Chitosan)(1992)。虽然能在某些真菌中找到脱乙酰几丁质，生物可降解的脱乙酰几丁质的生产通常使用合成法。参看 Mima 等，应用聚合物科学杂志(J. Appl. Polym. Sci), 28: 1909 - 1917(1983)。还制备了脱乙酰几丁质的合成衍生物来改变聚合物的体内生物学特性。参看 Muzzarelli

等，碳水化合物研究(Carbohydrate Res.)207: 199 - 214(1980)。

已建议将几丁质以及几丁质衍生物用途用于许多药物传递系统。参看例如，欧洲专利申请第 486,959, 482,649, 525,813A1 和 544,000A1 号；以及美国专利第 5,271,945 号。

一方面，本发明特征有一种包括一种聚(2 - 氨基 - 2 - 脱氧 - D - 葡萄糖)的 N - 酰化衍生物的共聚物，其中聚(2 - 氨基 - 2 - 脱氧 - D - 葡萄糖)百分之一到五十的自由胺由一种第一类酰化基团酰化，第一类酰化基团是 COE₁，其中 E₁ 选自包括 C₃ - ₃₃ 羧烷基(Carboxyalkyl)，C₃ - ₃₃ 羧烯基(Carboxyalkenyl)，C₇ - ₃₉ 羧芳烷基(Carboxyaryalkyl)和 C₉ - ₃₉ 羧芳烯基(Carboxyarylalkenyl)的一类，并且聚(2 - 氨基 - 2 - 脱氧 - D - 葡萄糖)百分之五十到九十九的自由胺由一种第二类酰化基团酰化，第二类酰化基团是 COE₂，其中 E₂ 选自包括 C₁ - ₃₀ 烷基，C₂ - ₃₀ 烯基，C₆ - ₃₇ 芳烷基和 C₈ - ₃₇ 芳

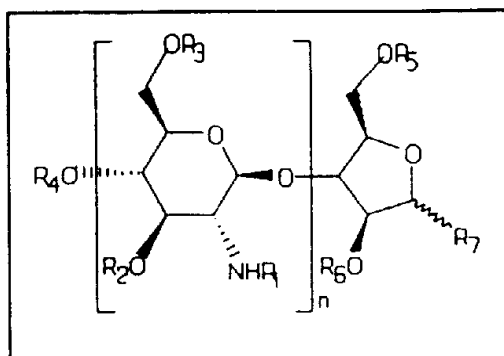
25

30

烯基的一类，条件是衍生物的至少一种自由胺由第一类酰化基团酰化，并且上述聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)多至百分之三十的自由羟基由第一类酰化基团或第二类酰化基团酰化。

5 用凝胶渗透层析或任何类似方法测定，共聚物优选地具有大约 3,000 到 90,000 道尔顿的分子量。在其它优选实施方案中，聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)超过百分之九十的自由胺由第一类酰化基团或第二类酰化基团酰化。优选地，聚(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)百分之十到三十的自由胺由第一类酰化基团酰化。衍生物的一些自由羟基(例如百分之一到三十)可能由第一类酰化基团或第二类酰化基团酰化。

10 在一个优选实施方案中，共聚物有下面的通式：



20

其中：

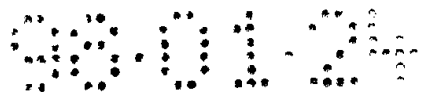
25 R₁，对于每一个单独的重复单元，选自第一类酰化基团，第二类酰化基团和氢；

R₂，对于每一个单独的重复单元，选自第一类酰化基团，第二类酰化基团和氢；

R₃，对于每一个单独的重复单元，选自第一类酰化基团，第二类酰化基团和氢；

30 R₄，选自第一类酰化基团，第二类酰化基团和氢；

R₅选自第一类酰化基团，第二类酰化基团和氢；



R_6 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

R_7 选自 COH 和 CH_2OR_8 ;

R_8 选自第一类酰化基团, 第二类酰化基团和氢;

n 在 2 和 200 之间; 以及

- 5 对于重复单元的百分之一到五十, R_1 是第一类酰化基团, 并且对于重复单元的百分之五十到九十九, R_1 是第二类酰化基团, 条件是对至少一个重复单元, R_1 是第一类酰化基团。

术语 COE_1 和 COE_2 分别代表 $-C=O \cdot E_1$ 和 $-C=O \cdot E_2$ 。取代基羧烷基, 羧烯基, 羧芳烷基和羧芳烯基可能含有 1 - 4 个羧酸官能度。第一
10 类酰化基团的实例包括, 但不限于, 琥珀酰, 2-(C_{1-30} 烷基)琥珀酰, 2-(C_{2-30} 烯基)琥珀酰, 马来酰, 邻苯二甲酰, 戊二酰以及亚甲基丁二酰。第二类酰化基团的实例包括, 但不限于, 乙酰, 苯甲酰基, 丙酰和苯乙酰。

本发明还特征性地有一种包括上述共聚物和一种多肽的组合物, 多肽至少包括一个有效的离子化胺, 其中存在于组合物中的多肽重量的至少百分之
15 五十以离子型连接到聚合物。优选地, 组合物包含其重量百分之五到五十的多肽。

合适的多肽举例包括生长激素释放肽(GHRP), 促黄体素释放激素(LHRH), 促生长素抑制素, 铃蟾肽, 促胃液激素(GRP), 降(血)钙素, 舒缓激肽, galanin, 促黑素(MSH), 生长激素释放因子(GRF), 生长激素(GH),
20 糊精, 速激肽, 肠促胰液肽, 甲状旁腺激素(PTH), 脑啡肽, 内皮素, 降钙素基因释放肽(CGRP), 神经介肽, 甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP), 胰高血糖素, 神经降压肽, 促肾上腺皮质激素(ACTH), 肽 YY(PYY), 胰高血糖素释放肽(GLP), 血管活性肠肽(VIP), 垂体腺苷酸环化酶活化肽(PACAP), 促胃动素, P 物质, 神经肽 Y(NPY), TSH 以及其生物活性类似物。术语“生
25 物学活性类似物”此处用于包括具有生理或治疗活性的天然存在的, 重组的, 以及合成的肽, 多肽和蛋白质。总的来说, 此术语包括表现出性质上与那些未修饰的或天然存在的肽, 蛋白或多肽有相似的激动或拮抗效应的所有片段及衍生物, 例如, 那些替代或删除掉存在于天然组合物中的一个或多个氨基酸残基的或结构性修饰其 N 或 C 末端残基的组合物。术语“有效的离子化胺”
30 是指存在于多肽上的能够与共聚物自由羧基形成离子键的自由胺。

可以通过改变组合物的化学结构调节多肽从组合物的释放。增加聚合物



的分子量将减小肽从缀合物的释放速率。增加聚合物上羧酸基团的数量将会增加多肽离子型连接到组合物的数量并从而增加肽从缀合物的释放数量。

5 多肽的释放可以进一步通过下述方法调节：(a)用二价或多价金属离子的弱酸可溶性盐处理组合物(例如，钙，铁，锰，或锌)；(b)采取用乙交酯共聚物或硅油制成的薄的可吸收膜把颗粒包被成球状，圆柱状或板状结构；或(c)用可吸收的乙交酯共聚物微囊把组合物包埋。在一个实施方案中，组合物包含其重量的百分之0.01和20之间的多价金属。

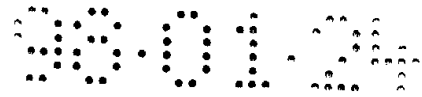
10 依赖于多肽的选择，组合物可用于治疗多种病症。例如，已表明促生长素抑制素，铃蟾肽，GRP，LHRH，及其类似物可治疗多种形式的癌。已表明诸如GH，GRF，和GHRP等生长因子可以刺激青年人或老年人的生长。已表明降钙素，糊精，PTH，和PTHrP以及其类似物可以治疗骨质疏松症和其它骨病。

组合物设计为肠胃外给药，例如，肌肉内，皮下，硬脑膜内，或腹膜内注射。优选地，组合物施用于肌肉内。

15 发明的组合物可以以粉末或微粒的形式与一种药学可接受载体(例如具有或不具有诸如甘露糖醇或多乙氧基醚等载体物质的水)作为悬浮剂给药。组合物也可以组合成棒状形式使用套管针进行肠胃外移植，例如肌肉内移植。

20 用于治疗上述疾病或病症的本发明组合物的剂量随着给药方式，受治者的年龄和体重以及健康状况而变化，并且最终由医师或兽医决定。由医师或兽医决定的组合物的量在此处作为“医疗有效量”。

另一方面，本发明特征有一种合成共聚物的方法，方法包括以下步骤：用一种弱酸与脱乙酰几丁质反应产生一种低分子量多糖；用一种第一类酰化试剂与低分子量多糖百分之一到五十的自由胺反应，第一类酰化试剂选自C₄-C₃₄聚羧烷烃，C₄-C₃₄聚羧烯烃，C₈-C₄₀聚羧芳烷烃，C₁₀-C₄₀聚羧芳烯烃或其酰化衍生物；用一种第二类酰化试剂与低分子量多糖百分之五十到一百的自由胺反应，第二类酰化试剂选自C₂-₃₁单羧烷烃，C₃-₃₁单羧烯烃，C₇-₃₈单羧芳烷烃，C₉-₃₅单羧芳烯烃或其酰化衍生物。可以用胺检测试剂(例如，荧光胺)测定低分子量多糖与第一类酰化试剂和第二类酰化试剂的反应，以保证低分子量多糖百分之一到五十的自由胺由第一类酰化试剂酰化并且低分子量多糖百分之五十到九十九的自由胺由第二类酰化试剂酰化。
30 参看，Bailey, P.D., 肽化学入门(An Introduction to Peptide Chemistry)(Wiley,



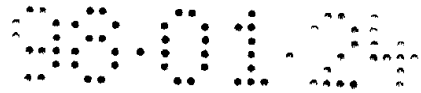
NY)(1990); Oppenheimer, H, 等, 生物化学生物物理学集刊(Archives Biochem. Biophys.)120: 108 - 118(1967); Stein, S, 生物化学生物物理学集刊(Arch. Biochem Biophys)155: 203 - 212(1973).

5 用弱酸(例如亚硝酸)与脱酰几丁质反应分解聚合物, 从而减小了分子量(例如, 2,500 - 80,000 道尔顿)。在优选实施方案中, 第一类酰化试剂和
10 第二类酰化试剂成功地与低分子量多糖反应, 例如, 第一类酰化试剂在第二类酰化试剂反应之前反应或第二类酰化试剂在第一类酰化试剂之前反应或二者同时。作为自由胺酰化的一个结果, 低分子量多糖的一些自由羟基也可能被酰化。自由羟基的酰化程度可以通过改变酰化反应中的 pH 或溶剂或试剂或使用的酰化试剂而变化。

酰化衍生物举例包括, 但不限于, 酞和 N - 酰化杂环(例如咪唑和吡唑)。参看, Bodansky 等, 肽合成操作规程(The Practice of Peptide Synthesis), 87 - 150(Springer - Verlag, 1984)。试剂聚羧烷烃, 聚羧烯烃, 聚羧芳烷烃和聚羧芳烯烃或它们的酰化衍生物包含或来源于包含 2 - 5 羧酸官能度的试剂。取代基单羧酸烷烃, 单羧酸烯烃, 单羧酸芳烷烃和单羧酸芳烯烃包含或来源于
15 仅包含一个羧酸基团的试剂。第一类酰化试剂实例包括, 但不限于, 琥珀酸酞, 2 - (C₁ - 30 烷基)琥珀酸酞, 2 - (C₂ - 30 烯基)琥珀酸酞, 马来酸酞, 戊二酸酞, 二甲基丁二酸酞, 以及苯二甲酸酞。第二类酰化试剂实例包括, 但不限于, 乙酸酞, 苯甲酸酞, N, N' - 二乙酰 - 3, 5 - 二甲基吡唑, N, N' - 二乙酰咪唑, 苯乙酸酞, 丙酸酞以及丁酸酞。
20

在另一方面, 本发明特征有一种合成一种组合物的方法, 方法包括下列步骤: 用一种弱酸与脱乙酰几丁质反应产生一种低分子量多糖; 用一种第一类酰化试剂与低分子量多糖百分之一到五十的自由胺反应, 第一类酰化试剂选自 C₄ - C₃₄ 聚羧烷烃, C₄ - C₃₄ 聚羧烯烃, C₈ - C₄₀ 聚羧芳烷烃, C₁₀ -
25 C₄₀ 聚羧芳烯烃或其酰化衍生物; 用一种第二类酰化试剂与低分子量多糖百分之五十到一百的自由胺反应, 第二类酰化试剂选自 C₂ - 31 单羧烷烃, C₃ - 31 单羧烯烃, C₇ - 38 单羧芳烃, C₉ - 35 单羧芳烯烃或其酰化衍生物; 用碱中和酰化的低分子量多糖; 把中和的低分子量酰化多糖与一种多肽盐混合, 其中多肽盐至少含有一个离子化胺, 以形成多肽 - 共聚物离子型缀合物。

30 中和步骤优选地使低分子量多糖在水中可乳化或溶解。在优选地实施方案中, 碱是一种无机碱(例如氢氧化钠)。多肽盐优选地是一种弱酸盐(例如,



乙酸盐, 乳酸盐, 或柠檬酸盐)。通过过滤或离心产生的混合液可分离到离子型缀合物。

5 发明的缀合物无需使用产生多相乳胶的方法即可容易地制成可注射的微球或微粒, 以及可移植的膜或棒。优选地, 微粒通过(a)把组合物溶解到一种质子惰性的, 水混溶的有机溶剂; (b)把有机溶剂混合于水; 以及(c)从水中分离微粒制成。在优选实施方案中, 有机溶剂选自丙酮, 乙腈, 四氢呋喃, 二甲基甲酰胺和二甲基乙二醇。

本发明的其它特征和优点显而易见于详细说明和权利要求。

10 本发明共聚物和共聚物-多肽离子缀合物的合成和应用在本领域普通技术人员的能力之内。除非特殊说明, 此处所用的所有技术和科学术语与本发明所属的技术领域普通技术人员的通常理解有相同含义。并且, 此文提及的所有出版物, 专利申请, 专利及其它文献以参考文献形式并入发明。

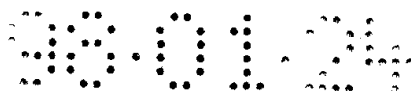
15 相信本技术领域熟练人员能在此处描述的基础上充分地使用本发明。从而, 下面的具体实施例仅作为加以解释的说明, 而不在任何意义上限制公开的其余部分。

实施例 1: 脱乙酰几丁质的解聚

20 脱乙酰几丁质(Protan, Inc., Portsmouth, NH)通过使用机械搅拌器搅拌一天溶于液体乙酸。用氮气鼓泡通过溶液, 同时加入亚硝酸钠溶液。半小时后, 溶液通过烧结玻璃漏斗过滤, 在减压下去除初始脱乙酰几丁质溶液中存在的不溶性颗粒。向滤液中加入氢氧化钠溶液, 溶液在甲醇中剧烈搅拌以沉淀聚合物。然后过滤产生的沉淀并用水和甲醇交替冲洗五次。然后在真空烘箱中 60 °C 两天烘干沉淀。解聚的脱乙酰几丁质在链的一端含有一个醛基。醛末端基团可通过 NaBH_4 反应还原为伯羟基。解聚产物可通过凝胶渗透层析(GPC)检测并与支链淀粉参照标准相比较确定它的分子量和分子量分布(MWD)。可
25 可以使用 NMR(核磁共振)和 IR(红外)检测确定解聚产物的 N - 酰化数量。

实施例 2: 解聚脱乙酰几丁质的部分琥珀酰化

来自实施例 1 的解聚合脱乙酰几丁质溶解于 0.1M 乙酸溶液。向此溶液中加入琥珀酸酐的丙酮溶液后再加入甲醇。产生的溶液在室温搅拌 24 小时。琥珀酰化完成后, 溶液随后沉淀到液体丙酮。产生的沉淀离心收集并用甲醇
30 洗五次。然后沉淀溶于 0.5M KOH 并对水透析至 pH 值为 7。然后把透析液减压浓缩, 在液体丙酮中沉淀, 并在真空烘箱中 60 °C 干燥。



5 为了获得不同水平的琥珀酰化，可以在酰化进行时通过测定未酰化胺基团的数量监测反应程度。未酰化胺基团的数量可以通过用一种胺检测试剂(例如荧光胺)猝熄(quenching)反应混合液的取出样品来确定。存在的胺数量可以使用共聚物标准曲线通过分光光度法测定。此外，可以连续加入琥珀酸酐，直到获得期望的酰化百分数。纯化产物的精确琥珀酰化程度可以使用 ^1H NMR 谱和电导滴定法确定。

实施例 3：N - 琥珀酰化的脱乙酰几丁质的乙酰化

10 来自实施例 2 的部分琥珀酰化样品溶解于 0.1M 乙酸溶液。然后向此溶液中加入甲醇和乙酸酐，并且在室温搅拌反应混合物一天。此溶液然后在液体丙酮中沉淀。产生的沉淀通过离心收集并用甲醇洗五次。然后把沉淀溶解于 0.1N KOH 并对水透析至 pH 为 7。冻干终溶液，获得终产物。酰化过程可以用如实施例 2 中讨论的分光光度法检测，并且可以使用 ^1H NMR 谱和电导滴定法确定纯化产物的精确酰化程度。

实施例 4：聚(N - 酰 - D - 葡萄糖胺) - 肽离子型缀合物的制备

15 实施例 3 中的 N - 琥珀酰化的脱乙酰几丁质钾盐溶解于水。把促生长素抑制素多肽类似物 SOMATULINETM(D - Nal - c[Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Val - Cys] - Thr - NH₂; Kinerton, Dublin, Ire(and)的乙酸盐水溶液加入到搅拌的聚合物溶液。形成沉淀并过滤以及在真空烘箱 40 °C 干燥。

20 产生的离子型缀合物中多肽的含量可以通过初始加入的肽量和滤液及清洗液中含有的自由残基肽量的差别确定。产生的离子型缀合物的肽含量可以通过比较初始 N - 琥珀酰化脱乙酰几丁质与产生的离子型缀合物的碳/氮比例确定。可以使用 GPC 检测确定分子量和 MWD，用差示扫描量热法(DSC)确定热特性以及用 NMR 和 IR 测定化学一致性。

其它实施例

25 必须知道当发明与其详细描述相结合进行说明时，前面的描述是为了说明而不是限制发明的范围，该范围是由附带的权利要求的范围确定。其它方面，优点，以及改变都在权利要求中。