



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101111267 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200580047507. 1

(22) 申请日 2005. 12. 21

(30) 优先权数据

60/639, 823 2004. 12. 21 US

60/705, 968 2005. 08. 04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 07. 31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/047337 2005. 12. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02006/069388 EN 2006. 06. 29

(73) 专利权人 尼克塔治疗公司

地址 美国亚拉巴马

(72) 发明人 A·科兹洛夫斯基 S·麦克曼努斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所 11038

代理人 唐晓峰

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

C07C 323/12 (2006. 01)

C07D 213/70 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1302209 A, 2001. 07. 04, 说明书第 6 页  
7-9 段.

CN 1511861 A, 2004. 07. 14, 权利要求 1-2,

7.

Francesco M. Veronese, J. Milton Harris. "Introduction and overview of peptide and protein pegylation". Advanced Drug Delivery Reviews vol 54 no. 4. 2002, vol 54(no. 4), 453-546.

Tatsuya Nabeshima et. al.. "Remarkably selective Ag+ extraction and transport by thiol-terminated poly(ethylene glycol) diethers". J. Org. Chem. vol. 61 No. 13. 1996, vol. 61 (No. 13), 4342-4343.

Clement Woghiren et. al.. "Protected thiol-polyethylene Glycol: A new activated polymer for reversible protein modification". Bioconjugate Chem. vol. 4 no. 5. 1993, vol. 4 (no. 5), 314-318.

Sandrine Cammas et. al.. "Heterobifunctional poly(ethylene oxide): Synthesis of alpha-methoxy-w-amino and alpha-hydroxy-w-amino PEOs with the same molecular weights". Bioconjugate Chem. vol. 6 no. 2. 1995, vol. 6 (no. 2), 226-230.

审查员 韦轶

权利要求书 2 页 说明书 36 页 附图 2 页

(54) 发明名称

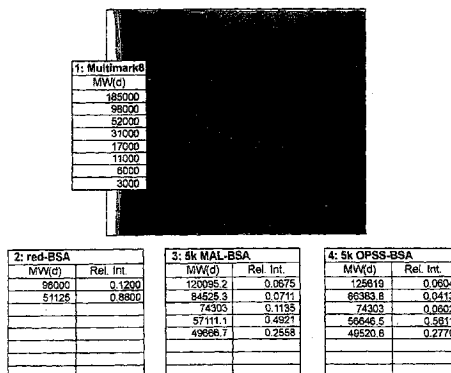
稳定的聚合物巯基试剂

(57) 摘要

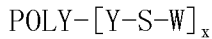
本发明公开了包含 POLY-[Y-S-W]<sub>x</sub> 结构的水溶性聚合物试剂, 其中 POLY 是水溶性聚合物; Y 是以碳氢化合物为基础的间隔基团, x 为 1-25, 以及 S-W 是巯基、被保护的巯基或巯基-活性衍生物。优选地, 水溶性聚合物是 PEG 聚合物。本发明还公开了这种聚合物试剂和药物相关分子的缀合物, 以及其制剂和应用的方法。

CN 101111267 B

5K MALemide 对 5K OPSS



1. 一种包括下述结构的水溶性聚合物试剂：



其中：

POLY 是分子量至少为 500 的聚乙二醇；

Y 具有式  $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$ ，其中 n 为 3-4，并且除了  $\text{R}^1$  在所述硫原子的邻位碳原子上，所述  $\text{R}^1$  为  $\text{C}_{1-6}$  烷基以外，每一个  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  为氢；

S 是连接到 Y 的  $\text{sp}^3$  杂化碳原子上的硫原子；

S-W 是巯基、保护的巯基或巯基 - 活性衍生物；并且

X 为 1-2。

2. 权利要求 1 所述的试剂，其中 S-W 是巯基 - 活性衍生物。

3. 权利要求 1 所述的试剂，其中 S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

4. 权利要求 1 所述的试剂，其中所述聚乙二醇的分子量为 500 至 100,000 道尔顿，其形态选自直链和多支链。

5. 权利要求 1 所述的试剂，其中所述  $\text{C}_{1-6}$  烷基是甲基或乙基。

6. 权利要求 5 所述的试剂，其中所述  $\text{C}_{1-6}$  烷基是甲基。

7. 权利要求 6 所述的试剂，其中 n 是 4，且 S-W 是 SH 或邻 - 吡啶基二硫化物。

8. 权利要求 7 所述的试剂，其中 x 是 1，并且聚乙二醇是以甲氧基为末端的聚乙二醇。

9. 权利要求 7 所述的试剂，其中 x 是 2。

10. 权利要求 8 所述的试剂，其中 S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

11. 权利要求 9 所述的试剂，其中 S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

12. 权利要求 1 所述的试剂，其中 n 是 4，且 S-W 是 SH 或邻 - 吡啶基二硫化物。

13. 权利要求 12 所述的试剂，其中 x 是 1，聚乙二醇是以甲氧基为末端的聚乙二醇。

14. 权利要求 12 所述的试剂，其中 x 是 2。

15. 权利要求 13 所述的试剂，其中 -S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

16. 权利要求 14 所述的试剂，其中 -S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

17. 权利要求 1 所述的试剂，其中 Y 是  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3))-$ ，S-W 是 SH 或邻 - 吡啶基二硫化物。

18. 权利要求 17 所述的试剂，其中 x 是 1，聚乙二醇是以甲氧基为末端的聚乙二醇。

19. 权利要求 17 所述的试剂，其中 x 是 2。

20. 权利要求 18 所述的试剂，其中 -S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

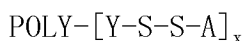
21. 权利要求 19 所述的试剂，其中 -S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

22. 权利要求 1 所述的试剂，其中 -S-W 是邻 - 吡啶基二硫化物。

23. 权利要求 1 所述的试剂，其中所示末端结构中每一个 mPEG 的分子量为 5KDa 至 20KDa。

24. 权利要求 1 所述的试剂，其中聚乙二醇的分子量为 1000-5000Da。

25. 一种包含下式结构的聚合物缀合物：



其中：

POLY 是分子量至少为 500 的聚乙二醇；

Y 具有式  $-(CR^1R^2)_n-$ , 其中 n 为 3-10, 并且除了  $R^1$  在所述硫原子的邻位碳原子上, 所述  $R^1$  为  $C_{1-6}$  烷基以外, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  为氢;

S-S 是连接到 Y 的  $sp^3$  杂化碳原子上的二硫基团;

A 是药物活性分子的共价连接残基; 并且

x 为 1-2。

26. 权利要求 25 所述的缀合物, 其中所述缀合物是水溶性的。

27. 权利要求 25 所述的缀合物, 其中所述聚乙二醇的分子量为 500 至 100,000 道尔顿, 其形态选自直链和多支链。

28. 权利要求 26 所述的缀合物, 其中所述  $C_{1-6}$  烷基是甲基。

29. 权利要求 25 所述的缀合物, 其中所述分子以其未缀合形式具有活性巯基基团, 且选自蛋白质、肽和药物活性小分子。

30. 权利要求 25 所述的缀合物, 其包括下述结构:

A-S-S-Y-POLY-Y-S-S-A。

31. 权利要求 30 所述的缀合物, 其中 Y 基团是相同的。

## 稳定的聚合物巯基试剂

### 发明领域

[0001] 本发明涉及从水溶性聚合物例如聚乙二醇得到的稳定性巯基聚合物试剂。特别是,本发明涉及巯基聚合物试剂、其缀合物以及利用这种缀合物的方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 由于近年来生物技术领域的进步,现在可以大规模生产治疗性蛋白质及其他生物分子例如抗体和抗体片段,使这些生物分子可以在更大程度上被利用。不幸的是,未修饰形式的潜在治疗性分子的临床有效性经常会被下述因素所妨碍:快速的蛋白质分解、生产、储藏或使用的不稳定性、或其免疫原性。

[0004] 可以通过和水溶性聚合物共价连接来克服这些不足,所述水溶性聚合物例如是聚乙二醇(PEG)。例如参见,Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem. 252(11):3579(1977); Davis, S. et al., Clin. Exp Immunol. 46:649-652(1981)。与未PEG化的相似物相比,PEG-修饰的蛋白质的生物学性质在很多情况下已显示出相当大的改善,所述PEG-修饰的蛋白质也称作PEG-缀合物或PEG化的蛋白质(Herman et al., Macromol. Chem. Phys. 195:203-209(1994))。由于增强了对蛋白质水解的抵抗力,聚乙二醇修饰的蛋白质已显示出在体内具有较长的循环时间,并具有增强的热稳定性(Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem. 252:3582-3586(1977))。其他生物分子例如抗体和抗体片段同样观察到了相似的生物效能的增强(Chapman, A., Adv. Drug Del. Rev. 54:531-545(2002))。

[0005] 通常适于修饰蛋白质的聚乙二醇具有活性末端基团,适于和氨基基团反应。这种活性PEGs或“聚合物试剂”包括PEG-醛(Harris, J. M. and Herati, R. S., Polym Prepr. (Am. Chem. Soc, Div. Polym. Chem.) 32(1):154-155(1991))、混合酸酐、N-羟基琥珀酰亚胺酯、羰基咪唑烷和chlorocyanurates(Herman, S. et al., Macromol. Chem. Phys. 195:203-209(1994))。然而,在某些情况下,通过蛋白质氨基基团连接聚合物可能是不期望的,例如特定赖氨酸残基的衍生化会使蛋白质失活(Suzuki, T. et al., Biochimica et Biophysica Acta 788:248-255(1984))。因此,如果有其他方法用于利用其他靶向氨基酸例如半胱氨酸通过PEG达到修饰蛋白质的目的,则将是有利的。在半胱氨酸的蛋白质巯基基团上进行连接具有下述优点:由于蛋白质中半胱氨酸在数量上不如赖氨酸多,因此当缀合到这些包含巯基的氨基酸时蛋白质失活的可能性会有所降低。所述的巯基选择性的活性聚合物例如是PCT公开文本WO 2004/063250所述的物质。

[0006] 聚合的巯基衍生物,特别是PEG巯基,是一种巯基选择性的活性聚合物。然而,很多已知的巯基聚合物对于氧化偶合具有高度敏感性,从而形成二硫化物,这是一种减少活性成分并增加清除杂质难度的降解过程。后者在利用这些材料制备生物缀合物时可能是特别大的难题。因此,如果能够提供较已知试剂具有更强稳定性的巯基聚合物试剂,将是非常有益的。

### 发明概要

[0007] 在一个方面,本发明提供了一种水溶性活性聚合物,也称之为“聚合物试剂”,其结

构为：

[0008] POLY-[Y-S-W]<sub>x</sub>

[0009] 其中：

[0010] POLY 是水溶性聚合物；

[0011] Y 是包含至少 4 个碳原子的二价连接基团，由具有 3-8 个碳原子长度且具有取代基的饱和或不饱和碳氢主链组成，其取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和本文所定义的无干扰取代基，其中主链不同碳原子上的两个此类烷基和 / 或烯基取代基可连接在一起形成环烷基、环烯基或芳基基团；

[0012] S 是连接到 Y 的 sp<sup>3</sup> 杂碳原子上的硫原子；

[0013] X 为 1-25；以及

[0014] S-W 是巯基、保护的巯基或巯基-活性的巯基衍生物。在一个具体实施方式中，S-W 是巯基-活性衍生物，例如邻位-吡啶基二硫化物 (OPSS)。

[0015] 当 x 是 2 时，所述试剂为双官能基聚合试剂，如下文将对此进行进一步说明；如本文所述，其可具有直链或“叉状”结构。如本文所述，特别是当 x 是 3 或更大时，聚合物试剂还可具有“多支链”结构。在选择性的具体实施方式中，x 为 1-8、1-6 或 1-4；在另一个具体实施方式中，x 是 1 或 2，或者 x 是 1。所述聚合物试剂的 POLY 组分本身可以选自下述形态：直链、支链、多支链及其组合，本文将对此作进一步说明。

[0016] 在一个特定的具体实施方式中，当 POLY 是直链聚乙二醇并且 Y 是直链烷基链时，POLY 的分子量至少为 500。

[0017] 在另一个具体实施方式中，POLY 的分子量至少为 1000，或者至少为 2000。作为上限，POLY 的分子量不得高于 300,000Da。

[0018] 连接基团 Y 的“碳氢主链”更优选是能够连接 POLY 和 S 的最短连续碳链。当 Y 的主链是不饱和时，其优选是单不饱和的，即只具有一个双或三碳-碳键。优选地，包括主链和取代基的间隔基团 Y 是单不饱和的，或者更优选地是完全饱和。在另一个具体实施方式中，包括主链和取代基的间隔基团 Y 由饱和的部分和芳香族部分组成。

[0019] 优选地，主链是饱和的。例如，Y 为 -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>- 形式，其中 n 为 3-8，每一个 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基，其中连接在不同碳原子上的两个基团 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 可以相连接形成环烷基或芳基。在选择性具体实施方式中，n 是 3-6，n 是 4-6，或者 n = 4，并且每一个 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 独立地选自氢和低级烷基，其中低级烷基优选甲基和乙基。

[0020] 在另外选择性具体实施方式中，Y 选自 C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> 亚烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> 环亚烷基及其组合，其任何一个可包括一个或多个无干扰取代基。

[0021] 优选地，最多包括一个或两个无干扰取代基，选自 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 环烷基、卤素、氰基、低级烷氧基和苯基，优选选自甲氧基、乙氧基、氟和氯。在一个具体实施方式中，取代基不包含杂原子；也就是说，连接基团 Y 由碳和氢组成。

[0022] 在一个优选的具体实施方式中，当 n 次重复 -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)- 时，R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 均为氢；在另一个优选的具体实施方式中，除了 R<sup>1</sup> 在所述硫原子的邻位碳原子上所述 R<sup>1</sup> 为低级烷基优选甲基或乙基 (α-支链) 外 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 均为氢。在一个具体实施方式中，α-支链基团是甲基。

[0023] 在 Y 的一个具体实施方式中，Y 是 -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>-，并且不同碳原子上的两个基团 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相连接形成环烷基、环烯基或芳基基团，环烷基优选环戊基或环己基。优选地，在这些具

体实施方式中, S 连接在 Y 的  $sp^3$  杂非环碳原子上。

[0024] 如上所述, POLY 可以是聚乙二醇 (PEG)。这种 PEG 的分子量通常为 148 (例如三聚体加连接的氧原子) 至约 200 至约 100,000 道尔顿。在选择的具体实施方式中, 聚乙二醇的分子量为约 200 至约 40,000 道尔顿。代表性的分子量包括例如 500、1000、2000、2500、3500、5000、7500、10000、15000、20000、25000、30000 和 40000 道尔顿。公开试剂的 PEG 成分本身可具有选自直链、支链、多支链及其组合的形态, 本文将对此作进一步说明。

[0025] 相应地, 本发明提供了一种水溶性聚合物试剂, 包括如下结构:

[0026]  $PEG-[Y-S-W]_x$

[0027] 其中:

[0028] PEG 是聚乙二醇聚合物;

[0029] Y 是由饱和或不饱和具有取代基的碳氢主链组成的二价连接基团, 其中所述碳氢主链为 3-8 个碳原子长度, 其取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和这里定义的无干扰取代基, 其中在主链不同碳原子上的两个此类烷基和 / 或烯基取代基可以连接形成环烷基、环烯基或芳基;

[0030] S 是连接到 Y 的  $sp^3$  杂碳原子上的硫原子;

[0031] x 为 1-25;

[0032] S-W 为巯基、保护的巯基或巯基-活性的巯基衍生物; 以及

[0033] 当 PEG 为直链, x 为 1, 以及 Y 是直链烷基链时, PEG 分子量至少为 500。

[0034] 如上文所述, 当 x 是 2 时, 试剂是双官能基聚合物试剂, 例如下文的详细说明, 并且如本文所述其可以具有直链或“叉状”形态结构。如本文所述, 特别是当 x 为 3 或更大时, 聚合物试剂还可具有“多支链”结构。在可选择的具体实施方式中, x 为 1-8、1-6 或 1-4; 在进一步的具体实施方式中, x 为 1 或 2, 或者 x 为 1。公开的试剂的 PEG 组分其本身的结构可选自直链、支链、多支链及其组合, 本文将对此作进一步说明。

[0035] 在优选的具体实施方式中, PEG 的分子量至少为 148, 至少为 200, 至少为 500, 至少为 1000, 或至少为 2000, 高达为约 100,000 道尔顿, 包括上述各种范围, 并且其结构选自直链、支链、叉状和多支链。S-W 优选为巯基-活性的巯基衍生物, 更优选邻-吡啶基二硫化物 (OPSS)。

[0036] 连接基团 Y 的“碳氢主链”更特别定义为连接 PEG 和 S 的最短连续碳链。优选地, 连接基团 Y 的主链是饱和的, 这样 Y 为  $-(CR^1R^2)_n-$ , 其中 n 为 3-8, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基, 其中不同碳原子上的两个基团  $R^1$  和  $R^2$  可以相连接形成环烷基或芳基。在可选择的具体实施方式中, n 是 3-6, n 是 4-6, 或  $n = 4$ , 并且每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢和甲基。

[0037] 在进一步的可选择具体实施方式中, Y 选自  $C_3-C_8$  亚烷基、 $C_5-C_8$  环亚烷基及其组合, 如上文所述, 其中任何一个可包括一个或多个无干扰取代基。优选地, 包括至少一个或两个无干扰取代基, 选自  $C_3-C_6$  环烷基、卤素、氰基、低级烷氧基和苯基, 优选选自甲氧基、乙氧基、氟和氯。在一个具体实施方式中, 不存在含杂原子取代基, 即连接基团 Y 由碳和氢组成。

[0038] 如上文所述, 在一个优选的具体实施方式中, 当 n 次重复  $-(CR^1R^2)-$  时, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  都为氢; 在另一个优选的具体实施方式中, 除了当  $R^1$  在所述硫原子邻位的碳原子上所述

$R^1$  为低级烷基优选甲基或乙基 ( $\alpha$ -支链) 以外, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  都为氢。在一个具体实施方式中,  $\alpha$ -支链基团为甲基。

[0039] 在 Y 的具体实施方式中, 其中 Y 是  $-(CR^1R^2)_n-$  并且在不同碳原子上的两个基团  $R^1$  和  $R^2$  相连接形成环烷基、环烯基或芳基基团, 该环烷基基团优选选自环戊基或环己基。优选地, 在此具体实施方式中 S 连接在 Y 的  $sp^3$  杂非环碳原子上。

[0040] 在一个举例的式 PEG-Y-S-W 试剂中, Y 是  $-(CR^1R^2)_n-$ , 其中每一个  $R^1$  和  $R^2$  是氢, n 为 4, S-W 为邻-吡啶基二硫化物 (OPSS), PEG 是以甲氧基为末端的聚乙二醇 (mPEG)。mPEG 的分子量优选为 5000-30000Da。在另一个举例的试剂中, PEG 和 SW 类似定义, n 为 3 或 4, 除了  $R^1$  在所述硫原子邻位的碳原子上所述  $R^1$  是甲基 (即, Y 是  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$  或  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ ) 以外, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢。

[0041] 水溶性聚合物试剂可以具有多官能基结构, 如下述结构式:

[0042]  $\text{POLY}-(\text{Y}-\text{S}-\text{W})_x$

[0043] 其中:

[0044] POLY 是水溶性聚合物;

[0045] x 为 2-25;

[0046] 每一个 Y 都是具有至少四个碳原子的二价连接基团, 由饱和或不饱和具有取代基的碳氢主链组成, 所述碳氢主链含有 3-10 个碳原子, 优选 3-8 个碳原子, 其取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和本文定义的无干扰取代基, 其中在主链不同碳原子上的两个这种烷基和 / 或烯基可以连接形成环烷基、环烯基或芳基;

[0047] 每一个 S 都是连接在 Y 邻位的  $sp^3$  杂碳原子上的硫原子; 和

[0048] 每一个 S-W 都独立地是巯基、保护的巯基或巯基-活性的巯基衍生物。

[0049] 优选地, 两个或多个 Y 基团是相同的; 两个或多个 W 基团通常也是相同的。非彼即此地, 特别是在双官能基试剂 ( $x = 2$ ) 中, 两个 SW 可以不相同; 例如一个 SW 是巯基或保护的巯基, 而另一个是巯基-活性衍生物, 或者一个 SW 是巯基或巯基-活性衍生物, 而另一个是保护的巯基。

[0050] 如上文所述, 当 x 为 2 时, 聚合物试剂可以具有直链或“叉状”结构。如本文所述, 特别是当 x 为 3 或更大时, 聚合物试剂还可为“多支链”结构。在可选择的具体实施方式中, x 为 2-8、2-6 或 2-4; 在一个具体实施方式中, x 为 2。公开试剂的 POLY 组分其本身可具有选自直链、支链、多支链及其组合的结构, 本文将对此作进一步说明。

[0051] 如上文所述, Y 的主链优选是饱和的, 这样每一个 Y 均为含有至少四个碳原子并含有  $-(CR^1R^2)_n-$  结构的连接基, 其中 n 为 3-10, 优选 3-8, 并且每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基, 其中不同碳原子上的两个  $R^1$  和  $R^2$  基团可以相连接形成环烷基或芳基。Y 和 POLY 的更优选具体实施方式通常为单体试剂  $\text{POLY}-\text{Y}-\text{S}-\text{W}$  中的上述定义。

[0052] 相应的以 PEG 为基础的多官能基聚合物试剂具有以下结构:

[0053]  $\text{PEG}-(\text{Y}-\text{S}-\text{W})_x$

[0054] 其中:

[0055] PEG 是聚乙二醇聚合物;

[0056] x 为 2-25;

[0057] 每一个 Y 均为二价连接基团,由饱和或不饱和具有取代基的碳氢主链组成,其包括 3-10 个,优选 3-8 个碳原子,所述取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和本文定义的无干扰取代基,其中在主链不同碳原子上的两个这种烷基和 / 或烯基可以连接形成环烷基、环烯基或芳基;

[0058] 每一个 S 都是连接在 Y 邻位的  $sp^3$  杂碳原子上的硫原子;并且

[0059] 每一个 S-W 独立地为巯基、保护的巯基或巯基-活性的巯基衍生物。

[0060] 优选地,多个 Y 基团是相同的;多个 W 基团通常也是相同的。Y 的主链优选是饱和的,这样每一个 Y 都是具有式  $-(CR^1R^2)_n-$  的连接基,其中 n 是 3-10,优选 3-8,并且每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基,其中不同碳原子上的  $R^1$  和  $R^2$  基团可以相连接形成环烷基或芳基基团。

[0061] Y 和 PEG 更优选的具体实施方式是如上文对于  $PEG-[Y-S-W]_x$  的定义。在可示范性的式  $W-S-Y-PEG-Y-S-W$  双官能基试剂中,每一个 Y 均为  $-(CR^1R^2)_n-$ ,其中每一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢,n 是 4,S-W 是邻-吡啶基二硫化物(OPSS),并且每一个 PEG 都是以甲氧剂为末端的聚乙二醇(mPEG)。mPEG 优选分子量为 1000-5000Da,例如约 2000 或约 3400Da。在进一步的示范性试剂中,PEG 和 SW 的定义与上文相似,n 是 3 或 4,除了  $R^1$  在所述硫原子的邻位碳原子上所述  $R^1$  为甲基以外,每一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢。

[0062] 在一个方面,本发明提供了一种聚合物缀合物,其结构为:

[0063]  $POLY-[Y-S-S-A]_x$

[0064] 其中:

[0065] POLY 是水溶性聚合物;

[0066] x 为 1-25;

[0067] Y 是由饱和或不饱和具有取代基的碳氢主链组成的二价连接基团,其中包含 3-10 个,优选 3-8 个碳原子,其取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和本文定义的无干扰取代基,其中在主链不同碳原子上的两个这种烷基和 / 或烯基可以连接形成环烷基、环烯基或芳基基团;

[0068] S-S 是连接在 Y 的  $sp^3$  杂碳原子上的二硫基;和

[0069] A 是一种药物活性分子的共价连接残基(如本文所述)。

[0070] 在可选择的具体实施方式中,x 是 1-8、1-6 或 1-4;在另一种具体实施方式中,x 是 1 或 2,或者 x 是 1。如本文所述,当 x 是 2 时,缀合物可具有直链或“叉状”结构。如本文所述,特别是当 x 是 3 或更大时,该缀合物也可以具有“多支链”结构。缀合物的 POLY 组分本身可具有选自直链、支链、多支链及其组合的结构,本文将对此作进一步介绍。

[0071] 优选地,所有的 Y 基团都相同。Y 的碳氢主链优选是饱和的,Y 结构为  $-(CR^1R^2)_n-$ ,其中 n 为 3-10,优选 3-8,每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基,其中不同碳原子上的两个  $R^1$  和  $R^2$  基团可以相连接形成环烷基或芳基基团。更优选地,Y 选自  $C_3-C_8$  亚烷基、 $C_5-C_8$  环亚烷基、芳基及其组合,其中任何之一都可包括一个或多个无干扰取代基。在一个具体实施方式中,Y 具有至少 4 个碳原子。

[0072] 在其他具体实施方式中,Y 是具有  $-(CR^1R^2)_n-$  结构的直链或支链亚烷基,其中 n 为 3-10,并且每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基。更优选地,n 为 3-8,或 3-6,并且每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢和甲基。在可选择的具体实施方式中,每

一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢。在另一个优选的具体实施方式中,除了  $R^1$  在所述二硫连接键的邻位碳原子上所述  $R^1$  为低级烷基,例如甲基或乙基以外,每一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢。

[0073] 其他的具体实施方式包括那些,其中 Y 是  $-(CR^1R^2)_n-$ ,其中 n 为 3-10,优选 3-8,不同碳原子上的两个  $R^1$  和  $R^2$  相连接形成环烷基或芳基,优选环烷基例如环戊基或环己基。

[0074] 优选水溶性聚合物 POLY 的分子量至少为 500,或至少为 1000。POLY 的分子量通常大于 200 并小于约 300K 道尔顿,优选小于约 200K 道尔顿,更优选小于约 100K 道尔顿。在一个具体实施方式中,POLY 是聚乙二醇,优选其分子量为 148 至约 200 至约 100,000 道尔顿,其结构选自直链、支链、叉状和多支链。在可选择的具体实施方式中,聚乙二醇的分子量为约 200 至约 40,000 道尔顿。通常分子量包括,例如,500、1000、2500、3500、5000、7500、10000、15000、20000、25000、30000 和 40000 道尔顿。

[0075] 连接到水溶性聚合物上的分子在其缀合形式中以 A 表示,A 在未缀合时含有一个活性巯基基团,并且优选选自蛋白质、肽和小分子,通常为有机小分子。

[0076] 优选缀合物本身是水溶性的。该缀合物在适当的药物赋形剂中或与药物赋形剂共同使用,所述适当的药物赋形剂例如是用于治疗应用的水性载体。

[0077] 在一个相关的方面,本发明提供了一种将具有活性巯基基团的药理活性分子传送至主体的方法,具体为向主体使用如上文所述的缀合物和药物可接受的载体。缀合物通常是通过将分子和本文所述的任何水溶性聚合物试剂相缀合进行制备。

[0078] 本发明活性聚合物试剂中以碳氢化合物为基础的片段 Y,是疏水性的,相对于已知试剂可有效地减少这些试剂二聚作用的趋势,所述的已知试剂中巯基例如通过二碳键连接在聚合物片段(或在连接部分中)的杂原子上。Y 在硫原子邻位碳原子上的分枝( $\alpha$ -分枝)可进一步有效地降低二聚作用。缀合物中以碳氢化合物为基础的片段 Y 还可减少分裂,例如邻近的二硫键在体内的酶分解,所述缀合物是利用这些试剂形成的。

[0079] 本文公开的试剂被进一步表征为“无连接基”试剂,也就是说,水溶性聚合物优选 PEG 直接连接在以碳氢化合物为基础的间隔基团 Y 上。在活性缀合官能基即巯基或保护的巯基和聚合物之间不存在含有杂原子的连接键会减少得到的缀合物降解的可能性,所述连接键例如是酰胺、酯或氨基甲酸酯。另外,在这些试剂中存在这些连接键例如酰胺可能引起有害的免疫应答。通过使用这种“无连接基”试剂可以消除或极大地降低这种可能性。

[0080] 如本文实施例 2 所示,本发明的巯基聚合物试剂对比试剂在合成条件下更加稳定,所述对比的试剂在亲水性聚合物(PEG)和巯基之间仅有一个二碳连接基。在实施例 9 和对比实施例 10 中同样显示出增加的稳定性。本发明巯基聚合物试剂的缀合行为与从已知没有二聚化作用的聚合物试剂(以马来酰亚胺为末端的聚合物)中观察到的相似,例如参见实施例 2。

[0081] 如果阅读了本发明下述详细描述和附图,本发明的这些和其他的目的及特征将会更加明显。

## 附图说明

[0082] 图 1 显示了本发明聚合物试剂和减少的 BSA 之间的缀合反应以及聚合物试剂  $mPEG_{5000}$ -马来酰亚胺和减少的 BSA 之间的相应缀合反应的 PAGE 分析,其中如实施例 1-2 所述本发明聚合物试剂命名为  $mPEG_{5000}$ -4C-OPSS:第 1 个,标准;第 2 个,减少的 BSA;第 3 个,

和 mPEG-MAL 的缀合 ;第 4 个,和 mPEG-4C-OPSS 的缀合。使用普通蓝安全染色剂对凝胶进行染色 ;和

[0083] 图 2 显示了使用碘钡染色后的图 1 凝胶,用于检测 PEG。

[0084] 发明详述

[0085] 定义

[0086] 本文使用的下述术语具有指定的含义。如在说明书和权利要求中所述,除非上下文另有清楚地说明,单个形式“一种 (a)”、“一种 (an)”、“该 (the)”包括复数指代物。

[0087] 本文所用的“PEG”或“聚乙二醇”指的是包括任意水溶性聚(环氧乙烷)。一般来说,用于本发明的 PEG 含有如下两种结构之一:  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  或  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ , 其中 m 通常为 2 至约 6000,更典型 4 或 5 至约 2500。广义地说,“PEG”可以指一种包含大多数例如超过 50% 亚单元的聚合物,所述亚单元指的是  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。优选地,超过 75%,超过 95%,或者实质上所有的单体亚单元均为  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。所有 PEG 的末端基团和结构可以变化。PEG 的一个末端可包含一个封端基团,其通常是含有 1-20 碳原子的含碳基团,优选选自烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环,及前述任意的取代形式。封端基团也可以是甲硅烷。封端基团在通常的合成反应条件下不容易发生化学转化。最优选的是烷基(烷氧基)或芳烷基(芳烷氧基)封端基团,例如甲基、乙基或苯甲基。

[0088] 封端基团还可有利地含有磷脂。当聚合物有封端基团例如磷脂时,其独特的性质(例如和相似的封端聚合物形成有机结构的能力)将赋予该聚合物。代表性的磷脂包括但不限于被称作磷脂酰胆碱的磷脂种类。特定的磷脂包括但不限于二月桂酰基磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱,二硬脂酰磷脂酰胆碱、behenoyl 磷脂酰胆碱、花生四烯酰磷脂酰胆碱和卵磷脂。

[0089] 封端基团还可有利地包括可探测性标记物。这种标记物包括但不限于荧光剂、化学发光剂、在酶标记中使用的物质、比色剂(例如,染料)、金属离子、放射性物质等等。

[0090] PEG 还可以以官能基团作为末端,所述官能基团例如下文所述,优选其保护形式。

[0091] 本发明中使用的特定 PEG 形式包括具有多种分子量、结构或几何形状的 PEG(例如,支链、直链、叉状、多支链)。

[0092] 参考聚合物的几何形状和总体结构,“支链”指的是有 2 个或多个聚合物“臂”的聚合物。一种支链聚合物可具有 2 个聚合物臂、3 个聚合物臂、4 个聚合物臂、6 个聚合物臂、8 个聚合物臂或更多。高支链聚合物的一种特定类型是树枝状聚合物或树状物,为了达到本发明目的,其被认为是具有与支链聚合物相区别的结构。“分枝点”指的是一个包含一个或多个原子的分叉点,在这个点上聚合物从直链结构上分裂或分枝形成一个或多个附加的聚合物臂。

[0093] “树状物”是球形的粒径单分散性聚合物,其中所有的键从中心焦点或核心成放射状分布,伴随有规则的分枝图形和重复单位,其各自对于分枝点都有贡献。树状物显示出一定的树状性质,例如封装核心,使其相对于其它类型的聚合物都是独特的。

[0094] 本发明所述聚合物上下文的“水溶性”或者“水溶性聚合物片段”,指的是在室温下可溶于水的任何片段或聚合物。一般来说,相对于过滤后的相同溶液,水溶性聚合物或片段可透过至少约 75%,更优选至少约 95% 的光。以重量为基础,水溶性聚合物或其片段因此优选有至少约 35% (重量) 溶于水,更优选至少约 50% (重量) 溶于水,更优选约 70%

(重量)溶于水,更优选约 85% (重量)溶于水。然而,最优选的是,水溶性聚合物或片断约 95% (重量)溶于水或完全溶于水。

[0095] 除非另有说明,聚合物的“分子量”或“分子重量”指的是数均分子量。数均分子量 ( $M_n$ ) 的定义为  $\sum N_i M_i / \sum N_i$ , 其中  $N_i$  是分子重量为  $M_i$  的聚合物分子的数量 (或这些分子的摩尔数量)。聚合物的数均分子量可通过渗透压力测定法、端基滴定和依数特性进行确定。重均分子量被定义为  $\sum N_i M_i^2 / \sum N_i M_i$ , 其中  $N_i$  是分子量  $M_i$  的分子数值。重均分子量可通过光散射、小角度中子散射 (SANS)、X-ray 散射和沉降速度进行确定。

[0096] 本发明聚合物或在本发明中应用的聚合物可为多元分散系;即,聚合物的数均分子量和重均分子量不相同。然而,多元分散值通常都很低,小于约 1.2, 优选小于约 1.15, 更优选小于约 1.10, 更优选小于约 1.05, 最优选小于约 1.03, 最优选小于约 1.025, 所述多元分散值为重均分子量 ( $M_w$ ) 和数均分子量 ( $M_n$ ) 的比值 ( $M_w/M_n$ )。

[0097] 术语“反应性”或“活性”指的是一种官能团,在常规的有机合成条件下能够很容易或者以一定速率进行反应。这与那些不能反应或者需要强催化剂或不切实际的反应条件才能反应的基团 (即“无活性”或“惰性”基团) 是相反的。

[0098] 当反应混合物中某分子上的官能团为“不容易反应”或“惰性”时,表明该基团在能够有效地进行所需反应的条件下在反应混合物中保持了大部分结构的完整。

[0099] “保护基团”是在特定的反应条件下能够预防或阻断分子上特定化学活性官能团的反应的部分。该术语还指官能团的一种保护形式。根据被保护的化学活性基团的类型以及进行反应的条件和分子上其他活性或保护基团的情况,保护基团会有所变化。可被保护的官能团包括,例如,羧酸基团、氨基基团、羟基基团、巯基基团、羰基基团等等。这些官能团的代表性保护形式包括:对于羧酸,酯 (例如 p-甲氧基苯甲酯)、酰胺和肟;对于氨基,氨基甲酸酯 (例如叔-丁氧基羰基或苄氧羰基) 和酰胺;对于羟基,醚和酯;对于巯基,硫醚和硫酯;对于羰基,缩醛和缩酮等等。这些保护基团对于本领域技术人员而言是已知的,并且记载于,例如 T. W. Greene 和 G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999, 该文献在此引用作为参考。

[0100] 巯基的“巯基-活性衍生物”是指能够与其他巯基发生反应的一种巯基衍生物,优选在温和的温度和中性或生理 pH 条件下能够形成二硫键。优选地,反应仅形成稳定的副产物。这类衍生物的代表性例子是邻-吡啶基二硫化物和 TNB-巯基衍生物 (其中 TNB 是 5-硫-2-硝基苯甲酸)。例如参见 Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996, pp 150-152。

[0101] 在本文中,术语“官能团”或其任何同义词包括其被保护形式或衍生物。相似地,术语“巯基试剂”或“巯基聚合物”包括被保护的或衍生的巯基试剂或聚合被保护的或衍生的巯基 (例如聚合物-OPSS)。

[0102] “生理可分裂的”或“可水解”或“可降解”键是一种相对较弱的键,其在生理条件下与水反应 (即水解)。键在水中的水解不仅取决于连接两个中心原子的键的类型,还取决于连接在这些中心原子上的取代基。适当的水解不稳定或弱键包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、邻酯、肽和寡核苷酸、硫酯、硫羟酸酯、和碳酸酯。“酶可降解键”指的是在一种或多种酶作用下可降解的键。

[0103] “实质上”或“基本上”是指将近全部或完全,例如总量的 95%、99% 或更多。

[0104] “烷基”指的是碳氢链,通常为 1-20 个碳原子长度。这类碳氢链优选但不必需是饱和的,可以是支链结构,或者优选直链(非支链)。烷基基团的例子包括乙基、丙基、丁基、戊基、2-甲基丁基、2-甲基丙基(异丁基)、3-甲基戊基等等。在本文中,当碳原子数为 3 个或更多时,“烷基”包括环烷基。“亚烷基”指的是二价烷基基团,例如  $-(CH_2)_x-$ 。

[0105] “低级烷基”指的是包含 1-6 个碳原子的烷基,更优选 1-4 个碳原子,例如甲基、乙基、n-丁基、异丙基和 t-丁基。

[0106] “环烷基”指的是饱和或不饱和的环状碳氢链,包括桥状、稠和或螺旋环状化合物,优选含有 3 至约 12 个碳原子,更优选 3 至约 8 个碳原子。“环亚烷基”是指二甲环烷基基团。

[0107] 在本文中,“烯基”是指含有 2-15 个碳原子,并且至少包括一个双键的支链或非支链碳氢基团,例如乙烯基、n-丙烯基、异丙烯基、n-丁烯基、异丁烯基、辛烯基、癸烯基、十四烯基等等。

[0108] 本文中术语“炔基”是指含有 2-15 个原子,并且至少含有一个三键的支链或非支链碳氢基团,例如乙炔基、n-丙炔基、异戊炔基、n-丁炔基、辛炔基、癸炔基等等。

[0109] “烷氧基”指的是  $-OR$  基团,其中 R 是烷基或取代的烷基,优选  $C_1-C_{20}$  烷基(例如甲氧基、乙氧基、丙氧基等等),更优选低级烷基(即  $C_1-C_6$  或  $C_1-C_4$ )。

[0110] “芳基”是指仅有一个环(例如苯基)或两个缩环或稠环(例如萘基)的取代或不取代单价芳香基。多个芳基环也可以是不稠和的(例如,二苯基)。该术语包括杂芳基,其为在环中含有一个或多个氮原子、氧原子或硫原子的芳香环,例如咪唑基、吡咯、吡啶和吲哚。

[0111] “芳烷基”是指进一步被芳基基团取代的烷基,优选低级( $C_1-C_4$ ,更优选  $C_1-C_2$ )烷基,例如是苯甲基和苯乙基。“芳烷氧基”指的是  $-OR$  形式的基团,其中 R 是芳烷基,一个例子是苯甲氧基。

[0112] “杂环”指的是这样一种环,优选为 5-7 元环,其环原子选择性地由碳、氮、氧和硫组成。优选地,环原子包括 3-6 个碳原子。芳香杂环(杂芳基)的例子如上文所述;非芳香杂环包括,例如,吡咯烷、哌啶、哌嗪和吗啉。

[0113] “被取代”的基团或部分是指其中的氢原子被非氢原子或基团所替代,优选是无干扰性取代基。

[0114] “无干扰取代基”是指当存在于分子中时和分子内包含的其他官能团无反应活性的基团。

[0115] 这些包括但不限于低级烷基、烯基或炔基,低级烷氧基, $C_3-C_6$  环烷基,卤素例如氟、氯、溴或碘,氰基,氧代(酮),硝基和苯基。

[0116] “残基”是指和一个或多个分子反应后,原分子上仍保留下来的那一部分。例如,本发明聚合物缀合物中的生物活性分子残基通常相当于生物活性分子部分但不包括由生物活性分子上的活性基团和聚合物试剂上的活性基团反应形成的共价键。

[0117] 术语“缀合物”是指由分子例如生物活性分子和活性聚合物分子共价结合形成的实体,所述聚合物分子优选是聚(乙二醇)。

[0118] 本文中“药物”、“生物活性分子”、“生物活性部分”、“生物活性剂”、“药物活性试剂”和“药物活性分子”都是指能够影响生物有机体任何身体或生物化学性质的任何物质,其中

有机体选自病毒、细菌、真菌、植物、动物和人类。特别是，在本文中生物活性分子包括能够诊断、减轻、治疗或预防人类或其他动物的疾病或者在其他方面能够增强人类或动物身体或心理健康的任何物质。生物活性分子的例子包括但不限于肽、蛋白质、酶、小分子药物、染料、脂质、核苷、寡核苷酸、多核苷酸、核酸、细胞、病毒、脂质体、微粒和胶束。适于在本发明中应用的生物活性剂的类别包括但不限于抗生素、杀菌剂、抗病毒剂、抗炎剂、抗肿瘤剂、心血管试剂、抗焦虑药、激素、生长因子、甾体等等。同时还包括食物、食品补充剂、营养素、营养制品、药物、疫苗、抗体、维生素和其他有益的物质。

[0119] “药物可接受的赋形剂”或“药物可接受载体”指的是可包含在本发明组合中并且对于患者不具有显著性毒副作用的赋形剂。

[0120] 本文中，“药理学有效剂量”、“生理学有效剂量”和“治疗有效剂量”是指为了在血流或靶组织中达到活性药物和 / 或缀合物的理想水平而在药物制剂中存在的聚合物 - 活性剂缀合物的用量。精确的剂量取决于很多因素，例如特定的活性物质、药物制剂组分和物理性质、预期的患者群、患者因素等等，本领域技术人员根据本文提供的信息和相关文献记载很容易能够确定剂量。

[0121] 术语“患者”是指正在发生或易于发生某种状况的生命体，所述状况通过使用生物活性剂或其缀合物能够进行预防或治疗，其包括人和动物。

[0122] 聚合的巯基试剂

[0123] 本发明的水溶性聚合物试剂包括下述结构：

[0124]  $\text{POLY}-(\text{Y}-\text{S}-\text{W})_x$

[0125] 其中：

[0126] POLY 是水溶性聚合物片段；

[0127] x 为 1-25；

[0128] Y 是包含至少 4 个碳原子的二价连接基团，由饱和或不饱和的含有取代基的碳氢主链组成，所述碳氢主链有 3-8 个碳原子，其取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和本文定义的无干扰取代基，其中在主链不同碳原子上的两个这种烷基和 / 或烯基可以连接形成环烷基、环烯基或芳基基团；

[0129] S 是连接到 Y 的  $\text{sp}^3$  杂碳原子上的硫原子；以及

[0130] S-W 是巯基（即 W 是 H）、保护的巯基或巯基 - 活性衍生物。

[0131] 在一个具体实施方式中，S-W 是巯基 - 活性衍生物，例如邻 - 吡啶基二硫化物 (OPSS)。保护的巯基包括，例如，硫醚例如 S- 苯甲基或 S- 三苯甲基醚和硫酯。

[0132] 需要注意的是，硫原子 S 是连接在 Y 的  $\text{sp}^3$  杂碳原子上，而不是芳环或双键上。在一个具体实施方式中，硫原子连接的碳原子有一个低级烷基取代基，例如甲基或乙基（ $\alpha$ -支链）。

[0133] 间隔基团 Y 的“主链”更具体地定义为连接 POLY 和 S 的最短连接碳链。在一个具体实施方式中，Y 的主链是饱和的。例如 Y 可以为  $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$ ，其中 n 为 3-8，优选 3-6，每一个  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基，并且  $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$  的不同碳原子上的两个  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  基团可以连接形成环烷基、环烯基或芳基基团。当 Y 包含环烷基基团时，其优选为五元或六元环烷基。

[0134] 在可选择的具体实施方式中，Y 选自  $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$  亚烷基以及  $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$  亚烷基和  $\text{C}_5$ - $\text{C}_8$  环亚烷

基或芳基的组合,其中任何一个都可以包括一个或多个无干扰取代基。优选地,至多一个或两个无干扰取代基选自 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 环烷基、卤素、氰基、低级烷氧基和苯基,优选选自甲氧基、乙氧基、氟和氯。在一个具体实施方式中,取代基不含有杂原子;也就是说,Y 由碳和氢组成。

[0135] 当 Y 的主链为不饱和时,其优选是单不饱和的,即仅有一个碳碳双键或三键。优选地,包括主链和取代基的间隔基团 Y 是单不饱和的,或者更优选是完全饱和的。在这种具体实施方式中,Y 可以是完全饱和的碳氢化合物。

[0136] 在另一个具体实施方式中,包括主链和取代基的间隔基团 Y 由饱和部分和芳香族部分组成,优选饱和和芳香族碳氢化合物部分。

[0137] 在此聚合物试剂中,当 Y 是  $-(CR^1R^2)_n-$  且对于 n 次重复  $-(CR^1R^2)-$  每一个 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 均为氢时,优选聚合物片段 POLY 的分子量至少为 500Da,特别是 POLY 为直链 PEG 并且上式中 x = 1 的情况下。POLY 的分子量还可大于 500Da,大于 750Da,或者大于 1000Da。如上文所述,可以使用很多种较大的分子量范围,高至约 300,000Da,更常为高至约 100,000Da。

[0138] 当 x 是 2 时,试剂是双官能基聚合物试剂,本文将对其作进一步说明,如本文所述,其可以为直链或“叉状”结构。如本文所述,特别是当 x 为 3 或更大时,聚合物试剂也可以为“多支链”结构。在可选择的具体实施方式中,x 是 1-8、1-6 或 1-4;在进一步的具体实施方式中,x 是 1 或 2,或者 x 是 1。所公开试剂的 POLY 部分本身可具有选自直链、支链、多支链及其组合的结构,本文将对此作进一步说明。

[0139] 在一个优选的具体实施方式中,水溶性聚合物片段是聚乙二醇,试剂结构为:

[0140]  $PEG-[Y-S-W]_x$

[0141] 其中:

[0142] PEG 是聚(乙二醇)

[0143] Y 是由饱和或不饱和具有取代基的碳氢主链组成的二价连接基团,主链含有 3-8 个碳原子长度,所述取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和本文定义的无干扰取代基,其中在主链不同碳原子上的两个这种烷基和 / 或烯基可以连接形成环烷基、环烯基或芳基基团;

[0144] S 是连接到 Y 的 sp<sup>3</sup> 杂碳原子上的硫原子;

[0145] x 为 1-25;以及

[0146] S-W 是巯基(即 W 是 H)、保护的巯基或巯基-活性衍生物。

[0147] 发明人已发现,在水溶性聚合物片段和水溶性巯基聚合物的巯基基团之间加入一个疏水性间隔基团能够降低分子二聚化作用形成二硫化物的趋势。制备这些试剂以及它们与其它分子缀合的产率都相应地有所增加,下文将证明这一点。

[0148] 本文所述的间隔基团以 3 个或更多碳原子的碳氢化合物为基础,优选包含至少 4 个碳原子,可包括支链碳(例如异亚丁烷基或 1-甲基亚丙基键)。虽然被描述为“以碳氢化合物为基础”,但间隔基团可包括数量有限的本文所述无干扰取代基。然而,优选间隔基团由碳和氢组成。

[0149] 在聚合物试剂的优选具体实施方式中,Y 是直链或支链亚烷基,结构为  $-(CR^1R^2)_n-$  其中 n 为 3-8,并且每一个 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基。优选地,包括 0-2 个,更优选包括 0 或 1 个无干扰取代基。

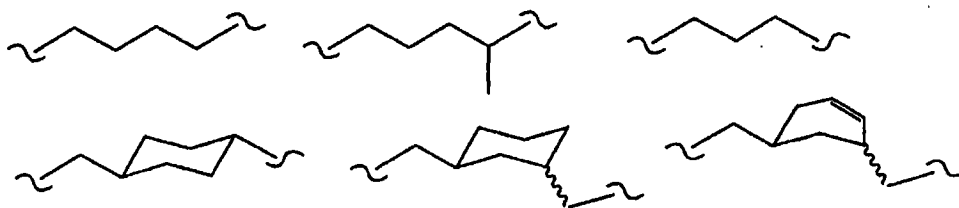
[0150] 优选地,n 为 4-8,更优选 4-6。在一个具体实施方式中,每一个 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 独立地选

自氢和甲基。在一个优选的具体实施方式中,在  $n$  次重复的  $-(CR^1R^2)-$  中,每一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢;在另一个优选的具体实施方式中,除了  $R^1$  在所述硫原子的邻位碳 ( $\alpha$ -碳) 上以外,每一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢,当  $R^1$  在所述硫原子的邻位碳 ( $\alpha$ -碳) 上时,所述  $R^1$  是低级烷基,优选甲基或乙基 ( $\alpha$ -支链)。在一个具体实施方式中, $\alpha$ -支链基团是甲基。

[0151] 在其中  $Y$  为  $-(CR^1R^2)_n-$  的  $Y$  的具体实施方式中, $n$  为 4-8,不同碳原子上的两个  $R^1$  和  $R^2$  基团相连接形成环烷基、环烯基或芳基,所述环烷基优选是环戊基或环己基。在此具体实施方式中,优选硫原子连接在  $Y$  的非环碳原子上。

[0152] 具有饱和主链的举例性间隔基团  $Y$  的结构包括(其中曲线代表的是和 POLY 或 S 连接的键,例如第一个结构式代表  $n$ -亚丁烷基):

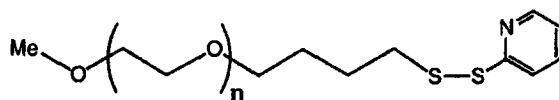
[0153]



[0154] 如上文所述,间隔基团的“主链”是将 POLY 连接至硫原子的最短的连续碳链。相应地,上述第二行每一个结构的主链上都有 5 个碳原子。另外,根据这一规定,所示最后一个结构的主链是饱和的,虽然间隔基团总体上来说并不饱和。

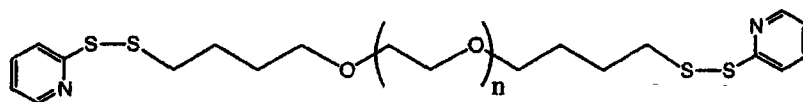
[0155] 在一个举例的聚合物试剂中,如下所述, POLY 是以甲氧基为末端的聚乙二醇 (mPEG),  $Y$  是  $-(CH_2)_4-$ ,  $-S-W$  是邻-吡啶基二硫化物 (OPSS),如下文所示,或者是 SH。优选 mPEG 的分子量为 5000-30000Da;例如,约 5000,约 10000,约 20000,或约 30000Da。

[0156]



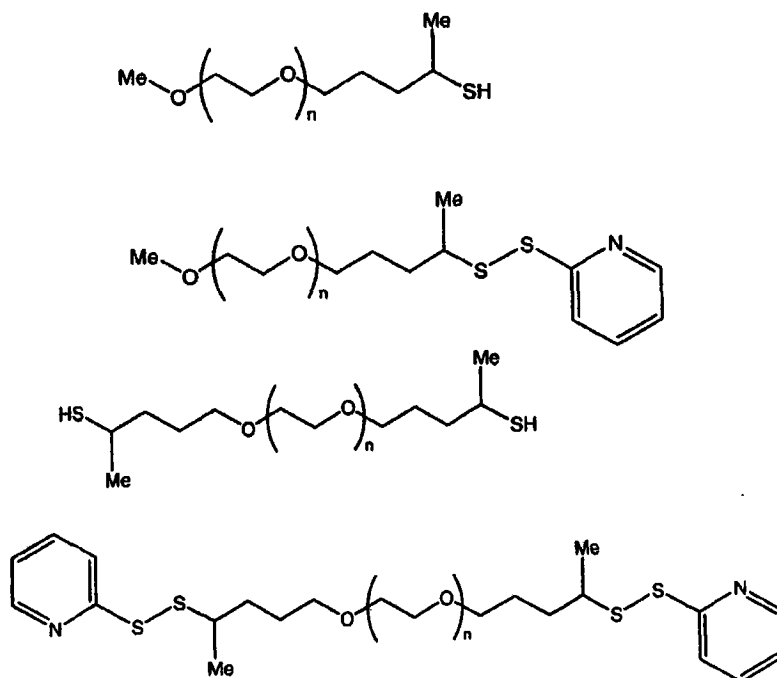
[0157] 在另一个具体实施方式中,聚合物试剂是双官能基,其结构为  $W-S-Y-POLY-Y-S-W$ ,其中 POLY、 $Y$  和  $S-W$  如上文所定义。一般来说,虽然不是必需的,该聚合物试剂是对称的。如下文所示,该结构的一个举例性聚合物试剂中, POLY 是聚乙二醇 (PEG),每一个  $Y$  均为  $-(CH_2)_4-$ ,每一个  $-S-W$  都是邻-吡啶基二硫化物 (OPSS),如下文所示,或者是 SH。优选 PEG 的分子量为约 1000-5000Da,例如,2000 或 3400Da。

[0158]



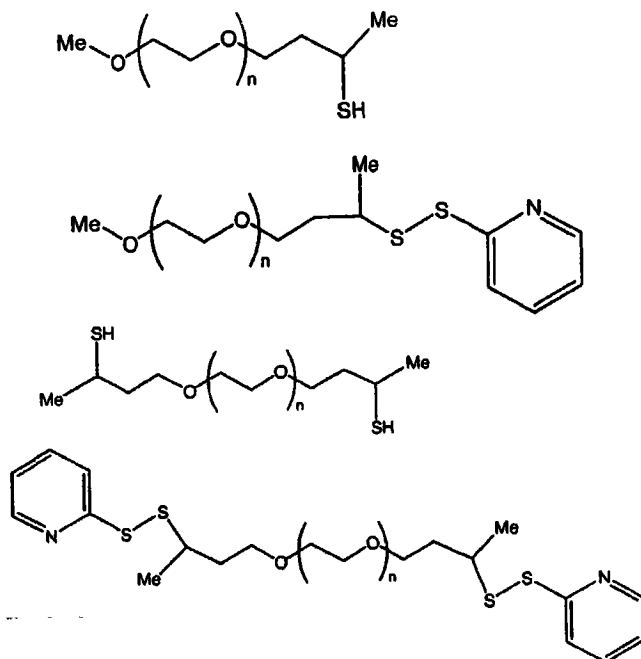
[0159] 聚合物试剂的其他例子包括通式  $PEG-[Y-S-W]_x$  所代表的试剂,其中  $x$  是 1 或 2,  $Y$  是  $-(CH_2CH_2CH_2CH(CH_3))-$ ,  $S-W$  是 SH 或邻-吡啶基二硫化物 (OPSS)。当  $x$  是 1 时,PEG 优选是以甲氧基为末端的聚乙二醇 (mPEG)。这类试剂如下文所示 (“Me”代表甲基):

[0160]



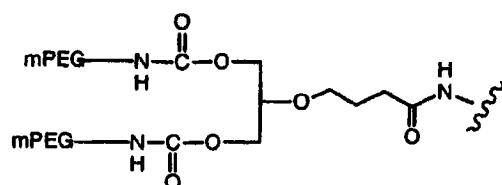
[0161] 聚合物试剂的其他例子包括通式 PEG-[Y-S-W]<sub>x</sub> 所代表的试剂, 其中 x 是 1 或 2, Y 是 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>))- , S-W 是 SH 或邻-吡啶基二硫化物 (OPSS)。当 x 是 1 时, PEG 优选是 mPEG。这些试剂如下文所示:

[0162]



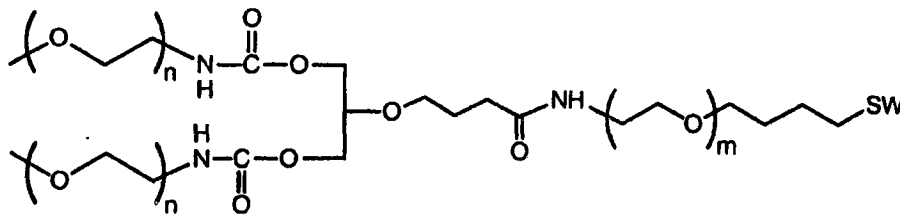
[0163] 聚合物试剂的其他例子如通式 PEG-[Y-S-W]<sub>x</sub> 所示, 其中 x 是 1, Y 是 -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -S-W 是 SH 或邻-吡啶基二硫化物 (OPSS), 并且 PEG 是以下述结构为末端的:

[0164]



[0165] 这类试剂如下述通式所示：

[0166]



[0167] 优选地,连接在 Y-SW 上的 PEG 的分子量约为 500Da 或更少,或者约 200Da 或更少。其中  $m = 2-10$ , 优选 2-4。在一个具体实施方式中,  $m = 4$ 。末端支链结构中的每一个 mPEG 优选分子量为约 5KDa 至约 20KDa ;例如  $n =$  约 110 至约 450。每一个 mPEG 的分子量例如可以为 5、10、15 或 20KDa。

[0168] 本文所述试剂的特点可描述为“无连接基”巯基,其中水溶性聚合物直接连接到以碳氢化合物为基础的间隔基团 Y 上。例如,聚(亚烷基)二醇中重复性亚烷基二醇单元的氧原子直接和 Y 相连接,其中所述重复性亚烷基二醇单元例如是 PEG 中的  $-CH_2CH_2O-$ 。在活性缀合官能团即巯基或保护的巯基和聚合物之间,特别是连接键例如酯、氨基甲酸酯或酰胺上不含有杂原子,降低了缀合的聚合物发生降解的可能性。另外,在这些试剂中存在包含这些杂原子的连接键例如酰胺,会引起有害的免疫反应。本发明的“无连接基”试剂消除或极大地降低了这一可能性。

[0169] 在聚合物试剂中,特别是在 POLY 为 PEG 的具体实施方式中,优选聚合物片段 POLY 的分子量为至少 500Da。聚合物片段 POLY 的各种优选具体实施方式将在下文作详细说明。优选地,聚合物片段“POLY”是聚亚烷基二醇,例如聚乙二醇 (PEG)。聚乙二醇可具有各种分子量,从约 88 至约 100,000 道尔顿,在上述限制范围内。在可选择的具体实施方式中,聚乙二醇的重均分子量为 148(例如三聚体加连接的氧原子)至约 200 至约 40,000 道尔顿。代表性的分子量包括,例如 500、1000、2000、3000、3500、5000、7500、10000、15000、20000、25000、30000 和 40000 道尔顿。通常而言,双官能基或多官能基试剂使用的 POLY 或 PEG 片段的分子量比单官能基试剂中使用的更低。

[0170] 聚合物结构可选自直链、支链、叉状、多支链及其组合,下文将对其作进一步描述。

[0171] 聚合物片段, POLY

[0172] 用于制备本发明聚合物试剂的代表性水溶性聚合物包括聚(亚烷基二醇)例如聚(乙二醇)、聚(丙二醇) (“PPG”)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(羟基烷基异丁烯酰胺)、聚(羟基烷基异丁烯酸酯)、聚(糖)、聚( $\alpha$ -羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉、和聚(N-丙烯酰基吗啉)。POLY 可以为上述任一物质的同型聚合物、交替的共聚物、任意的共聚物、阻断共聚物、交替的三聚物、任意的三聚物或阻断的三聚物。水溶性聚合物片段优选为聚(乙二醇) (“PEG”) 或其衍生物。

[0173] 优选地,聚合物是亲水性聚合物;即,包含少于约 25 个丙烯氧化物亚单元或其他类似疏水性聚合物片段的聚合物。在任选的具体实施方式中,聚合物可以不含有丙烯氧化物或类似的疏水性单元。在一种情况中,聚合物优选不是 pluronic 类聚合物。然而在另一个特定的具体实施方式中,优选聚合物不和固相载体相连接。

[0174] 聚合物片段可以为数种不同的几何形状任意之一,例如 POLY 可以是直链、支链或多支链。更典型地, POLY 是直链或支链,例如具有 2 个聚合物臂。虽然本文中很多谈论的

焦点是用作举例 POLY 的 PEG,但本文中的说明和结构很容易被扩展到包含任何上述水溶性聚合物片段。

[0175] 虽然本文中举例使用和注解的水溶性聚合物仅有一个或两个巯基官能团,但也可以使用有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多个这种官能团的聚合物。有关与水溶性聚合物片段相关的巯基数目的上限,非限制性的例子包括约 1 至约 500,1 至约 100,约 1 至约 80,约 1 至约 40,约 1 至约 20,约 1 至约 10。

[0176] 水溶性聚合物、PEG 的优选类型包括直链、支链或多支链形式的聚(乙二醇),包括封端 PEG、叉状 PEG、支链 PEG、悬挂 PEG 和包含一个或多个可降解键的 PEG,所述可降解键分离单体亚单元,下文将对此进行详细说明。PEG 聚合物片段中重复的乙二醇单元的数量通常为约 3 至约 4,000,约 12 至约 3,000 或者更优选约 20 至约 1,000。

[0177] 封端 PEG 优选具有封端的部分,例如烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基、取代的芳氧基。优选的封端基团是  $C_1-C_{20}$  烷氧基例如甲氧基、乙氧基、和苯甲氧基。封端基团还可有利地包括磷脂。磷脂的例子包括磷脂酰胆碱例如二月桂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、山萘磷脂酰胆碱、花生四烯酰磷脂酰胆碱和卵磷脂。

[0178] 未硫醇化的聚合物末端可包括反应活性部分,作为封端基团的一种替代选择,优选为被保护形式。这种活性基团的例子包括羟基、氨基、酯、碳酸酯、醛、缩醛、醛水合物、酮、缩酮、酮水合物、烯基、丙烯酸酯、异丁烯酸酯、丙烯酰胺、砜、羧酸、异氰酸酯、异硫氰酸酯、肼、脒、马来酰亚胺、乙烯基砜、二硫吡啶、乙烯基吡啶、碘乙酰胺、烷氧基、苯甲氧基、甲硅烷、脂质、磷脂、生物素、和荧光黄,适当时包括其活化和被保护形式。优选官能团例如是 N-羟基琥珀酰亚胺酯、1-羟基苯并三唑碳酸酯、胺、乙烯基砜、马来酰亚胺、N-琥珀酰亚胺碳酸酯、肼、琥珀酰亚胺丙酸酯、琥珀酰亚胺丁酸酯、琥珀酰亚胺琥珀酸酯、琥珀酰亚胺酯、缩水甘油醚、氧羰基咪唑、p-硝基苯基碳酸酯、乙醛、邻吡啶-二硫化物和丙烯醇。

[0179] 本文中描述了这些及其他的官能团,例如在下述的参考文献中,所有的参考文献均在此引用作为参考:N-succinimidyl carbonate(U. S. Patent Nos. 5, 281, 698 and 5, 468, 478), amine(Buckmann et al., Makromol. Chem. 182 :1379(1981);Zalipsky et al., Eur. Polym. J. 19 :1177(1983)), hydrazide(Andresz et al., Makromol. Chem. 179 :301(1978)), succinimidyl propionate and succinimidylbutanoate(Olson et al., in poly(ethylene glycol):Chemistry &Biological Applications, pp. 170-181, Harris & Zalipsky, Eds., ACS, Washington, DC(1997);U. S. Patent No. 5, 672, 662), succinimidyl succinate(Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys. 7 :175(1984) and Joppich et al., Makromol. Chem. 180 :1381(1979)), succinimidyl ester(U. S. Patent No. 4, 670, 417), benzotriazole carbonate(U. S. Patent No. 5, 650, 234), glycidylether(Pitha et al., Eur. J. Biochem. 94 :11(1979);Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13 :354(1991)), oxycarbonylimidazole(Beauchamp et al., Anal. Biochem. 131 :25(1983);Tondelli et al., J. Controlled Release 1 :251(1985)), p-nitrophenyl carbonate(Veronese et al., Appl Biochem. Biotech. 11 :141(1985); Sartoret et al., Appl. Biochem. Biotech. 27 :45(1991)), aldehyde(Harris et al., J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22 :341(1984);U. S. Patent No. 5, 824, 784;U. S. Patent

5, 252, 714), maleimide (Goodson et al., Bio/Technology 8 :343 (1990) ;Romani et al., in Chemistry of Peptides and Proteins 2 :29 (1984) ;Kogan, Synthetic Comm. 22 : 2417 (1992)), orthopyridyl-disulfide (Woghiren et al., Bioconj. Chem. 4 :314 (1993)), acrylol (Sawhney et al., Macromolecules 26 :581 (1993)), and vinylsulfone (U. S. Patent No. 5, 900, 461)。

[0180] 本文所述 POLY 的类型包括直链聚合物片段以及支链或多支链聚合物片段。例子包括有 2、3、4、5、6、7、8 或更多个支链的 PEG 分子。用于制备本发明巯基聚合物的支链聚合物可以在任何位置具有 2-300 个左右活性末端。优选的是具有 2-8 个聚合物臂的支链或多臂 PEG。在制备本发明巯基聚合物中使用的支链或多臂聚合物包括以式  $R(\text{POLY})_n$  表示的化合物, 其中 R 是中心或核心分子, 从其中可延伸出 2 个或多个 POLY 臂例如 PEG。变量 n 代表 POLY 臂的数量, 其中每一个聚合物臂可独立地为封端或者在末端具有羟基或其他活性基团, 其中至少一个聚合物臂具有这样的活性基团。支链 PEG 例如由  $R(\text{PEG})_n$  所代表的化合物, 具有至少 2 个、高至约 300 个聚合物臂 (即, n 的范围为 2 至约 300)。优选地, 这种支链 PEG 具有 2 至约 25 个聚合物臂, 更优选 2 至约 20 个聚合物臂, 更优选 2 至约 15 个聚合物臂或更少。最优选具有 3、4、5、6、7 或 8 个臂的多支链聚合物。

[0181] 上文所述的支链 PEG 中优选的核心分子是多醇。这种多醇包括具有 1-10 个碳原子和 1-10 个羟基基团的脂肪族多醇, 包括乙二醇、烷二醇、烷基二醇、亚烷基烷基二醇、烷基环烷二醇、1,5- 萘烷二醇、4,8- 二 ( 羟基甲基 ) 三环癸烷、亚环烷基二醇、二羟基烷、三羟基烷、四羟基烷等等。还有, 上述类别的部分或全部的醚可作为核心分子, 包括二季戊四醇、三季戊四醇、六甘油等等。也可以使用环脂肪族多醇, 包括直链或封闭环的糖以及糖醇, 例如甘露醇、山梨糖醇、肌醇、木糖醇、白坚木醇、蔗糖醇、阿拉伯糖醇、赤藻糖醇、核糖醇、ducitol、facose、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、山梨糖、甘露糖、吡喃糖、醛糖、塔罗糖、tagitose、吡喃糖苷、蔗糖、乳糖、麦芽糖、等等。其他的脂肪族多醇包括甘油醛、葡萄糖、核糖、甘露糖、半乳糖及相关立体异构体的衍生物。其他可使用的核心多醇包括冠状醚、环糊精、糊精及其他碳氢化合物例如淀粉和直链淀粉。优选的多醇包括甘油、季戊四醇、山梨糖醇和三甲醇丙烷。

[0182] 本发明巯基聚合物的多支链结构可表示为  $R-(\text{POLY}-Y-S-W)_x$ , 其中 POLY、Y 和 S-W 如上文所定义, R 代表多支链结构的核心分子, x 优选为 3 至约 8。每一个聚合物支链可独立地是封端或在其末端具有巯基基团, 其中至少一个聚合物支链具有巯基 ( 或被保护的巯基 ) 基团。适于制备此结构的多支链 PEG 可以从 Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama) 获得。

[0183] 任选地, 聚合物片段可具有所有的叉状结构, 例如  $\text{PEG}-(Y-S-W)_2$ 。根据 Y 的选择, 这种类型的聚合物片段可以和两个活性试剂反应, 其中这两个活性试剂分开有精确或预定的距离。

[0184] 用于制备本发明缀合物的代表型 PEG 可以从 Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama) 购得, 其中 PEG 具有直链或支链结构。用作说明的结构记载于 Nektar 2004 产品目录中, 题目为 "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", 这篇文章的内容在此引用作为参考。

[0185] 在本文的任何一个代表型结构中, POLY 片段中可包含一个或多个可降解键, 以在

体内产生缀合物,所述缀合物比最开始使用的缀合物具有更小的POLY链。适当的生理学分解键包括但不限于酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、硫酸酯、磷酸酯、酰氧基烷基醚、缩醛和缩酮。优选这种连接键在储藏和开始使用时都很稳定。

[0186] 一般来说, POLY 的分子量落入一个或多个下述范围: 约 100 至约 100,000 道尔顿, 约 500 至约 80,000 道尔顿, 约 1,000 至约 50,000 道尔顿, 约 2,000 至约 25,000 道尔顿和约 5,000 至约 20,000 道尔顿。分子量的例子包括约 1,000, 约 5,000, 约 10,000, 约 15,000, 约 20,000, 约 25,000, 约 30,000 和约 40,000 道尔顿。低分子量 POLY 的分子量为约 250, 500, 750, 1000, 2000 或 5000 道尔顿。代表性的巯基聚合物包括分子量为 5,000, 20,000 和 40,000 道尔顿的 PEG。

[0187] 在本发明的特定具体实施方式中, 本文所述的巯基聚合物试剂具有下述分子量之一的 PEG 片段: 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 10,000, 15,000, 20,000, 30,000 和 40,000 道尔顿。

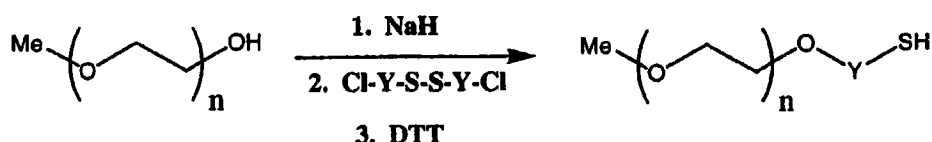
[0188] 就亚单元的数量而言, 在本发明中使用的 PEG 通常包括落在下面一个或多个范围的一定数量的  $(-OCH_2CH_2-)$  亚单元: 12 至约 4000 亚单元, 约 15 至约 2000 亚单元, 约 20 至约 1000 亚单元, 约 25 至约 750 亚单元, 约 30 至约 500 亚单元。

#### [0189] 试剂的制备

[0190] 方案 1 显示了一种制备“无连接基”聚亚烷基氧基-巯基试剂的方法。在此反应中, 在一端有封端基团的聚亚烷基二醇例如单甲氧基 PEG 被强碱例如 NaH 烷氧基化, 试剂和二(卤素烷基硫化物)结合形成聚合二醚二硫化物。然后中间体可被还原剂例如二硫苏糖醇 (DTT) 分裂, 得到聚亚烷基氧基-巯基试剂。

#### [0191] 方案 1

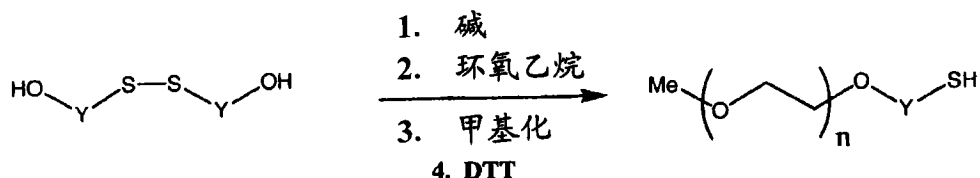
[0192]



[0193] 在其他的合成路线中, 如方案 2 所示, 二(羟基烷基硫化物)作为核心材料用于环氧乙烷的聚合, 形成 PEG 二醚二硫化物。末端被例如甲基基团所封端。然后, 二硫化物被还原剂例如二硫苏糖醇 (DTT) 分裂得到聚亚烷基氧基-巯基试剂。

#### [0194] 方案 2

[0195]

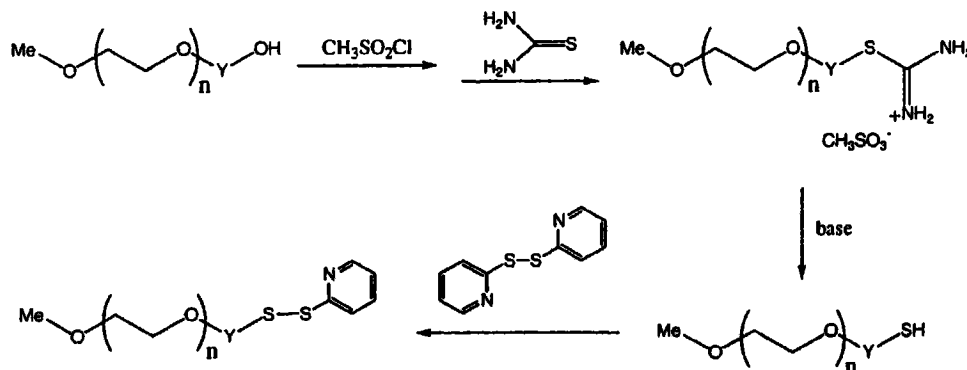


[0196] 方案 3 显示了另一种方法。在这个路线中, 制得了试剂 POLY-Y-OH, 其中 Y 如上所定义。例如, 这种试剂可通过如下方法制得: POLY-OH 例如 m-PEG-OH 和强碱例如 NaH 反应形成醇盐, 然后和卤代烷醇例如 4-溴-1-丁醇反应。末端羟基基团转化为离去基团例如甲苯磺酸盐或甲磺酸盐, 此化合物然后和硫脲反应, 置换离去基团。然后末端硫脲阳离子盐被碱

分裂巯基,得到末端巯基。下述实施例 1 中对此方案作了一些变化,其中离去基团是卤素。

[0197] 方案 3

[0198]



[0199] 在任何一个这种试剂中,可使用巯基保护基团来保护巯基,例如三苯甲基,硫醚例如烷基和苯甲基硫醚,包括单硫、二硫和氨基硫缩醛,硫酯,硫碳酸酯,硫氨基甲酸酯和 sulfenyl 衍生物。在储藏期间使用保护基团还可进一步降低试剂发生二聚化作用的倾向性。如方案 3 所示,巯基还可转化为邻-吡啶基二硫化物(OPSS),其在标准储藏条件下是稳定的。如实施例 2 所示,在适当的反应条件下,OPSS 基团平稳地和欲缀合到水溶性聚合物上的分子中的巯基基团反应。

[0200] 优选地,本发明聚合物试剂在惰性空气条件下储存,例如氩气和氮气。还优选的是,本发明聚合物应最低化暴露在潮气中。因此,优选的储藏条件是在干燥的氩气或其他干燥的惰性气体中,温度低于约  $-15^{\circ}\text{C}$ 。优选在低温条件下进行储藏,这是因为低温下不期望的副反应速率会有所降低。例如,当聚合物片段是 PEG 时,PEG 可以缓慢地与氧气反应生成过氧化物,最终导致链分解,并且提高 PEG 试剂的多分散性。基于上述理由,优选将本发明聚合物储藏在黑暗中。

[0201] 聚合物缀合物

[0202] 本发明还包括本文所述的巯基聚合物试剂反应生成的缀合物。通常而言,本发明聚合物试剂用于和活性试剂缀合,所述活性试剂具有至少一个巯基基团以用于反应。

[0203] 本发明缀合物通常结构为  $\text{POLY}[\text{Y}-\text{S}-\text{S}-\text{A}]_x$ ,其中 POLY 如上文所定义,在优选的具体实施方式中为聚乙二醇(PEG); $x$  为 1-25,“A”代表缀合后活性试剂的残基。在可选择的具体实施方式中, $x$  是 1-8,1-6 或 1-4;在进一步的具体实施方式中, $x$  是 1 或  $x$  是 2。Y 是具有至少 4 个碳原子并且有取代基的二价连接基团,由饱和或不饱和碳氢主链组成,碳氢主链上有 3-10 个,优选 3-8 个碳原子,取代基独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和本文定义的无干扰取代基,其中在主链不同碳原子上的两个这种烷基和 / 或烯基可以连接形成环烷基、环烯基或芳基。

[0204] 在可选择的具体实施方式中,Y 的结构为  $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$ ,其中  $n$  为 3-10,优选 3-8,每一个  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基。不同碳原子上的两个基团  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  可以相连接形成环烷基、环烯基或芳基。巯基(或被保护的巯基)的硫原子连接在 Y 的  $\text{sp}^3$  杂碳原子上,而不是芳基环或双键上。

[0205] 在 Y 的可选择具体实施方式中,Y 是  $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$  亚烷基,或者  $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$  亚烷基和  $\text{C}_5$ - $\text{C}_8$  环亚烷基或芳基的组合,任何一种都可包括一个或多个如上文所定义的可无干扰取代基。优选地,

包括 0-2 个,更优选 0 或 1 个这种无干扰取代基。

[0206] 在进一步的具体实施方式中, Y 是具有式  $-(CR^1R^2)_n-$  的直链或支链亚烷基, 其中 n 为 4-8, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢、低级烷基、低级烯基和无干扰取代基。优选地, n 是 4-6, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自氢和甲基。在一个具体实施方式中, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  是氢, n 代表  $-(CR^1R^2)-$  重复的次数。在另一个具体实施方式中, 除了  $R^1$  在所述硫原子的邻位碳上 ( $\alpha$ -碳)  $R^1$  为低级烷基优选甲基或乙基以外, 每一个  $R^1$  和  $R^2$  均为氢。

[0207] 在 Y 为  $-(CR^1R^2)_n-$  的具体实施方式中, 其中 n 为 4-8, 不同碳原子上的两个基团  $R^1$  和  $R^2$  相连接形成环烷基、环烯基或芳基, 所述环烷基优选是环戊基或环己基。

[0208] 另一方面, 本发明缀合物的结构可为  $POLY_A-L-SS-Y-POLY_B-Y'-SS-A$ 。每一个 POLY 为上文所定义的水溶性聚合物片段, 其中  $POLY_B$  具有低分子量, 例如 10KDa 或更低, 优选 5KDa 或更低, 更优选 2KDa 或更低,  $POLY_A$  和  $POLY_B$  的分子量之和至少为 3KDa。  $POLY_A$  的分子量通常是中等至高分子量, 但这不是必需的, 例如大于约 2KDa, 优选 5KDa 或更多, 更优选 10KDa 或更多。

[0209] 每一个 Y 和 Y' 都是上文定义 Y 的间隔基团, 他们可以相同或不同。通常而言, Y 和 Y' 是相同的间隔基团。 L 是  $POLY_A$  和邻近的二硫化物键之间的连接基。一般来说, 这种连接基是直接的键或者含至多约 10 个原子长度的原子链的基团, 优选选自烷基 (C-C)、烯基、醚、酯、酰胺、氨基甲酸酯和硫酸酯键。 L 可以但不一定是本文所述的 Y 的具体实施方式。

[0210] 这些缀合物通常是一系列反应的产物 (具体见下文实施例 8-11), 其中式  $W-S-S-Y-POLY_B-Y'-S-S-W$  低分子量试剂首先和生物活性分子 A-SH 反应形成中间体  $A-S-S-Y-POLY_B-Y'-S-S-W$ , 其中 S-W 是巯基或者优选是巯基-活性衍生物例如 OPSS, A-SH 例如是具有 (或修饰后具有) 游离半胱氨酸残基的蛋白质。然后, 此中间体和式  $POLY_A-L-S-S-W$  (代表性的) 高分子量试剂反应, 生成最终缀合物。

[0211] 这个方案的优点, 特别是对于具有被阻碍的巯基的生物分子而言, 在于低分子量试剂相对于高分子量试剂能够更有效地和这种被阻碍的巯基基团反应。因此高分子量聚合物可以通过此方案以更高的产率连接到 A 上, 相对于其直接和被阻碍的巯基进行反应。

[0212] 然而, 如果起始试剂  $W-S-S-Y-POLY_B-Y'-S-S-W$  缺少如本文所述的亲水性间隔基团 Y, 此方案可能会因为连接步骤中的低产率而失败。这一区别在下文的比较实施例 9 和 10 中会进行说明。

[0213] 一般来说, 本文所述的缀合物优选是水溶性或可分散性的, 虽然巯基聚合物试剂还可以和具有活性巯基基团的固态载体或表面相缀合。

[0214] 用于和本发明活性聚合物偶合的巯基基团, 例如是在半胱氨酸残基中, 可以是天然产生的 (即, 在蛋白质或其他天然形式的分子中产生), 或者是引入的例如利用标准遗传工程技术插入到蛋白质的天然序列中替代天然氨基酸。

[0215] 当活性试剂包括很少或者仅有一个活性巯基时, 得到的组合物可以有利地仅包含一种聚合物缀合物。这可用于和蛋白质缀合, 蛋白质通常含有的容易缀合的巯基数量较少 (和其他活性基团例如胺相比)。通过巯基基团的共价结合从而可以引起靶蛋白的更多选择性修饰。相应地, 巯基聚合物的应用可以更多的控制整个得到的聚合物缀合物, 不仅是和母蛋白质结合的聚合物衍生物的数量, 而且包括聚合物连接的位置。

[0216] 用于缀合的分子

[0217] 用于制备本发明缀合物的生物活性试剂可以是下述多种结构类别之一,包括但不限于肽、多肽、蛋白质、抗体、多糖、甾体、核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸、脂肪、电解质、小分子(优选不溶性小分子)等等。优选地,和本发明聚合物结合的活性试剂具有天然巯基或者修饰后含有至少一个适于结合的活性巯基基团。

[0218] 用于和本发明聚合物巯基结合的优选肽或蛋白质包括 EPO、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、一致性 IFN、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、IL-2、Remicade™(英夫利昔单抗)、Rituxan™(利妥昔单抗)、Enbrel™(依那西普)、Synagis™(帕利珠单抗)、Reopro™(abciximab)、Herceptin™(曲妥单抗)、tPA、Cerizyme™(伊米昔酶)、乙型肝炎病毒 vaccine、rDNAse、 $\alpha$ -1 蛋白酶抑制因子、G-CSF、GM-CSF、hGH、胰岛素、FSH 和 PTH。在可选择的具体实施方式中,蛋白质是 G-CSF 或 GM-CSF。

[0219] 上述代表性的生物活性剂是指包括可适用的其类似物、激动剂、拮抗剂、抑制剂、异构体及药物可接受的盐。对于肽和蛋白质,本发明包括合成、重组、天然、糖基化和非糖基化形式,以及其生物活性片段。上述生物活性蛋白质还包括具有一个或多个氨基酸取代(例如半胱氨酸)、删除或类似形式的变体,只要得到的变体蛋白质具有至少一定程度的母(天然)蛋白活性即可。

[0220] 适当的试剂选自,例如安眠药和镇静剂、精神兴奋剂、镇定剂、呼吸药物、抗惊厥剂、肌松药、抗麻痹药(多巴胺拮抗剂)、镇痛药、抗炎剂、抗焦虑药物(抗焦虑剂)、食欲抑制剂、抗偏头痛药、肌肉收缩药、抗感染药(抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、疫苗)、抗关节炎药、抗疟药、止吐药、anepileptics、支气管扩张药、细胞活素类、生长因子、抗癌药、抗血栓剂、抗高血压药、心血管药物、抗心律不齐药、抗氧化剂、抗哮喘剂、激素包括避孕药、拟交感神经药、利尿剂、脂质调节剂、抗雄激素剂、抗寄生虫药、抗凝血剂、肿瘤剂、抗肿瘤剂、降血糖药、营养剂和补药、生长补药、抗肠炎药、疫苗、抗体、诊断用药和造影剂。

[0221] 活性试剂的其他特定例子包括但不限于门冬酰胺酶、amdoxovir (DAPD)、安肽、贝卡普勒明、降钙素、cyanovirin、地尼白介素-毒素连接物、促红细胞生成素(EPO)、EPO 激动剂(例如有 10-40 个氨基酸长度的肽,并包括如 W096/40749 所述的特定核心序列)、脱氧核糖核酸酶  $\alpha$ 、红细胞生成刺激蛋白(NESP)、凝血因子例如因子 V、因子 VII、因子 VIIa、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 XII、因子 XIII、血管假性血友病因子;西利酶、cerezyme、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胶原、环孢霉素、 $\alpha$  防御素、 $\beta$  防御素、exendin-4、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、血小板生成素(TPO)、 $\alpha$ -1 蛋白酶抑制因子、依降钙素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GMCSF)、纤维蛋白原、非格司亭、生长激素人生长激素(hGH)、生长激素释放激素(GHRH)、GRO- $\beta$ 、GRO- $\beta$  抗体、骨结构蛋白质例如骨结构蛋白-2、骨结构蛋白-6、OP-1;酸性成纤维细胞生长因子、基本的成纤维细胞生长因子、CD-40 配体、肝素、人血清清蛋白、低分子量肝素(LMWH)、干扰素类例如干扰素  $\alpha$ 、干扰素  $\beta$ 、干扰素  $\gamma$ 、干扰素 omega、干扰素 tau、一致性干扰素;白介素和白介素受体例如白介素-1 受体、白介素-2、白介素-2 融合蛋白质、白介素-1 受体拮抗剂、白介素-3、白介素-4、白介素-4 受体、白介素-6、白介素-8、白介素-12、白介素-13 受体、白介素-17 受体;乳铁蛋白和乳铁蛋白片段、促黄体激素释放激素(LHRH)、胰岛素、前-胰岛素、胰岛素类似物(例如,美国专利 5,922,675 记载的单-酰化胰岛素)、糊精、C-肽、生长激素抑制素、生长激素抑制素类似物包括奥曲肽、加压素、促卵泡激素(FSH)、流感疫苗、胰岛素-类似生长因子(IGF)、胰岛素溴甲阿托品、巨噬细胞集落

刺激因子 (M-CSF)、纤溶酶原活化因子例如阿替普酶、尿激酶、瑞替普酶、链激酶、帕米普酶、拉诺替普酶和 tenecteplase ;神经生长因子 (NGF)、骨保护素、血小板衍生生长因子、组织生长因子、转化生长因子 -1、血管内皮生长因子、白血球抑制因子、角质化细胞因子 (KGF)、神经胶质生长因子 (GGF)、T 细胞受体、CD 分子 / 抗原、肿瘤坏死因子 (TNF)、单核细胞趋化蛋白 -1、内皮生长因子、甲状旁腺激素 (PTH)、胰高血糖素类似肽、生长激素、胸腺素  $\alpha$  1、胸腺素  $\alpha$  111b/111a 抑制剂、胸腺素  $\beta$  10、胸腺素  $\beta$  9、胸腺素  $\beta$  4、 $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、磷酸二酯酶 (PDE) 化合物、VLA-4 (极晚抗原 -4)、VLA-4 抑制剂、bisphosphonates、呼吸道合胞病毒抗体、囊性纤维化跨膜通道调节因子 (CFTR) 基因、脱氧核糖核酸酶 (Dnase)、杀菌 / 渗透性增长因子 (BPI)、和抗 -CMV 抗体。代表性的单克隆抗体包括依那西普 (由人类 75kD TNF 受体的细胞外配体 - 结合部分和 IgG1 的 Fc 部分结合组成的细胞外配体二聚物融合蛋白)、阿昔单抗、afelimomab、巴利昔单抗、巴利昔单抗、英夫利昔单抗、ibritumomabtiuxetan、米妥莫单抗、鼠单克隆抗体 -CD3、碘 131 托西莫单抗缀合物、奥立珠单抗、利妥昔单抗和曲妥单抗 (赫赛汀)。

[0222] 适于和聚合物共价连接的其他试剂包括但不限于阿米斯丁、胺碘酮、氨基己酸、氨基马尿酸钠、氨鲁米特、氨基乙酰丙酸、氨基水杨酸、安吡啶、阿那格雷、阿那曲唑、门冬酰胺酶、蒽环类抗生素、贝沙罗汀、比卡鲁胺、博来霉素、乙基酰胺、白消安、卡麦角林、卡培他滨、碳铂、卡氮芥、chlorambucin、西司他丁钠、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环磷酰胺、去乙酰环丙氯地孕酮、阿糖胞苷、喜树碱、13- 顺维生素 A 酸、所有的反式维甲酸 ;氮烯咪胺、更生霉素、柔红霉素、去铁胺、地塞米松、地塞米松、己烯雌酚、多西他奇、阿霉素、表阿霉素、磷雌氮芥、鬼臼乙叉甙、依西美坦、非索非那定、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟氢甲睾酮、氟他米特、吉西他滨、肾上腺素、L-Dopa、羟基脲、去甲氧基柔红霉素、异磷酰胺、imatinib、依立替康、依曲康唑、戈舍瑞林、来曲唑、亚叶酸、左旋咪唑、赖诺普利、lovothyroxinesodium、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、间羟胺、甲氨喋呤、甲氧氯普胺、美西律、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、纳洛酮、烟碱、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、氨羟二磷酸二钠、喷司他丁、pilocarpin、吡非尔钠、泼尼松、甲基苄肼、丙氯拉嗪、奥坦西隆、雷替曲塞、西罗莫司、链唑霉素、他克莫司、三苯氧胺、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、四氢大麻酚、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、托泊替康、维甲酸、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、多拉司琼、格拉司琼 ;福莫特罗、氟地松、醋酸亮丙瑞林、咪达唑仑、阿普唑仑、两性霉素 B、podophylotoxins、核苷抗病毒剂、芳酰基脲、舒马曲坦 ;大环内酯类例如红霉素、竹桃霉素、醋竹桃霉素、罗红霉素、克拉仙霉素、davercin、阿奇霉素、氟红霉素、地红霉素、交沙霉素、螺旋霉素、麦迪霉素、吉他霉素、麦白霉素、罗他霉素、和阿齐红霉素、和 swinolide A ;氟喹诺酮类例如环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、曲伐沙星、阿拉曲沙星、moxifloxacin、氟哌酸、氟啶酸、格雷沙星、加替沙星、洛米沙星、施怕沙星、替马沙星、培氟沙星、氨氟沙星、氟罗沙星、托氟沙星、普卢利沙星、伊洛沙星、帕珠沙星、克林沙星和西他沙星 ;氨基糖甙类例如庆大霉素、奈替霉素、草履虫素、妥布霉素、阿米卡星、卡那霉素、新霉素和链霉素、万古霉素、替考拉宁、rampolanin、麦地拉宁、粘菌素、达托霉素、短杆菌肽、粘菌素甲磺酸钠 ; polymyxins 例如 polymixin B、卷曲霉素、杆菌肽、青霉烯类 ;青霉素类包括青霉素易敏感剂例如青霉素 G、青霉素 V ;青霉素酶抑制剂例如甲氧苯青霉素、苯唑西林、邻氯青霉素、双氯青霉素、氟氯青霉素、萘夫西林 ;革兰 (氏) 阴性微生物活性剂例如氨基苄西林、阿莫西林、

和海他西林、cillin、和 galampicillin ;antipseudomonal 青霉素类例如羧苄青霉素、替卡西林、阿洛西林、美洛西林、和哌拉西林 ;先锋霉素类例如头孢泊肟、头孢丙烯、ceftbuten、头孢唑肟、头孢曲松、头孢菌素、头孢匹林、头孢氨苄、cephradrine、头孢西丁、头孢羟唑、头孢唑啉、头孢利素、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢格来星、头孢呋新、头孢雷特、头孢噻肟、头孢曲秦、头孢乙氧、头孢吡肟、头孢克肟、头孢尼西、头孢哌酮、头孢替坦、头孢美唑、头孢他定、氯拉卡比、和拉氧头孢、单环  $\beta$ -内酰胺类例如氨曲南 ;和碳青霉烯类例如亚胺培南、美罗培南、pentamidine isethiouate、沙丁胺醇硫酸酯、利多卡因、奥西那林硫酸酯、倍氯米松 diprepionate、去炎松乙酰胺、布地奈德缩酮、氟地松、异丙托溴铵、氟尼缩松、色甘酸钠、和麦角胺 ;紫杉烷类例如紫杉醇 ;SN-38、和酪氨酸磷酸化抑制剂。

#### [0223] 缀合方法

[0224] 适当的缀合条件是时间、温度、pH、试剂浓度、溶剂等足以有效地在巯基聚合物试剂和活性剂之间发生缀合。如现有技术已知，除此之外，特定的条件还依赖于活性剂、期望的缀合类型、反应混合物中存在的其它材料等等。在任何特定状况中，有效缀合的充分条件可由本领域普通技术人员在本文教导下参考相关文献和 / 或通过例行试验确定。

[0225] 代表性的缀合条件包括在约 6 至约 10 的 pH 条件下进行缀合反应，例如 pH 约为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 或 10。反应将进行约 5 分钟至约 72 小时，优选约 30 分钟至约 48 小时，更优选约 4 小时至约 24 小时或更少。缀合反应的温度通常为，但不是必需的，约 0°C 至约 40°C；缀合反应经常在室温或更低温度下进行。缀合反应通常在缓冲液中进行，例如磷酸盐或醋酸盐缓冲液或类似的系统。

[0226] 就试剂浓度而言，通常是过量的聚合物试剂和活性剂结合。然而，在某些状况中，优选的是聚合物试剂上的活性基团对应于一定量的活性剂而言是化学量。聚合物试剂和活性剂的代表性比例包括摩尔比为约 1 : 1 (聚合物试剂 : 活性剂)、1.5 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、8 : 1 或 10 : 1。缀合反应一直持续到基本上不再有缀合反应发生为止，这可以通过随着时间监视反应进程进行确定。

[0227] 反应进程可以通过下述方法进行监视 : 在不同的时间点从反应混合物中取出一部分，通过 SDS-PAGE 或 MALDI-TOF 质谱分析法或任何其他适当的分析方法分析反应混合物。一旦观察到缀合物的量不再增加或者未缀合聚合物的量保持不变，则认为反应进行完全了。一般来说，缀合反应会进行数分钟至数小时 (例如，从 5 分钟至 24 小时或更多)。得到的产物混合物优选但不必须被纯化，以分离过量的试剂、未缀合反应物 (例如活性剂)、不期望的多-缀合物，和游离或未反应的聚合物。得到的缀合物可进一步利用分析方法确定其性质，所述分析方法例如是 MALDI、毛细管电泳、凝胶电泳和 / 或色谱法。

[0228] 更优选地，本发明巯基聚合物通常和包含巯基的活性剂在 pH 约 6-9 (例如 6、6.5、7、7.5、8、8.5 或 9) 条件下缀合，更优选 pH 约 7-9，更优选 pH 约 7-8。通常而言，使用稍微过量的聚合物试剂，例如 1.5-15 倍，优选 2 倍-10 倍摩尔过量。室温下，反应时间通常为约 15 分钟至数小时，例如 8 或更多小时。对于被立体结构阻碍的巯基基团，所需要的反应时间可能会特别长。

#### [0229] 纯化缀合物

[0230] 选择性地，本发明巯基聚合物和生物活性剂反应得到的缀合物被纯化，以获得 / 分离出不同物质例如 PEG- 类，或移除不期望的反应副产物。

[0231] 如果希望的话,具有不同分子量的 PEG 缀合物可利用凝胶过滤色谱法进行分离。虽然此方法可用于分离不同分子量的 PEG 缀合物,但此方法通常不能有效地分离在一个蛋白质内具有不同 PEG 化位置的位置异构体。例如,凝胶过滤色谱法可用于分离 PEG 1- 聚合物、2- 聚合物、3- 聚合物等的混合物中的任一个,尽管每一个 PEG 聚合物组合物都可包含连接在蛋白质内不同活性基团上的 PEG。

[0232] 适于进行此类分离的凝胶过滤柱包括 Superdex™ 和 Sephadex™ 柱,可以从 Amersham Biosciences 购得。对于特定柱的选择取决于希望的级分分离范围。通常使用无胺基缓冲液例如磷酸盐、醋酸盐等进行洗脱。收集到的级分可以利用多种不同的方法进行分析,例如 (i) OD 在 280nm 用于蛋白质含量分析, (ii) BSA 蛋白质分析, (iii) 碘试验,用于 PEG 含量分析 (Sims, G. E. C. et al., Anal. Biochem, 107, 60-63, 1980), 或者任选地, (iv) 通过在 SDS PAGE 凝胶中流动,然后利用碘化钡进行染色。

[0233] 位置异构体可通过反相色谱法例如 RP-HPLC C18 柱 (Amersham Biosciences or Vydac) 进行分离,或者利用离子交换柱通过离子交换色谱法进行分离,所述离子交换柱例如是从 Amersham Biosciences 购得的 Sepharose™ 离子交换柱。上述任一种方法都可用于分离具有相同分子量 (位置异构体) 的 PEG- 活性分子异构体。

[0234] 根据得到的 PEG- 缀合物的预期用途,在缀合以及任选的附加分离步骤之后,可浓缩缀合物混合物,无菌过滤,在低温约 -20°C 至约 -80°C 条件下储存。任选地,低压冻干缀合物,有或没有残留的缓冲液,以冻干粉形式进行储存。在某些情况下,优选更换用于缀合的缓冲液例如醋酸钠成为挥发性缓冲液例如碳酸铵或醋酸铵,这些物质在冻干时很容易被移除,因此冻干蛋白质缀合物粉末制剂中没有残留的缓冲液。任选地,利用制剂缓冲液进行缓冲液更换步骤,这样冻干缀合物的形式适于重构成制剂缓冲液,并最终适于对哺乳动物使用。

#### [0235] 药物组合物

[0236] 本发明还包括药物制剂,其中包括本文所述的缀合物以及药物赋形剂。一般来说,缀合物本身为固态形式 (例如沉淀物或冻干粉) 或液体形式,其可以和适当的药物赋形剂组合,所述药物赋形剂可为固体或液体形式。

[0237] 代表性的赋形剂包括但不限于碳氢化合物、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲液、酸、碱及其组合。

[0238] 赋形剂可以是碳氢化合物例如糖、衍生糖例如糖醇、糖醛酸、酯化糖和 / 或糖聚合物。特定的碳氢化合物赋形剂包括,例如单糖例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D- 甘露糖、山梨糖、等等;二糖例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等等;多糖例如绵白糖、松三糖、糊精-麦芽糖复合剂、葡聚糖、淀粉等等;以及糖醇例如甘露醇、木糖醇、maltitol、拉克替醇、木糖醇、山梨糖醇 (山梨醇)、pyranosyl 山梨糖醇、肌醇等等。

[0239] 赋形剂还可包括无机盐或缓冲液例如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠及其组合。

[0240] 制剂中还可包括抗微生物剂,以预防或制止微生物生长。适于本发明的抗微生物剂的非限制性例子包括苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲基醇、西吡氯铵、氯丁醇、苯酚、苯乙基醇、硝酸苯汞、thimersol、及其组合。

[0241] 制剂中还可使用抗氧化剂,抗氧化剂用于预防氧化,因而预防制剂的缀合物或其

它组份发生变质。本发明中应用的适当抗氧化剂包括,例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟基茴香醚、丁羟基甲苯、次磷酸、单硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸钠、焦亚硫酸钠及其组合。

[0242] 表面活性剂可作为赋形剂存在。代表性的表面活性剂包括:聚山梨酯例如“土温 20”和“土温 80”,Pluronic 例如 F68 和 F88(这两种化学物质均可从 BASF, Mount Olive, New Jersey 购得);疏水山梨醇酯;脂质例如磷脂例如卵磷脂及其他磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺(优选非脂质体形式),脂肪酸和脂肪酯。甾体例如胆固醇;和螯合剂例如 EDTA、锌及其他适当的阳离子。

[0243] 制剂中也可使用酸或碱作为赋形剂。可使用的酸的非限制性例子选自盐酸、醋酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸及其组合。适当的碱的例子包括但不限于氢氧化钠、醋酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、醋酸铵、醋酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾及其组合。

[0244] 药物制剂包括所有的制剂类型,特别是适于注射的制剂例如可复溶的粉末以及混悬液和溶液。组合物中缀合物(即,活性剂和本文所述聚合物形成的缀合物)的用量根据多种因素而变化,但当组合物被放置在单位剂量容器(例如玻璃瓶)中时其最好为治疗有效剂量。另外,可将药物制剂放置在注射器中。治疗有效剂量可以通过实验加以确定,具体为逐渐增加缀合物的使用量,重复给药,直至确定能够达到理想的临床效果的用量。

[0245] 组合物中各个赋形剂的用量根据赋形剂活性和组合物的特定需求而有所不同。典型地,任何一种赋形剂的最佳用量可通过例行试验确定,即制备包含不同赋形剂量(从低到高)的组合物,检查稳定性及其他参数,然后确定能够达到最佳效果而不产生显著副作用的用量范围。

[0246] 然而,通常而言,赋形剂的用量为组合物重量的约 1% 至约 99% 重量,优选约 5% -98% 重量,更优选约 15-95% 重量,最优选浓度小于 30% 重量。

[0247] 上述药物赋形剂及其他赋形剂均记载于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995), the “Physician’s Desk Reference”, 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), and Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D. C., 2000。

[0248] 非必要地,本发明药物制剂通常通过注射给药,因此通常在立即使用前转为液体溶液或混悬液。药物制剂也可以为其他形式例如糖浆剂、乳膏、软膏、片剂、粉末等等。给药的其他方式还包括,例如肺、直肠、经皮、经粘膜、口服、鞘内、皮下、动脉内给药等等。

[0249] 如上文所述,缀合物可以通过静脉注射在胃肠外注射给药,或者比较不优选地肌肉注射或皮下注射。胃肠外给药的适当制剂类型除其他之外包括即时注射溶液、干粉末、注射混悬液、干不溶性组合物、乳剂和液体浓缩液,其中所述干粉末在使用之前和溶剂混合,所述干不溶性组合物在使用之前和载体混合,所述液体浓缩液在使用之前进行稀释。

#### [0250] 给药方法

[0251] 本发明还提供了一种对患者使用本文所述缀合物的方法,所述患者对于使用缀合物进行治疗很敏感。该方法通常包括通过注射施用治疗有效量的缀合物(优选作为药物制剂的一部分加以提供)。给药方法可用于治疗能够通过使用特定缀合物缓解或预防的任何

状况。本领域普通技术人员可以确定特定缀合物可以有效地治疗哪些状况。使用的实际剂量根据个体的年龄、体重、身体状况以及被治疗状况的严重程度、主治医师的意见和使用的缀合物而有所不同。治疗有效剂量对于本领域技术人员而言是已知的,和 / 或记载于相关参考文件和文献中。通常而言,治疗有效剂量的范围是约 0.001mg-100mg,优选 0.01mg/天-75mg/天,更优选 0.10mg/天-50mg/天。

[0252] 任何给定缀合物(同样,优选作为药物制剂的一部分加以提供)的单位剂量可以以各种给药方案进行给药,其取决于临床医师的判断,患者的需要等等。特定的给药方案对于本领域普通技术人员而言是已知的,或者可以根据常规方法进行试验加以确定。代表性的给药方案包括,但不限于,每天给药 5 次,每天给药 4 次,每天给药 3 次,每天 2 次,每天 1 次,每周 3 次,每周 2 次,每周 1 次,每月 2 次,每月 1 次及其组合。一旦达到临床效果,就可以停止给药。

[0253] 如有需要,可通过使用生理学可裂解的和 / 或酶降解的键实现缀合物的水溶性聚合物部分在体内的裂解,所述的键例如是聚合物主链中的氨基甲酸酯、酰胺、碳酸酯或含酯的键。这样,可以通过选择聚合物分子大小和提供所需清除性质的官能团类型对缀合物(通过裂解水溶性聚合物部分)的清除进行调节。本领域普通技术人员可以确定聚合物的适当分子大小以及裂解键。例如,本领域普通技术人员利用常规试验即可确定适当的分子大小和裂解键,具体为首先制备多种具有不同聚合物重量和裂解键的聚合物衍生物,然后通过对患者使用聚合物衍生物并定期采集血样和 / 或尿样绘制清除曲线(例如通过定期血样或尿样)。一旦绘制出一系列针对每一个测试缀合物的清除曲线,就能够确定适当的缀合物。

[0254] 实施例

[0255] 下述实施例用于举例说明,但绝非是限制本发明的保护范围。一方面,在合成和缀合期间,实施例举例说明本发明巯基聚合物增强的稳定性。

[0256] 使用由 Bruker 生产的 400MHz 分光计获得  $^1\text{H}$  NMR 数据。

[0257] 所述的 PEG 试剂从 Nektar Therapeutics, Huntsville, AL 获得。

[0258] 实施例 1

[0259] 制备 mPEG-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物 (mPEG-4C-OPSS)

[0260] I. mPEG<sub>5000</sub>-丁基溴化物

[0261] 共沸干燥 mPEG<sub>5000</sub> (20.0g, 0.004mol) (NOF 公司) 在甲苯 (200ml) 中的溶液, 馏出 50ml 甲苯。加入氢化钠 (0.8g, 60% 分散在液体石蜡中, 0.020mol), 混合物在 60℃ 氩气环境下搅拌 1 小时。加入 1,4-二溴丁烷 (9.0g, 0.0417mol), 混合物在 75℃ 氩气环境下搅拌过夜。过滤混合物, 减压浓缩, 将残留物与 850ml 冷乙醚混合。滤出沉淀物, 减压干燥。产率为 17.4g。NMR(d<sub>6</sub>-DMSO): 1.60ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 1.84ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 3.24ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.51ppm(s, PEG 主链)。

[0262] II. mPEG<sub>5000</sub>-丁烷硫醇

[0263] 向 mPEG<sub>5000</sub>-丁基溴化物 (2.0g, 0.0004mol) 的无水乙醇 (20ml) 溶液中, 加入硫脲 (0.31g, 0.0041mol), 混合物在 78℃ 氩气环境下搅拌过夜。减压蒸馏移除溶剂, 将残留物溶解在 1% NaOH(21ml) 水溶液中。溶液加热至 85℃, 在氩气环境下搅拌 2.5 小时。将溶液冷却至 35℃, 然后使用 10% 磷酸将 pH 调至 3。加入 NaCl (6g), 二氯甲烷萃取产

物。萃取液使用无水硫酸钠进行干燥,利用冷乙醚沉淀产物。产率为 1.8g。NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.35ppm(t, -CH<sub>2</sub>-SH, 1H), 1.69ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH, 4H), 2.55ppm(m, -CH<sub>2</sub>-SH, 2H), 2.69ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-S-CH<sub>2</sub>-, 4H, 1.2mol %) 3.24ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.51ppm(s, PEG 主链)。碘量分析显示产物包含 94% 巯基。上述 NMR 数据表明产物包含非常少量 (NMR 测定为 1.2mol%) 的二硫化物-连接二聚物,由巯基氧化形成。无需对硫醇进行进一步纯化。

[0264] 相反,由 mPEG<sub>5000</sub>-甲磺酸盐和硫脲根据相似方法制备的 mPEG<sub>5000</sub>-乙烷硫醇(即在 PEG 和巯基之间仅有两个碳原子的相应试剂)类似制剂,产物中含有约 15mol% 包含二巯基基团的二硫化物-连接的二聚物,(例如参见 WO 2004/063250)。这个水平的二聚物就需要进一步的纯化或者进行另外的化学处理以将二聚物转换成理想的 PEG-巯基。

[0265] III. mPEG<sub>5000</sub>-4C-OPSS

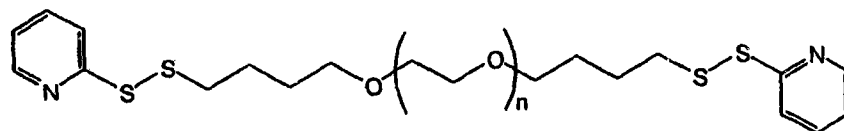
[0266] 向 mPEG<sub>5000</sub>-丁烷硫醇(2.0g, 0.0004mol) 的无水甲醇(40ml) 溶液中,加入 2,2'-二吡啶基二硫化物(0.18g, 0.00082mol), 混合物在室温和氩气环境中搅拌 4 小时。减压蒸馏去除溶剂,将残留物溶解在二氯甲烷(5ml) 中,使用 50ml 冷乙醚沉淀产物。产率为 1.7g。NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.68ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 1.76ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 2.82ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 3.38ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.52ppm(s, PEG 主链), 7.12, 7.68, 7.75, & 8.47ppm(4m, 吡啶基质子, 4H)。

[0267] 实施例 2

[0268] 制备 PEG<sub>2000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物)

[0269] (PEG-二-(4C-OPSS), 2KDa)

[0270]



[0271] PEG<sub>2000</sub>-二-丁基溴化物

[0272] 共沸干燥 PEG<sub>2000</sub>(20.0g, 0.020 当量)(NOF 公司)在甲苯(150ml) 中的溶液, 馏出 50ml 甲苯。加入氢化钠(6.0g, 60% 分散在液体石蜡中, 0.150mol), 混合物在 60°C 氩气环境下搅拌 1 小时。加入 1,4-二溴丁烷(34.55g, 1.600mol), 混合物在 75°C 氩气环境下搅拌过夜。过滤混合物, 减压浓缩, 将残留物与 850ml 冷乙醚混合。滤出沉淀物, 减压干燥。产率为 17.0g。NMR(d<sub>6</sub>-DMSO): 1.60ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 1.84ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 3.51ppm(s, PEG 主链); 取代 96.3%。

[0273] PEG<sub>2000</sub>-二(丁烷硫醇)

[0274] 向 PEG<sub>2000</sub>-二(丁基溴化物)(10.0g, 0.0100 当量) 的无水乙醇(100ml) 溶液中, 加入硫脲(7.68g, 99%, 0.100mol), 混合物在 78°C 氩气环境下搅拌过夜。减压蒸馏去除溶剂, 将残留物溶解在 3.3% NaOH(180ml) 水溶液中。溶液加热至 85°C, 在氩气环境下搅拌 2.5 小时。将溶液冷却至 35°C, 然后加入 60ml 去离子水, 使用 10% 磷酸将 pH 调至 3。使用 50ml 醋酸乙酯洗涤溶液, 二氯甲烷萃取。萃取液使用无水硫酸钠进行干燥, 然后减压蒸馏去除溶剂。粗产品利用异丙醇进行重结晶, 真空干燥。产率为 7.8g。NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.35ppm(t, -CH<sub>2</sub>-SH, 1H), 1.69ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH, 4H), 2.55ppm(m, -CH<sub>2</sub>-SH, 2H), 2.69ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-S-CH<sub>2</sub>-, 4H, 1.9mol %), 3.64ppm(s, PEG 主链)。

[0275] 上述 NMR 数据表明产物包含非常少量 (NMR 测定为 1.9mol%) 的二硫化物 - 连接二聚物, 其由巯基氧化形成。无需对硫醇进行进一步纯化。

[0276] 相反, 由 PEG<sub>2000</sub>-二-甲磺酸盐和硫脲根据相似方法制备的 PEG<sub>2000</sub>-乙烷硫醇 (即在 PEG 和巯基之间仅有两个碳原子的相应试剂), 产物中含有约 41mol% 包含二巯基基团的二硫化物 - 连接的二聚物。

[0277] PEG<sub>2000</sub>-二-(4C-OPSS)

[0278] 向 2,2'-二吡啶基二硫化醇 (0.89g, 0.0040mol) 的无水甲醇 (40ml) 溶液中, 加入 PEG<sub>2000</sub>-二-丁烷硫醇 (2.0g, 0.0020 当量), 混合物在室温和氩气环境中搅拌 3 小时。减压蒸馏去除溶剂, 将残留物溶解在二氯甲烷 (5ml) 中, 使用 50ml 冷乙醚沉淀产物。将沉淀物重复上述操作, 得到 1.0g 固体产物。NMR(CDC<sub>3</sub>) : 1.68ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 1.76ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 2.82ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 3.64ppm(s, PEG 主链), 7.12, 7.68, 7.75, & 8.47ppm(4m, 吡啶基 Hs, 4H)。

[0279] 实施例 3

[0280] 制备 mPEG<sub>10,000</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物 (mPEG-4C-OPSS, 10KDa)

[0281] mPEG<sub>10,000</sub>-丁基溴化物

[0282] 共沸干燥 mPEG<sub>10,000</sub> (20.0g, 0.002mol) (NOF 公司) 在甲苯 (200ml) 中的溶液, 馏出 50ml 甲苯。加入氢化钠 (0.8g, 60% 分散在液体石蜡中, 0.0200mol), 混合物在 60°C 氩气环境下搅拌 1 小时。加入 1,4-二溴丁烷 (4.8g, 0.0222mol), 混合物在 75°C 氩气环境下搅拌过夜。过滤混合物, 减压浓缩, 将残留物与 850ml 冷乙醚混合。滤出沉淀物, 减压干燥。产率为 18.5g。NMR(d<sub>6</sub>-DMSO) : 1.60ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 1.84ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 3.24ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.51ppm(s, PEG 主链) : 取代 97.5%。

[0283] mPEG<sub>10,000</sub>-丁烷硫醇

[0284] 向 mPEG<sub>10,000</sub>-丁基溴化物 (10.0g, 0.0010mol) 的无水乙醇 (100ml) 溶液中, 加入硫脲 (0.77g, 99%, 0.0100mol), 混合物在 78°C 氩气环境下搅拌过夜。减压蒸馏去除溶剂, 将残留物溶解在 1.0% NaOH(90ml) 水溶液中。溶液加热至 85°C, 在氩气环境下加热 3 小时。将溶液冷却至室温, 然后加入 NaCl(10g), 使用 10% 磷酸将 pH 调至 3。二氯甲烷萃取产物。萃取液使用无水硫酸钠进行干燥, 减压蒸馏去除溶剂。将粗产品溶解在少量的二氯甲烷中, 使用乙醚进行沉淀, 真空干燥。产率为 9.0g。NMR(CDC<sub>3</sub>) : 1.35ppm(t, -CH<sub>2</sub>-SH, 1H), 1.69ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH, 4H), 2.55ppm(m, -CH<sub>2</sub>-SH, 2H), 2.69ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-S-CH<sub>2</sub>-, 4H, 4.8mol%), 3.38ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.64ppm(s, PEG 主链)。上述 NMR 数据表明产物包含相对少量 (NMR 测定为 4.8mol%) 的二硫化物 - 连接二聚物, 其由巯基氧化形成。无需对硫醇进行进一步纯化。

[0285] mPEG<sub>10,000</sub>-4C-OPSS

[0286] 向 2,2'-二吡啶基二硫化物 (0.10g, 0.00045mol) 的无水甲醇 (40ml) 溶液中, 加入 mPEG<sub>10,000</sub>-丁烷硫醇 (2.0g, 0.00020 当量), 混合物在室温和氩气环境中搅拌 3 小时。减压蒸馏去除溶剂, 将残留物溶解在二氯甲烷 (5ml) 中, 使用 50ml 冷乙醚沉淀产物。干燥, 得到 1.8g 白色固体粉末。NMR(CDC<sub>3</sub>) : 1.68ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 1.76ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 2.82ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 3.38ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H),

3.64ppm(s, PEG 主链), 7.12, 7.68, 7.75, & 8.47ppm(4m, 吡啶基质子, 4H)。

[0287] 实施例 4 和 5 说明了高分子量相应试剂的制备。

[0288] 实施例 4

[0289] 制备 mPEG<sub>20,000</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物

[0290] (mPEG-4C-OPSS, 20KDa)

[0291] mPEG<sub>20,000</sub>-丁基溴化物

[0292] 共沸干燥 mPEG<sub>20,000</sub> (20.0g, 0.0010mol) (NOF 公司) 在甲苯 (200ml) 中的溶液, 馏出 50ml 甲苯。加入氢氧化钠 (0.4g, 60% 分散在液体石蜡中, 0.0100mol), 混合物在 60℃ 氩气环境下搅拌 1 小时。加入 1,4-二溴丁烷 (2.4g, 0.0111mol), 混合物在 75℃ 氩气环境下搅拌过夜。过滤混合物, 减压浓缩, 将残留物与 850ml 冷乙醚混合。滤出沉淀物, 减压干燥。产率为 18.2g。NMR(d<sub>6</sub>-DMSO): 1.60ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 1.84ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br, 2H), 3.24ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.51ppm(s, PEG 主链); 取代 98.0%。

[0293] mPEG<sub>20,000</sub>-丁烷硫醇

[0294] 向 mPEG<sub>20,000</sub>-丁基溴化物 (10.0g, 0.5mmol) 的无水乙醇 (100ml) 溶液中, 加入硫脲 (0.39g, 99%, 0.0051mol), 混合物在 78℃ 氩气环境下搅拌过夜。减压蒸馏移除溶剂, 将残留物溶解在 1.0% NaOH(90ml) 水溶液中。溶液加热至 85℃, 在氩气环境下加热 3 小时。将溶液冷却至室温, 然后加入 NaCl (10g), 使用 10% 磷酸将 pH 调至 3。二氯甲烷萃取产物。萃取液使用无水硫酸钠进行干燥, 减压蒸馏移除溶剂。将粗产品溶解在少量的二氯甲烷中, 使用乙醚进行沉淀, 真空干燥。产率为 8.2g。NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.35ppm(t, -CH<sub>2</sub>-SH, 1H), 1.69ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH, 4H), 2.55ppm(m, -CH<sub>2</sub>-SH, 2H), 2.69ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-S-CH<sub>2</sub>-, 4H, 3.4mol%), 3.38ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.64ppm(s, PEG 主链)。上述 NMR 数据表明产物包含非常少量 (NMR 测定为 3.4mol%) 的二硫化物-连接二聚物, 其由巯基氧化形成。无需对硫醇进行进一步纯化。

[0295] mPEG<sub>20,000</sub>-4C-OPSS

[0296] 向 2,2'-二吡啶基二硫化物 (0.05g, 0.00023mol) 的无水甲醇 (40ml) 溶液中, 加入 mPEG<sub>20,000</sub>-丁烷硫基 (2.0g, 0.00010 当量), 混合物在室温和氩气环境中搅拌 3 小时。减压蒸馏移除溶剂, 将残留物溶解在二氯甲烷 (5ml) 中, 使用 50ml 冷乙醚沉淀产物。得到 1.9g 白色固体粉末。NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.68ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 1.76ppm(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 2.82ppm(t, -CH<sub>2</sub>-S-, 2H), 3.38ppm(s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.64ppm(s, PEG 主链), 7.12, 7.68, 7.75, & 8.47ppm(4m, 吡啶基质子, 4H)。

[0297] 实施例 5

[0298] 制备 mPEG<sub>30,000</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物

[0299] (mPEG-4C-OPSS, 30KDa)

[0300] mPEG<sub>30,000</sub>-丁基溴化物

[0301] 共沸干燥 mPEG<sub>30,000</sub> (20.0g, 0.00067mol) (NOF 公司) 在甲苯 (150ml) 中的溶液, 馏出 50ml 甲苯。加入氢氧化钠 (0.3g, 60% 分散在液体石蜡中, 0.00750mol), 混合物在 60℃ 氩气环境下搅拌 1 小时。加入 1,4-二溴丁烷 (2.17g, 0.0100mol), 混合物在 75℃ 氩气环境下搅拌过夜。过滤混合物, 减压浓缩, 将残留物与 850ml 冷乙醚混合。滤出沉

淀物,减压干燥。产率为 15.3g。NMR( $d_6$ -DMSO):1.60ppm(m,  $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-CH_2-Br$ , 2H), 1.84ppm(m,  $-O-CH_2-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-Br$ , 2H), 3.24ppm(s,  $-OCH_3$ , 3H), 3.51ppm(s, PEG 主链);取代 96.0%。

#### [0302] mPEG<sub>30,000</sub>-丁烷硫醇

[0303] 向 mPEG<sub>30,000</sub>-丁基溴化物 (10.0g, 0.00033mol) 的无水乙醇 (100ml) 溶液中,加入硫脲 (0.26g, 99%, 0.00338mol), 混合物在 78℃ 氩气环境下搅拌过夜。减压蒸馏移除溶剂,将残留物溶解在 1.0% NaOH(90ml) 水溶液中。溶液加热至 85℃,在氩气环境下加热 2.5 小时。将溶液冷却至室温,然后加入 NaCl (10g),使用 10% 磷酸将 pH 调至 3。二氯甲烷萃取产物。萃取液使用无水硫酸钠进行干燥,减压蒸馏移除溶剂。将粗产品溶解在少量的二氯甲烷中,使用乙醚进行沉淀,真空干燥。产率为 9.4g。NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.35ppm(t,  $-CH_2-\underline{SH}$ , 1H), 1.69ppm(m,  $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-CH_2-SH$ , 4H), 2.55ppm(m,  $-\underline{CH_2}-SH$ , 2H), 2.69ppm(t,  $-\underline{CH_2}-S-S-\underline{CH_2}-$ , 4H, 3.8mol%), 3.38ppm(s,  $-OCH_3$ , 3H), 3.64ppm(s, PEG 主链)。上述 NMR 数据表明产物包含非常少量 (NMR 测定为 3.8mol%) 的二硫化物-连接二聚物,其由巯基氧化形成。无需对硫醇进行进一步纯化。

#### [0304] mPEG<sub>30,000</sub>-4C-OPSS

[0305] 向 2,2'-二吡啶基二硫化物 (0.05g, 0.00023mol) 的无水甲醇 (60ml) 溶液中,加入 mPEG<sub>30,000</sub>-丁烷硫醇 (3.0g, 0.00010 当量),混合物在室温和氩气环境中搅拌 3 小时。减压蒸馏移除溶剂,将残留物溶解在二氯甲烷 (8ml) 中,使用 60ml 冷乙醚沉淀产物。得到 2.9g 白色固体粉末。NMR(CDCl<sub>3</sub>):1.68ppm(m,  $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-CH_2-S-$ , 2H), 1.76ppm(m,  $-O-CH_2-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-S-$ , 2H), 2.82ppm(t,  $-\underline{CH_2}-S-$ , 2H), 3.38ppm(s,  $-OCH_3$ , 3H), 3.64ppm(s, PEG 主链), 7.12, 7.68, 7.75, & 8.47ppm(4m, 吡啶基质子, 4H)。

#### [0306] 实施例 6

#### [0307] BSA 和 mPEG<sub>5000</sub>-4C-OPSS 以及 mPEG<sub>5000</sub>-MAL 的缀合

#### [0308] (MAL = 马来酰亚胺) (比较实施例)

#### [0309] 还原 BSA (二硫化物键裂解)

[0310] 将 3.1mg BSA 样品加入到包含 3.1mL 1x PBS 并且 pH 为 7.5 的 5mL ReactiVial™ 中。将溶液放在搅拌器中,中等速率搅拌。在搅拌状态下,向溶液中加入 4.62mg 二巯基苏糖醇 (DTT) 样品,室温下反应 2 小时,使样品还原完全。

[0311] 将反应混合物放在 350mL 有 10,000MW PES 膜的 AmiconStirCell 中,以去除 DTT。向 350ml 体积中加入缓冲液 (1x PBS pH 7.5),搅拌以防止发生沉降。向装置中增加压力 (60psi),直至体积减小至 < 10mL。然后向 350ml 体积中再次加 PBS,然后将此过程重复两次。冷冻 1ml 等分液用于标准 (凝胶, HPLC 等),剩下的体积用于缀合步骤。

#### [0312] 缀合

[0313] 从步骤 A 得到的还原 BSA(4mL) 和实施例 1 所述的 2.35mg(10x 过量) mPEG<sub>5k</sub>-4C-OPSS 在搅拌盘上的 5ml ReactiVial 中混合,所述搅拌盘为中间设置。使用步骤 A 的还原 BSA(4mL) 和 2.35mg(10x 过量) mPEG<sub>5k</sub>-MAL 可以制备相似的反应混合物。(mPEG-MAL 可从 NektarTherapeutics, Huntsville, AL 获得,马来酰亚胺通过环 N 原子和 mPEG 的末端  $-OCH_2CH_2-$  相连接) 玻璃瓶在室温下放置 60 小时。

#### [0314] 分析

- [0315] 根据下述条件,将置于 10% Bis-Tris NuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 中。
- [0316] 4x LDS 样品缓冲液 (Invitrogen) 10  $\mu$  L/ 样品
- [0317] 反应样品 30  $\mu$  L/ 样品
- [0318] 1x MES 电泳缓冲液 (Invitrogen) 600mL
- [0319] 多标记蛋白质标准样品 (Invitrogen) 7  $\mu$  L
- [0320] 蓝色安全染料 (Invitrogen) 50mL
- [0321] 填充样品 (a+b) 30  $\mu$  L
- [0322] 电压 200V
- [0323] 安培 400mA
- [0324] 时间 36 分钟
- [0325] 图 1 显示了使用蓝色安全染料染色的最终凝胶。
- [0326] 图 2 显示了另外用碘化钡染色的相同凝胶,用于检测 PEG。
- [0327] 图 2 的凝胶显示出的各种分子量和相对强度如下表所示:
- [0328]

第 2 列: 还原的 BSA		第 3 列: PEG <sub>5K</sub> -MAL 缀合反应		第 4 列: PEG <sub>5K</sub> -OPSS 缀合反应	
MW	Rel. Int.	MW	Rel. Int.	MW	Rel. Int.
100718.7	0.0727	126546.9	0.0591	134703.1	0.0433
50521.2	0.9273	85120	0.0852	85120	0.0664
		75000	0.1449	75460	0.0826
		58440	0.3984	58440	0.4224
		50077.5	0.1822	50077.5	0.2032
		7883.1 <sup>a</sup>	0.1301	22090.9 <sup>a</sup>	0.0806
				6454.5 <sup>a</sup>	0.1015

[0329] <sup>a</sup> 通过 BaI 得到的假设值 (为了检测 PEG)

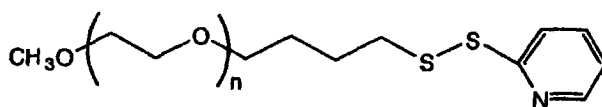
[0330] PEG<sub>5K</sub>-MAL-BSA 缀合反应生成了 39.8 % 单 PEG 聚合物 (58440MW), mPEG<sub>5K</sub>-4C-OPSS-BSA 缀合反应生成了 42.2% 单 PEG 聚合物。相应地,本发明巯基聚合物试剂的缀合强于从对比聚合物试剂 (以马来酰亚胺为末端的聚合物) 观察到的结果,这表明 PEG-OPSS 的显著二聚化作用没有发生,其中所述 PEG-OPSS 对于以 mPEG-乙烷硫醇为基础的相应试剂具有代表性。

[0331] 实施例 7

[0332] 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和 mPEG<sub>10,000</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物

[0333] (mPEG<sub>10,000</sub>-4C-OPSS) 的 PEG 化作用

[0334]



[0335] mPEG<sub>10,000</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物 (mPEG<sub>10,000</sub>-4C-OPSS)

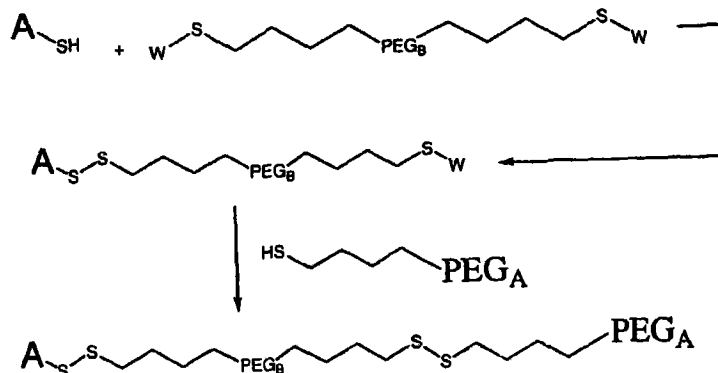
[0336] 将 50 倍过量的 (相对于原 G-CSF 溶液被测量的部分中 G-CSF 的量) 实施例 3 制备的 mPEG<sub>10,000</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物 (mPEG<sub>10,000</sub>-4C-OPSS) 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 得到 10% 试剂溶液。将 10% 试剂溶液快速加入到原 G-CSF 溶液 (在磷酸钠缓冲液中为 0.4mg/ml, pH 7.0) 等分液中, 混合均匀。考虑到 mPEG-OPSS 试剂和游离 (即, 其中不包括蛋白质内的 -二硫化物键) 半胱氨酸残基在 G-CSF 的 17 位点结合, 将反应溶液放置在 RotoMix (Type 48200, ThermoLyne, Dubuque IA) 上以在 37°C 时促进缀合反应。30 分钟后, 向反应溶液中再加入 50 倍过量的 mPEG<sub>10,000</sub>-4C-OPSS, 然后在 37°C 混合 30 分钟, 再在室温下混合 2 小时, 因而形成 mPEG<sub>10,000</sub>-G-CSF 缀合物溶液。

[0337] 利用 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 确定 mPEG<sub>10,000</sub>-G-CSF 缀合物溶液的性质。PEG 化反应产生了 36% 的 mPEG<sub>10,000</sub>-G-CSF 缀合物 (在 G-CSF 的半胱氨酸残基上的单 PEG 化缀合物)。利用阳离子交换色谱法纯化缀合物。

[0338] 可以采用相同的方法使用其他分子量的 mPEG-4C-OPSS 制备其他缀合物。

[0339] 下文所述的实施例 8-10, 采用下述方法 (如下文方案所示) 制备, 在该方法中具有相对低分子量的聚合物试剂 (方案中的 PEG<sub>B</sub>) 先结合到用于缀合的部分 (A) 上, 然后较高分子量聚合物试剂 (方案中的 PEG<sub>A</sub>) 再连接到缀合物的聚合部分上, 所述聚合部分是由低分子量试剂和缀合部分连接形成的。利用此方法, 使有效地修饰被阻碍的位置变成可能。在下述实施例中, 被阻碍的位置是指包含被部分包埋的游离巯基的 G-CSF 半胱氨酸残基。

[0340]

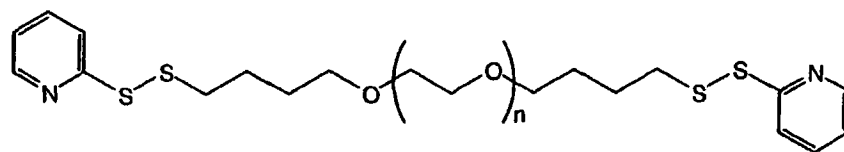


[0341] 实施例 8a

[0342] G-CSF 和 PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物) 及 mPEG<sub>20,000</sub>-丁烷硫

[0343] 醇的 PEG 化作用

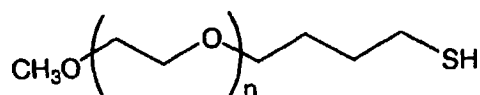
[0344]



[0345] PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物)

[0346] (PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS))

[0347]



[0348] mPEG<sub>20,000</sub>-丁烷硫醇

[0349] (mPEG<sub>20K</sub>-4C-SH)

[0350] 在此实施例中,双官能度 PEG-二-(4C-OPSS) 试剂通过二硫键插入立体被阻碍的游离巯醇中,然后 mPEG<sub>20K</sub>-丁烷硫醇和 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS) 试剂的游离残基通过另一个二硫键发生结合反应。

[0351] 将实施例 2 制备的储存在 -20℃ 氩气条件下的 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS) 加热至室温。将 50 倍过量(相对于原 G-CSF 溶液中被测量部分中的 G-CSF 的量)的试剂溶解在 DMSO 中,得到 10% 的溶液。将此 10% 试剂溶液快速加入到原 G-CSF 溶液中(在磷酸钠缓冲液中为 0.4mg/ml, pH 7.0),混合均匀。将反应溶液放置在 RotoMix (48200 型, Thermolyne, Dubuque IA) 上,先在 37℃ 混合 1 小时,然后在室温下混合 2 小时。反应完全后,再次使用 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液透析反应溶液,以移除过量的游离 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS)

[0352] 然后,将 50 倍过量(相对于 G-CSF) 实施例 4B 制备的 mPEG<sub>20,000</sub>-丁烷硫醇加入到中间体缀合物的透析溶液中,先在室温下混合 1 小时,然后 4℃ 过夜,因而生成 mPEG<sub>20,000</sub>-PEG<sub>2,000</sub>-GCSF 缀合物。利用 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 确定产物的性质。

[0353] 此方法可使用具有其他分子量的 PEG-二-(4C-OPSS) 和 mPEG-4C-SH 用于制备其他缀合物,同样其中的 PEG-二-(4C-OPSS) 试剂优选为相对低分子量。

[0354] 实施例 8b

[0355] G-CSF 和 PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物) 及 mPEG<sub>30,000</sub>-丁烷硫

[0356] 醇的 PEG 化作用

[0357] 使用相应量的 PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物) 和 mPEG<sub>30,000</sub>-丁烷硫醇重复实施例 8a 的操作步骤,得到相应的 mPEG<sub>30,000</sub>-PEG<sub>2,000</sub>-GCSF 缀合物。

[0358] 使用具有其他分子量的 PEG-二-(4C-OPSS) 和 mPEG-4C-SH 通过类似的方法可得到其他缀合物。

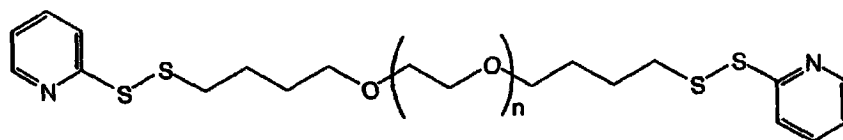
[0359] 下述实施例 9-10 各不相同,其中实施例 9 中的低分子量 PEG 包括本发明所述的具有四个碳原子的亲水键,而实施例 10 的低分子量 PEG 仅包括两个碳原子的连接基。可以看出,本发明的连接基可以显著地提高缀合物的产率。

[0360] 实施例 9

[0361] G-CSF 和 PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物) 及支链 PEG<sub>2,000</sub>-二-

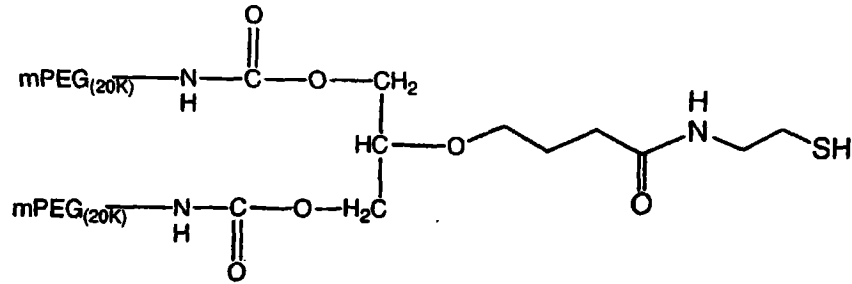
[0362] 硫醇的 PEG 化作用

[0363]



[0364] PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-邻吡啶基二硫化物)

[0365]



[0366] PEG<sub>240,000</sub>-硫醇

[0367] 同样地,此实施例应用的方法为:开始时,具有相对低分子量的聚合物试剂(在此实施例中,为 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS))和 G-CSF 部分连接,然后相对高分子量聚合物试剂(在此实施例中,为支链 PEG<sub>240,000</sub>-硫醇)和 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS) 试剂的残基通过另一个二硫化物键相结合。

[0368] 将实施例 2 制备的储存在 -20 °C 氩气环境下的 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS) 加热至室温。将 50 倍过量(相对于相对于原 G-CSF 溶液中被测量部分中的 G-CSF 的量)的热 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS) 溶解在 DMSO 中,形成 10% 试剂溶液。10% 试剂溶液快速加入到原 G-CSF 溶液中(在磷酸钠缓冲液中为 0.4mg/ml, pH 7.0),混合均匀。将反应溶液放置在 RotoMix (48200 型, Thermolyne, Dubuque IA) 上,先在 37 °C 混合 1 小时,然后在室温下混合 2 小时。反应完全后,再次使用 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液透析反应溶液,以移除过量的游离 PEG<sub>2,000</sub>-二-(4C-OPSS)。

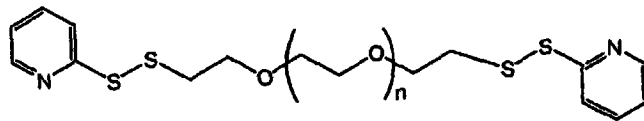
[0369] 然后,将 75 倍量(相对于 G-CSF)的 PEG<sub>240,000</sub>-硫醇(NektarTherapeutics)加入到透析的缀合物溶液中,先在室温下混合 3 小时,然后 4 °C 过夜,因而生成 PEG<sub>240,000</sub>-PEG<sub>2,000</sub>-G-CSF 缀合物。利用 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 确定产物的性质。缀合物的终产率为 35%。

[0370] 实施例 10(比较例)

[0371] G-CSF 和 PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-邻吡啶基二硫化物)及 PEG<sub>240,000</sub>-硫醇

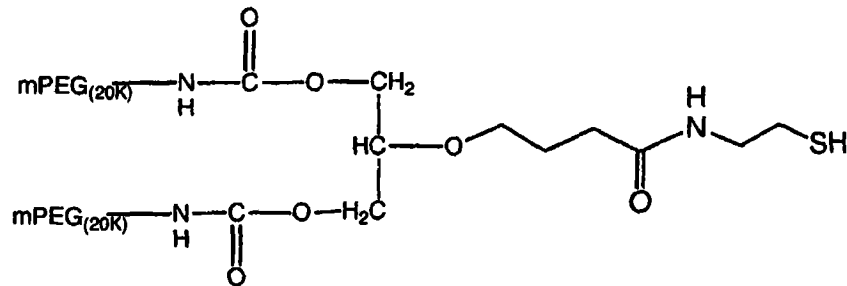
[0372] 的 PEG 化作用

[0373]



[0374] PEG<sub>2,000</sub>-二-((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-邻吡啶基二硫化物)

[0375]



[0376] PEG<sub>240,000</sub>-硫醇

[0377] 实施例 10 的反应过程基本上是不同的,其中使用具有两个碳原子而不是四个碳

原子的连接基低分子量 PEG 硫醇试剂。

[0378] 相应地,将储存在  $-20^{\circ}\text{C}$  氩气条件下的从 NektarTherapeutics 购得的  $\text{PEG}_{2,000}$ -二-(2C-OPSS) 加热至室温。50 倍量(相对于相对于原 G-CSF 溶液中被测量部分中的 G-CSF 的量)的试剂溶于 DMSO 中形成 10% 溶液。将此溶液快速加入到原 G-CSF 溶液中(在磷酸钠缓冲液中为  $0.4\text{mg/ml}$ ,  $\text{pH } 7.0$ ),混合均匀。将反应溶液放置在 RotoMix(48200 型, Thermolyne, Dubuque IA) 上,先在  $37^{\circ}\text{C}$  混合 1 小时,然后在室温下混合 2 小时。反应完全后,再次使用  $\text{pH } 7.0$  的磷酸钠缓冲液透析反应溶液,以移除过量的游离  $\text{PEG}_{2,000}$ -二-(2C-OPSS)。

[0379] 然后,将 70 倍量(相对于 G-CSF)的支链  $\text{PEG}_{240,000}$ -硫醇(Nektar Therapeutics) 加入到透析的缀合物溶液中,先在室温下混合 3 小时,然后  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。然而,SDS-PAGE 和 RP-HPLC 分析显示没有检测到任何  $\text{PEG}_{240,000}$ - $\text{PEG}_{2,000}$ -G-CSF 缀合物。

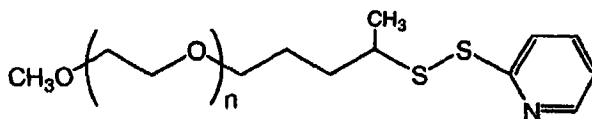
[0380] 证据表明,亚乙基(C2)-连接的 PEG-OPSS 试剂经还原裂解可有效地在试剂和靶蛋白反应之前破坏试剂。亚丁基(C4)-连接的试剂对于这种裂解具有更高的稳定性,因而能够得到更高产率的缀合物。

[0381] 实施例 11

[0382] 制备  $\text{mPEG}_{5000}$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}(\text{CH}_3)$ -邻吡啶基二硫化物 ( $\text{mPEG}-(\alpha$ -甲

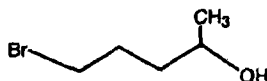
基)-4C-OPSS, 5KDa)

[0384]



[0385] 1-甲基-4-溴-1-丁醇

[0386]

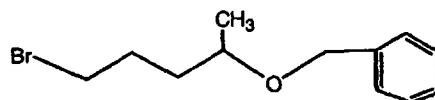


[0387] 将 2-甲基四氢呋喃 ( $10.14\text{g}$ ,  $0.0834\text{mol}$ ) 溶解在氯仿 ( $72\text{ml}$ ) 中,然后加入四乙胺溴化物 ( $18.4\text{g}$ ,  $0.0876\text{mol}$ )。然后在 15 分钟内逐滴加入三氟二乙基乙醚硼 ( $11.12\text{ml}$ ,  $0.0876\text{mol}$ ),室温下搅拌此溶液过夜。将溶液冷却至  $0-5^{\circ}\text{C}$ ,使用饱和  $\text{NaHCO}_3$  ( $80\text{ml}$ ) 水溶液洗涤。分离有机层,用水 ( $80\text{ml}$ ) 和饱和  $\text{NaCl}$  ( $80\text{ml}$ ) 水溶液洗涤,无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。蒸馏出溶剂,得到  $9.5\text{g}$  淡黄色粘稠液体。

[0388] NMR ( $d_6$ -DMSO) :  $1.04\text{ppm}$  (d,  $-\text{CH}_3-$ , 3H),  $1.43\text{ppm}$  (b,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H),  $1.84\text{ppm}$  (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H),  $3.53\text{ppm}$  (t,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ , 2H),  $3.60\text{ppm}$  (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 1H),  $4.41\text{ppm}$  (bs,  $-\text{OH}$ , 1H)。

[0389] 1-溴-4-甲基-4-苯甲氧基丁烷

[0390]



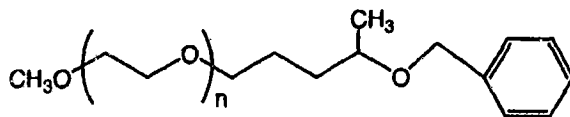
[0391] 向冷却到  $0^{\circ}\text{C}$  的 1-甲基-4-溴-1-丁醇 ( $9.0\text{g}$ ,  $0.05384\text{mol}$ ) 和苯甲基 2,2,2-三氯乙酰亚胺酯 ( $16.3\text{g}$ ) 在无水环己烷 ( $100\text{ml}$ ) 和无水二氯甲烷 ( $50\text{ml}$ ) 的溶液中,加入三氟甲基磺酸 ( $1.0\text{ml}$ ),混合物在室温氩气条件下搅拌过夜。过滤混合物,使用饱和  $\text{NaHCO}_3$  ( $250\text{ml}$ )

溶液和去离子水 (250ml) 洗涤, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。减压蒸馏移除溶剂, 真空蒸馏粗产品 (9.2g), 得到 7.2g 无色粘稠液体。

[0392] NMR ( $d_6$ -DMSO) : 1.14ppm (d,  $-\text{CH}_3$ -, 3H), 1.57ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H), 1.88ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H), 3.53ppm (bm,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ , 2H and  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 1H), 4.46ppm (m,  $-\text{CH}_2-$  苯甲基, 2H), 7.32ppm (m,  $\text{C}_6\text{H}_5$ -, 苯甲基, 5H)。

[0393] mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-苯甲氧基丁烷

[0394]

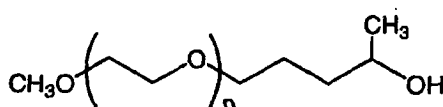


[0395] 向共沸干燥的 mPEG<sub>5000</sub> (20.0g, 0.004 摩尔) (NOF 公司) 在无水甲苯 (200ml) 的溶液中, 加入 1.0M 的叔丁烷氧基钾在叔-丁醇 (16.0ml, 0.0160 摩尔) 和 1-溴-4-甲基-4-苯甲氧基丁烷 (3.10g, 0.012 摩尔) 中的溶液。70°C 氮气条件下, 搅拌反应混合物 20 小时。过滤得到的混合物, 真空浓缩至干燥。将粗产品溶解在 30ml 二氯甲烷中, 0-5°C 下使用 500ml 异丙醇进行沉淀。真空过滤收集终产物, 真空干燥过夜。产率: 17.4g。

[0396] NMR ( $d_6$ -DMSO) : 1.14ppm (d,  $-\text{CH}_3$ , 3H), 1.57ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H), 1.88ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H), 3.24ppm (s,  $-\text{OCH}_3$ , 3H), 3.51ppm (s, 聚合物主链), 4.46ppm (m,  $-\text{CH}_2-$  苯甲基, 2H), 7.32ppm (m,  $\text{C}_6\text{H}_5$ -, 苯甲基, 5H)。

[0397] mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-丁醇

[0398]



[0399] 将 mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-苯甲氧基丁烷 (15.0g, 0.00300 摩尔)、乙醇 (150ml) 和钯 (活性碳上 10%, 1.5g) 的混合物在 45psi 氢气环境下进行氢化作用, 过夜。过滤混合物, 减压蒸馏移除溶剂。将粗产品溶解在二氯甲烷 (25ml) 中, 0-5°C 下利用 400ml 异丙醇进行沉淀。滤除产物, 减压干燥。产率: 13.1g。

[0400] NMR ( $d_6$ -DMSO) : 1.14ppm (d,  $-\text{CH}_3$ , 3H), 1.57ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H), 1.88ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ , 2H), 3.24ppm (s,  $-\text{OCH}_3$ , 3H), 3.51ppm (s, 聚合物主链), 4.45ppm (bs,  $-\text{OH}$ , 1H)。

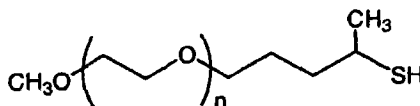
[0401] mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-甲基磺酰丁烷

[0402] 共沸干燥 mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-丁醇 (10.0g, 0.0020 摩尔) 在甲苯 (100ml) 中的溶液, 减压馏出甲苯。将干燥的 mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-丁醇溶于无水甲苯 (100ml) 和无水二氯甲烷 (20ml) 的混合物中, 加入三乙胺 (0.9ml, 0.0030 摩尔) 和甲基磺酰氯 (0.45ml, 0.0026 摩尔), 混合物在室温氮气环境中搅拌过夜。减压蒸馏移除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷 (15ml) 中, 加入 250ml 异丙醇。过滤沉淀, 真空干燥, 得到 8.9g 白色固体粉末。

[0403] NMR ( $d_6$ -DMSO) : 1.40ppm (d,  $-\text{CH}_3$ , 3H), 1.57ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  甲磺酸盐, 2H), 1.88ppm (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  甲磺酸盐, 2H), 3.17ppm (s,  $-\text{CH}_3$ , 甲磺酸盐, 3H), 3.24ppm (s,  $-\text{OCH}_3$ , 3H), 3.51ppm (s, 聚合物主链), 4.00ppm (m,  $-\text{CH}-$  甲磺酸盐, 1H)。

[0404] mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-丁烷硫醇

[0405]



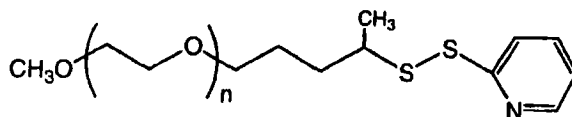
[0406] 向 mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-甲基磺酰丁烷 (8.0g, 0.0016mol) 在无水乙醇 (80ml) 的溶液中, 加入硫脲 (1.24g, 0.0163mol), 混合物在 78°C 氩气环境下搅拌过夜。减压蒸馏移除溶剂, 将残留物溶于 1% NaOH (84ml) 水溶液中。氩气条件下, 溶液加热至 85°C, 加热 2.5 小时。在溶液冷却至 35°C 后, 使用 10% 磷酸将 pH 调节为 3。加入 NaCl (24g), 使用二氯甲烷萃取产物。萃取液用无水硫酸钠干燥, 冷乙醚沉淀出产物。产率为 7.3g。

[0407] NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.24ppm (d, -CH<sub>3</sub>, 3H), 1.38ppm (m, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-SH, 2H), 1.54ppm (d, -CH-SH, 1H), 1.88ppm (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-SH, 2H), 2.83ppm (m, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-SH, 1H), 2.05ppm (m, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-S-S-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, 4H, 0.7mol%), 3.38ppm (s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.64ppm (s, PEG 主链)。

[0408] 上述 NMR 数据表明产物包含非常少量 (NMR 测定为 0.7mol%) 的二硫化物-连接二聚物, 其由巯基氧化形成。无需对硫醇进行进一步纯化。

[0409] mPEG<sub>5000</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)OPSS

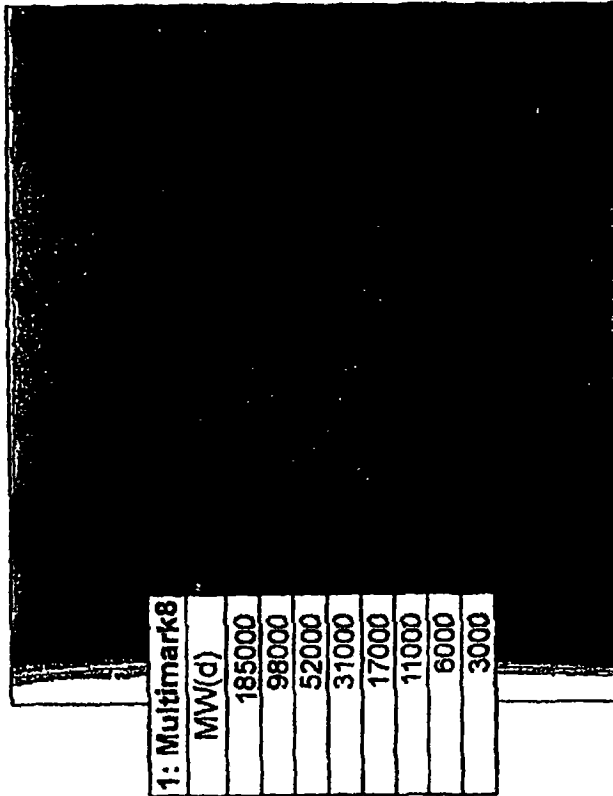
[0410]



[0411] 向 mPEG<sub>5000</sub>-4-甲基-4-丁烷硫醇 (2.0g, 0.0004mol) 在无水甲醇 (40ml) 的溶液中, 加入 2,2'-二吡啶基二硫化物 (0.18g, 0.00082mol), 混合物在室温氩气条件下搅拌 4 个小时。减压蒸馏移除溶剂, 将残留物溶于二氯甲烷 (5ml), 使用 50ml 冷乙醚沉淀出产物。产率为 1.7g。

[0412] NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.34ppm (d, -CH<sub>3</sub>, 3H), 1.68ppm (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-SH, 2H), 1.88ppm (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-SH, 2H), 3.38ppm (s, -OCH<sub>3</sub>, 3H), 3.64ppm (s, PEG 主链), 7.12, 7.68, 7.75, & 8.47ppm (4m, 吡啶基质子, 4H)。

5K MALEmide 对 5K OPSS



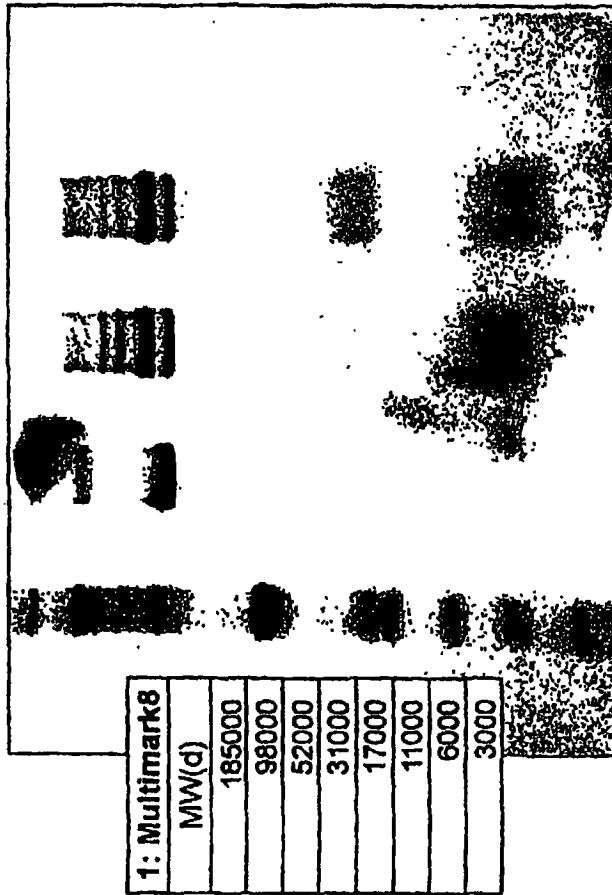
1: MultimarK8
MW(d)
185000
98000
52000
31000
17000
11000
6000
3000

2: red-BSA	
MW(d)	Rel. Int.
98000	0.1200
51125	0.8800

3: 5k MAL-BSA	
MW(d)	Rel. Int.
120095.2	0.0675
84525.3	0.0711
74303	0.1135
57111.1	0.4921
49666.7	0.2558

4: 5k OPSS-BSA	
MW(d)	Rel. Int.
125619	0.0604
86383.8	0.0413
74303	0.0602
56646.5	0.5611
49520.8	0.2770

图 1



1: Multimark8	
MW(d)	Rel. Int.
185000	
98000	
52000	
31000	
17000	
11000	
6000	
3000	

2: red-BSA	
MW(d)	Rel. Int.
N 100718.7	0.0727
N 50521.1	0.9273

3: 5k MAL-BSA	
MW(d)	Rel. Int.
PM 126546.9	0.0591
? 85120	0.0852
PM 75000	0.1449
? 58440	0.3984
N 50077.5	0.1822
P 7883.1	0.1301

4: 5k OPSS-BSA	
MW(d)	Rel. Int.
PM 134703.1	0.0433
? 85120	0.0664
PM 75460	0.0826
? 58440	0.4224
N 50077.5	0.2032
P 22090.9	0.0806
P 6454.5	0.1015

图 2