



(51) МПК  
*C08G 65/32* (2006.01)  
*C08G 65/321* (2006.01)  
*C08G 59/14* (2006.01)  
*A61K 31/075* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2010140190/04, 30.09.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 30.09.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.09.2010

(45) Опубликовано: 27.01.2012 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2316339 C1, 10.02.2008. US 20050080206 A1, 14.04.2005. RU 2176253 C2, 27.11.2001. JP 2008308690 A, 25.12.2008. WO 9901469 A1, 14.01.1999. KR 20080072960 A, 07.08.2008. SU 891702 A1, 23.12.1981. RU 2341539 C9, 20.12.2008. EA 11829 B1, 30.06.2006.

Адрес для переписки:

630117, г.Новосибирск, а/я 5, Л.Я. Кучумовой

(72) Автор(ы):

**Шкурупий Вячеслав Алексеевич (RU),  
 Лузгина Наталья Геннадьевна (RU),  
 Троицкий Александр Васильевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Общество с ограниченной ответственностью  
 Научно-производственное объединение  
 "Перспектива" (ООО НПО "Перспектива")  
 (RU)**

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к способу получения активированного полиэтиленоксида, применяемого в медицине и ветеринарии в качестве носителей и модификаторов в различных методиках пегилирования природных и синтетических биологически-активных веществ и фармакологических субстанций. Способ заключается в окислении полиэтиленоксида 2%-ным раствором

перманганата калия в количестве от 1,6 до 20% от объема раствора полиэтиленоксида при температуре 80-100°C в присутствии органической или неорганической кислоты с последующим удалением продуктов прореагировавшего окислителя. Технический результат - упрощение способа получения активированного полиэтиленоксида и повышение качества целевого продукта. 2 з.п. ф-лы, 1 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 441 036** (13) **C1**

(51) Int. Cl.  
*C08G 65/32* (2006.01)  
*C08G 65/321* (2006.01)  
*C08G 59/14* (2006.01)  
*A61K 31/075* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010140190/04, 30.09.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**30.09.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **30.09.2010**

(45) Date of publication: **27.01.2012 Bull. 3**

Mail address:

**630117, g.Novosibirsk, a/ja 5, L.Ja. Kuchumovoj**

(72) Inventor(s):

**Shkurupij Vjacheslav Alekseevich (RU),  
Luzgina Natal'ja Gennad'evna (RU),  
Troitskij Aleksandr Vasil'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju  
Nauchno-proizvodstvennoe ob"edinenie  
"Perspektiva" (OOO NPO "Perspektiva") (RU)**

(54) **METHOD OF PRODUCING ACTIVATED POLYETHYLENE OXIDE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method involves oxidation of polyethylene oxide with 2% potassium permanganate solution in amount ranging from 1.6 to 20% of the volume of the polyethylene oxide solution at temperature 80-100°C in the presence of an organic

or inorganic acid, followed by removal of products of unreacted oxidising agent.

EFFECT: simple method of obtaining activated polyethylene oxide and high quality of the end product.

3 cl, 1 tbl, 4 ex

RU 2 4 4 1 0 3 6 C 1

RU 2 4 4 1 0 3 6 C 1

Изобретение относится к медицине и ветеринарии, в частности к способу получения активированного полиэтиленоксида, который применяется в качестве носителя и модификатора в различных методиках пегилирования природных и синтетических биологически-активных веществ и фармакологических субстанций.

Одним из путей повышения эффективности лекарственных препаратов белковой структуры является химическая модификация их молекулы, состоящая не в собственно изменении их структуры, а в физико-химической трансформации, достигаемой соединением нативной молекулы с полиэтиленгликолем (ПЭГ, синоним - полиэтиленоксид). Данный процесс соединения нативной молекулы лекарственного препарата с ПЭГ получил название "пегилирование". Подобная химическая модификация фармакологических препаратов пептидной структуры адресно направлена на улучшение их переносимости, повышение биодоступности, снижение иммуногенности, повышение периода их полужизни и стабильности.

ПЭГ в качестве потенциального объекта-модификатора веществ пептидной структуры привлек внимание исследователей еще в начале 1970-х годов. В настоящее время ПЭГ одобрен Обществом по питанию и лекарственным препаратам США (FDA)

в качестве субстанции, разрешенной к использованию в медицине (производство лекарственных препаратов), продуктах питания и косметологии. Молекулы ПЭГ - это водорастворимые полимеры окиси этилена с двумя терминальными гидроксильными группами, они (молекулы) могут иметь различную молекулярную массу и стереохимическую структуру. Молекулярный вес молекул ПЭГ может колебаться в пределах 300-40000 Дальтон, а выстроенные в цепи макромолекулы ПЭГ могут формировать как разветвленную, так и линейную стереохимию. В настоящее время имеется достаточно большое число лекарственных препаратов, представляющих собой пегилированные биологически-активные пептиды. В частности, с помощью пегилирования модифицированы многие лекарственные препараты, например: L - аспарагиназа, адено-зиндеаминаза, супероксиддисмутаза, интерферон - альфа2b, sTNF - RI, липосомальный доксорубин, уриказы, интерлейкин - 2, каталаза, билирубиноксидаза, стрептокиназа, t - PA (активатор плазминогена), гранулоцитарный/ мегакариоцитарный фактор роста (1-9). Для модификации биологически-активного вещества полиэтиленоксид должен быть активирован путем введения в его состав высоко реакционноспособных групп. В связи с тем, что в структуре полиэтиленоксидов присутствуют две функциональные группы - гидроксильные и эфирные, то активация полиэтиленоксида может быть проведена только путем функционализации гидроксильных групп, так как простые эфирные связи в полиэтиленоксидах химически высоко стабильны. Для активации полиэтиленоксидов используют стандартные методы, используемые для активации гидроксилсодержащих сорбентов (например, сефарозы). В частности, для этих целей может быть использован бромциан, карбодиимиды, N-оксисукцинимиды, бис-оксираны, дивинил-сульфон, трихлортриазин, карбонилдиимидазол, бензохинон (10). Все эти реагенты обладают высокой токсичностью, и очистка активированного полиэтиленоксида представляет собой трудоемкий и дорогостоящий процесс, так как примесей активирующих реагентов в конечном продукте не должно быть в связи с тем, что объектами пегилирования являются лекарственные препараты.

Известен радиационно-химический способ активации полиэтиленоксида, который был использован для иммобилизации протеолитических ферментов *Bacillus subtilis* (11). Сущность способа заключается в облучении водных растворов полиэтиленоксида, содержащего растворенные протеазы, ионизирующим излучением (поток

ускоренных электронов или гамма излучением) в дозе 1,0-2,5 Мрад. В результате свободнорадикальных реакций полиэтиленоксид связывается с протеазами за счет карбонильных групп, которые образуются при облучении полимера.

В работе (12) описан механизм радиационно-химической иммобилизации протеаз на полиэтиленоксиде и показан выход реакционноспособных карбонильных групп в зависимости от дозы ионизирующего излучения.

Наиболее ближайшим к заявляемому способу-прототипом является способ получения инсулина для перорального применения, заключающийся в следующем. Готовят 1-50% водный раствор полиэтиленоксида с молекулярной массой от 0,4 до 40 кДа. Затем раствор облучают высокоэнергетическим ионизирующим излучением, преимущественно гамма-излучением или потоком ускоренных электронов в дозах, обеспечивающих протекание свободно-радикальных реакций, преимущественно 1,0-5,0 Мрад. Далее в раствор радиационно-активированного полиэтиленоксида вводят инсулин до конечной концентрации (по белку) от 1-10 мг/мл (или по активности инсулина 10-100 МЕ/мл соответственно), в соотношении полиэтиленоксид: инсулин, равном (1-500):1, смесь перемешивают в течение 10-30 минут до получения однородного прозрачного или слегка опалесцирующего раствора (13). Известный способ позволяет повысить терапевтическую эффективность инсулина.

Недостатками способа-прототипа являются:

1. При облучении водных растворов органических соединений, в частности водных растворов полиэтиленоксида, декстрана и других водорастворимых полимеров в результате радиационно-химических реакций происходит образование перекиси водорода и, соответственно, пероксидных групп в облучаемом полимере, которые, с одной стороны, обладают цитотоксическими эффектами, с другой стороны, эти соединения являются основой для протекания пострадиационных реакций, описанных в литературе, которые в свою очередь существенно снижают стабильность активированного полимера, в том числе стабильность конъюгата полимера с биологически-активным веществом. Выход перекиси водорода пропорционален дозе ионизирующего излучения (14). В связи с этим способ-прототип не позволяет достичь стабильности активированного полимера или его конъюгатов с биологически-активными веществами без удаления перекиси водорода или органических пероксидов. Данная задача может быть решена различными химическими методами, например ультрафильтрацией, хроматографией, но применительно к радиационно-активированному полиэтиленоксиду в современной научно-технической литературе нет сведений о разработанных способах такой очистки, к тому же все перечисленные теоретически приемлемые способы трудоемкие и дорогостоящие.

2. В способе-прототипе используются радиационные установки, такие как гамма-источники или ускорители электронов. Это весьма сложные и крайне дорогостоящие установки, требующие специальных условий работы и техники безопасности, что значительно усложняет и удорожает способ активации полиэтиленоксида, в сравнении с химическими методами, даже если используются токсичные реагенты и возникает необходимость в сложных методах очистки конечного продукта.

Таким образом, недостатки способа-прототипа сводятся к сложности, экономической неэффективности ввиду дорогостоящего оборудования и недостаточно высокому качеству радиационно-активированного полиэтиленоксида, вследствие накопления перекисных продуктов радиолиза.

Технической задачей изобретения является упрощение известного способа и повышение качества целевого продукта.

Поставленная техническая задача достигается заявляемым способом, заключающимся в следующем

Водный 5-50% раствор полиэтиленоксида с молекулярной массой 0,4-40 кДа нагревают до температуры 80-100°C и окисляют перманганатом калия в кислой среде.

Для этого к нагретому раствору полиэтиленоксида добавляют органическую или неорганическую кислоту, затем 2%-й (по массе) раствор перманганата калия в количестве от 1,6 до 20% от объема раствора полиэтиленоксида, смесь нагревают до выпадения в осадок двуокиси марганца. Надосадочную жидкость фильтруют от двуокиси марганца и получают раствор активированного полиэтиленоксида, содержащего карбонильные группы. Выход целевого продукта по массе составляет 92% - 98% от теоретически ожидаемого.

В растворе активированного полиэтиленоксида определяют содержание карбонильных групп по модифицированному методу Сиггиа и Ханна (15) следующим образом: к 1 мл исследуемой пробы раствора активированного полиэтиленоксида прибавляют 1 мл насыщенного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 95% растворе этанола и 0,02 мл концентрированной соляной кислоты. Пробирки с реакционной смесью встряхивают и выдерживают в кипящей водяной бане 5 минут. По окончании времени выдерживания содержимое пробирок охлаждают до комнатной температуры. Затем к реакционной смеси прибавляют по 4 мл 0,1 М водного раствора гидроксида калия и перемешивают. Через 10 минут определяют оптические плотности растворов при длине волны 480 нм. В качестве раствора сравнения используют контрольную пробу, приготовленную одновременно с опытной, в которой вместо раствора активированного полиэтиленоксида используют раствор неактивированного полиэтиленоксида в эквивалентной концентрации. Концентрацию карбонильных групп в мкМ/мл определяют по градуировочному графику, для построения которого используют ацетон.

В таблице 1 представлена зависимость концентрации карбонильных групп в активированном заявляемым способом полиэтиленоксиде 1500 от количества раствора перманганата калия. Как видно из представленных результатов, при использовании 2% раствора перманганата калия в количестве менее 1,6% от объема раствора полиэтиленоксида, концентрация карбонильных групп в полимере существенно снижается, а при использовании в количестве более 20% она не увеличивается. Таким образом, оптимальный диапазон 2% раствора перманганата калия для окисления полиэтиленоксида составляет от 1,6 до 20% от объема раствора полиэтиленоксида.

Количество 2% раствора перманганата калия, % от объема 10% водного раствора полиэтиленоксида 1500	Содержание карбонильных групп в активированном полиэтиленоксиде, мкМ/мл
0,8	0,210±0,018
1,6	0,620±0,057
4	0,708±0,086
10	0,735±0,091
15	0,869±0,089
20	0,969±0,103
30	0,931±0,096

В качестве органической кислоты могут быть использованы, например, уксусная, муравьиная кислота, в качестве неорганической кислоты - фосфорная кислота.

При использовании исходного 5-50%-го раствора полиэтиленоксида для

достижения заявленного технического эффекта к нему в указанной последовательности добавляют органическую или неорганическую кислоту в концентрации 5-35% и в количестве 0,5-2,0% от объема раствора полиэтиленоксида; затем 2%-ный раствор перманганата калия в количестве от 1,6% до 20% от объема исходного раствора полиэтиленоксида.

Определяющим существенным отличием заявляемого способа от способа-прототипа является то, что реакцию окисления полиэтиленоксида проводят 2%-ным раствором перманганата калия в количестве от 1,6 до 20% от объема раствора полиэтиленоксида при температуре 80-100°C в присутствии органической или неорганической кислоты, что позволяет существенно упростить и удешевить способ, за счет исключения сложного и дорогостоящего оборудования, а также одновременно повысить качество целевого продукта, так как в растворе активированного заявляемым способом полиэтиленоксида отсутствуют перекисные соединения. Отсутствие перекисных соединений определяли по методу Вагнера (15).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

#### Пример 1.

50% водный раствор полиэтиленоксида с молекулярной массой 0,4 кДа нагревают на кипящей водяной бане до температуры 100°C, прибавляют к нему 35%-ный раствор уксусной кислоты в количестве 0,5% от объема раствора, смесь перемешивают и прибавляют 2%-ный раствор перманганата калия в количестве 1,6% от исходного объема. Реакционную смесь нагревают до выпадения коричневатого осадка двуокиси марганца, надосадочную жидкость сливают, охлаждают до комнатной температуры и фильтруют, например, с помощью фильтровальной бумаги. Выход целевого продукта составляет 92%. Активированный полиэтиленоксид не содержит примесей каких-либо химических ингредиентов, в частности перекиси водорода и органических пероксидов, которые обладали бы цитотоксическим действием или снижали стабильность активированного полимера и его конъюгатов с биологически-активными веществами.

#### Пример 2.

5%-й водный раствор полиэтиленоксида с молекулярной массой 40 кДа нагревают на кипящей водяной бане до температуры 80°C, прибавляют к нему 5%-ный раствор фосфорной кислоты в количестве 2,0% от объема исходного раствора полиэтиленоксида, смесь перемешивают и прибавляют 2%-ный раствор перманганата калия в количестве 4% от объема исходного раствора полиэтиленоксида. Реакционную смесь нагревают до выпадения коричневатого осадка двуокиси марганца, охлаждают до комнатной температуры, фильтруют, например, через бумажный фильтр. Выход целевого продукта составляет 98%. Активированный полиэтиленоксид не содержит примесей каких-либо химических ингредиентов, в частности перекиси водорода и органических пероксидов, которые обладали бы цитотоксическим действием или снижали стабильность активированного полимера и его конъюгатов с биологически-активными веществами.

#### Пример 3.

10%-й водный раствор полиэтиленоксида с молекулярной массой 1,5 кДа нагревают на кипящей водяной бане до температуры 90°C, прибавляют к нему 15%-ный раствор муравьиной кислоты в количестве 1,0% от объема исходного раствора полиэтиленоксида, полученную смесь перемешивают и прибавляют 2%-ный раствор перманганата калия в количестве 10% от объема исходного раствора полиэтиленоксида. Реакционную смесь нагревают до выпадения коричневатого

осадка двуокиси марганца, охлаждают до комнатной температуры, фильтруют, например, через бумажный фильтр. Выход целевого продукта составляет 95%.

Активированный полиэтиленоксид не содержит примесей каких-либо химических ингредиентов, в частности перекиси водорода и органических пероксидов, которые обладали бы цитотоксическим действием или снижали стабильность активированного полимера и его конъюгатов с биологически-активными веществами.

#### Пример 4.

10% водный раствор полиэтиленоксида с молекулярной массой 4,0 кДа нагревают на кипящей водяной бане до температуры 100°C, прибавляют к нему 5%-ный раствор уксусной кислоты в количестве 2% от исходного объема раствора полиэтиленоксида, смесь перемешивают и прибавляют 2%-ный раствор перманганата калия в количестве 20% от исходного объема полиэтиленоксида. Реакционную смесь нагревают до выпадения коричневатого-черного осадка двуокиси марганца, охлаждают до комнатной температуры, фильтруют. Выход целевого продукта составляет 94%. Активированный полиэтиленоксид не содержит примесей каких-либо химических ингредиентов, в частности перекиси водорода и органических пероксидов, которые обладали бы цитотоксическим действием или снижали стабильность активированного полимера и его конъюгатов с биологически-активными веществами.

Использование заявляемого способа получения активированного полиэтиленоксида позволит:

- упростить способ за счет использования доступного, дешевого и нетоксичного химического сырья (перманганаты);
- исключить применение сложного и дорогостоящего оборудования;
- повысить качество целевого продукта за счет исключения возможности образования примесей каких-либо химических ингредиентов, в частности перекиси водорода и органических пероксидов.

## Источники информации

1. Bennet C. L. - Preliminary comparisons of oncologists/hematologists support  
5 for erythropoetin versus G/GM - CSF use: potential impact of direct to consumer  
(DTC) advertising. - Blood. 2000; 96: 847a
2. Delgado C., Francis G. e., Fisher D. - The uses and properties of PEG - linked  
10 proteins. - Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1992; 9(3, 4): 249 - 304
3. Edwards C. K. - PEGylated recombinant human soluble tumor necrosis factor  
15 receptor type I (r - HU - sTNF - RI): novel high affinity TNF receptor designed  
for chronic inflammatory diseases. - Ann. Rheum. Dis. - 1999; 58 (Suppl I): 173  
- 181
- 20 4. Gabizon A., Martin F. - Polyethylene glycol - coated (pegylated) liposomal  
doxorubicin. - Drugs. - 1997; 54 (Suppl 4): 15 - 21
5. Glue P., Fang J., Sabo R et al. - Peg - interferon - alfa2b: pharmacokinetics,  
25 pharmacodynamics, safety and preliminary efficacy data. - Hepatology. - 1999;  
30 (Suppl): 189
6. Hershfield M. S., Buckley R. H., Greenberg M. L et al. - Treatment of adeno-  
30 sine deaminase deficiency with polyethylene glycol - modified adenosine deami-  
nase. - N. Engl. J. Med. - 1987; 316: 589 - 596
7. Jensen - Pippo K. E., Withcomb K. L., DePrince R. B et al. - Enteral bioavail-  
35 ability of human granulocyte colony stimulating factor conjugated with polyeth-  
ylene glycol. - Pharm. Res. - 1996; 13: 2 - 7
8. Knauf M. J., Bell D. P., Hirtzer P et al. - Relationship of effective molecular  
40 size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin - 2 chemically modi-  
fied with water - soluble polymers. - J. Biol. Chem. - 1988; 263: 15064 - 15070
9. Roberts M. J., Harris M - Attachment of degradable poly(ethylene glycol) to  
45 proteins has the potential to increase therapeutic efficacy. - J. Pharmaceut. Sci. -  
1998; 87 (11): 1440 - 1445

50

10. Остерман Л.А. – Хроматография белков и нуклеиновых кислот, М., Наука, 1985, 536 с.
- 5 11. А.С. СССР № 1442548, кл. С 12 № 11/00, опубл. 07.12.88, Бюл. №45.
12. Vereschagin E.I., Khan Do-Hung, Grishin O.V. et al., “Radiation Technology in the Preparation of Polyethylene Oxide Hydrophilic Gels and Immobilization of Proteases for Use in Medical Practice” Arch. Pharm. Res. V. 24., N 3. P. 229-233. (2001).
- 10 13. Патент RU № 2316339 С 1, опубл. 10.02.2008, Бюл. №4.
- 15 14. Пикаев А.К. - Современная радиационная химия. Радиолит газы и жидкостей., М., Наука, 1986, 440 с.
- 15 15. Сиггия С., Ханна Дж.Г. Количественный органический анализ по функциональным группам. - М.: Химия, 1983. - 672с.
- 20

#### Формула изобретения

1. Способ получения активированного полиэтиленоксида, включающий окисление полиэтиленоксида и удаление продуктов прореагировавшего окислителя, отличающийся тем, что реакцию окисления полиэтиленоксида проводят 2%-ным раствором перманганата калия в количестве от 1,6 до 20% от объема раствора полиэтиленоксида при температуре 80-100°С в присутствии органической или неорганической кислоты.

25 30

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве исходного продукта используют полиэтиленоксид с молекулярной массой 0,4-40 кДа в виде 5-50%-ного водного раствора.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве кислот используют органические кислоты, преимущественно уксусную или муравьиную, или неорганические, преимущественно фосфорную кислоту, в концентрации 5-35% и в количестве 0,5-2,0% от исходного объема раствора полиэтиленоксида.

35 40

40

45

50