



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102711837 B

(45)授权公告日 2016.10.19

(21)申请号 201080061613.6

(22)申请日 2010.11.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102711837 A

(43)申请公布日 2012.10.03

(30)优先权数据

61/262,463 2009.11.18 US

61/290,072 2009.12.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.07.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/057292 2010.11.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/063158 EN 2011.05.26

(73)专利权人 尼克塔治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 A·O·宗 S·李 B·V·乔希

B·布雷 S·聂 P·斯本斯

A·科兹罗斯基 S·麦克曼努斯

S·蒂普尼斯 G·拉瓦蒂

D·斯瓦洛

(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 袁志明

(51)Int.Cl.

A61K 47/48(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1852740 A, 2006.10.25, 说明书第4页第4行、例1, 2、权利要求33, 34.

审查员 韩松

权利要求书4页 说明书61页 附图6页

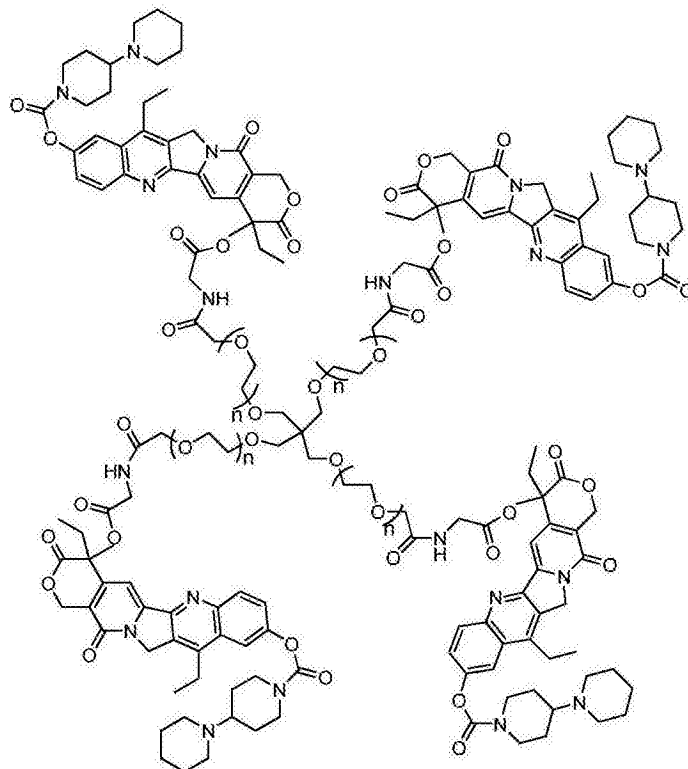
(54)发明名称

盐形式的多-臂聚合物-药物偶联物

(57)摘要

在其他方面中,在此提供了一种多臂水溶性聚乙二醇-药物偶联物的氢卤化物盐,以及制造和使用它的相关方法。该氢卤化物盐稳定地形成,并且与对应的游离碱形式的偶联物相比,似乎更耐受水解降解。

1. 一种氢卤化物盐形式的聚合物-活性剂偶联物,其对应于结构(I):



(I)

其中每一个n是从80至150范围内的一个整数,并且大于95摩尔百分比的伊立替康的碱性氮原子被质子化为氢卤化物HX盐形式,其中X是氯离子。

2. 权利要求1所述的氢卤化物盐形式的聚合物-活性剂偶联物,其中大于96摩尔百分比的伊立替康的碱性氮原子被质子化为氢卤化物盐形式。

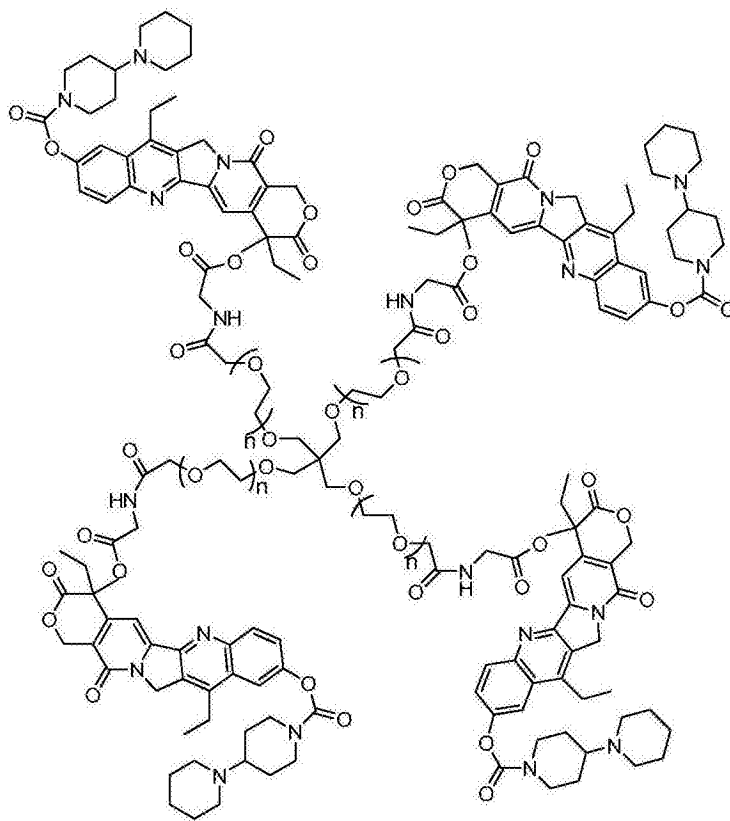
3. 权利要求2所述的氢卤化物盐形式的聚合物-活性剂偶联物,其中大于97摩尔百分比的伊立替康的碱性氮原子被质子化为氢卤化物盐形式。

4. 权利要求3所述的氢卤化物盐形式的聚合物-活性剂偶联物,其中大于98摩尔百分比的伊立替康的碱性氮原子被质子化为氢卤化物盐形式。

5. 权利要求1所述的氢卤化物盐形式的聚合物-活性剂偶联物,其中该偶联物的重均分子量是23,000道尔顿。

6. 权利要求1所述的氢卤化物盐形式的聚合物-活性剂偶联物,其中在每一臂中n具有的平均值为113。

7. 一种用于制备组合物的方法,该组合物包括对应于结构(I)的聚合物-活性剂偶联物的一种氢卤化物盐,



(I)

其中每一个n是从80至150范围内的一个整数，

该方法包括：

(i)用摩尔过量的氢卤酸处理甘氨酸-伊立替康氢卤化物，其中甘氨酸的氨基是处于保护的形式，来由此除去该保护基，以形成脱保护的甘氨酸-伊立替康氢卤化物，

(ii)在一种碱存在下，将来自步骤(i)的该脱保护的甘氨酸-伊立替康氢卤化物与带有N-羟基丁二酰亚胺活性酯的一种聚合物试剂进行偶合，以形成4臂季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐，并且

(iii)通过沉淀回收该4臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐，其中所述聚合物-活性剂偶联物的氢卤化物盐是该聚合物-活性剂偶联物的盐酸盐，并且大于95摩尔百分比的伊立替康的碱性氮原子被质子化为盐酸盐形式。

8. 权利要求7所述的方法，其中所述回收的4臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物具有大于96摩尔百分比的氢卤化物盐形式的伊立替康的碱性氮原子。

9. 权利要求8所述的方法，其中所述回收的4臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物具有大于97摩尔百分比的氢卤化物盐形式的伊立替康的碱性氮原子。

10. 权利要求9所述的方法，其中所述回收的4臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物具有大于98摩尔百分比的氢卤化物盐形式的伊立替康的碱性氮原子。

11. 权利要求7所述的方法，其进一步包括：(iv)分析所述回收的4臂-季戊四醇基-聚乙

二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐的卤化物含量,并且如果该卤化物含量小于95摩尔百分比,那么(v)将所述回收的4臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐溶解在乙酸乙酯中,并且添加额外的氢卤酸。

12. 权利要求11所述的方法,其中所述分析通过离子色谱法进行。

13. 权利要求11或权利要求12所述的方法,其中以一种乙醇溶液的形式添加所述氢卤酸。

14. 权利要求13所述的方法,在步骤(v)中添加额外的氢卤酸后,通过沉淀来回收所述4臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐。

15. 权利要求14所述的方法,其中通过冷却来进行步骤(v)中的沉淀。

16. 权利要求7所述的方法,其中用十倍或更大摩尔过量的氢卤酸处理所述处于保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物,由此除去所述保护基以形成甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

17. 权利要求16所述的方法,用在十倍至25倍范围内的摩尔过量的氢卤酸处理所述保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物,由此除去该保护基以形成甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

18. 权利要求7所述的方法,其中所述受保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物是叔丁氧羰基-甘氨酸-伊立替康盐酸盐,其中甘氨酸的氨基是叔丁氧羰基保护的。

19. 权利要求7所述的方法,其中在步骤(i)中的甘氨酸-伊立替康氢卤化物是受保护形式的甘氨酸-伊立替康盐酸盐,并且用盐酸处理该受保护形式的甘氨酸-伊立替康盐酸盐以除去该保护基。

20. 权利要求19所述的方法,其中用二噁烷中的盐酸溶液处理所述受保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

21. 权利要求7所述的方法,其中步骤(i)进一步包括在步骤(ii)之前分离所述甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

22. 权利要求21所述的方法,其中所述甘氨酸-伊立替康氢卤化物的分离是通过沉淀在步骤(ii)之前进行。

23. 权利要求22所述的方法,其中经由添加甲基叔丁基醚来沉淀所述甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

24. 权利要求7所述的方法,其中步骤(ii)中的碱是一种胺。

25. 权利要求24所述的方法,其中所述胺选自三甲胺、三乙胺以及二甲基氨基-吡啶。

26. 权利要求25所述的方法,其中所述碱是三乙胺。

27. 权利要求7所述的方法,其中在氯化物溶剂中进行步骤(ii)。

28. 权利要求7所述的方法,其中在步骤(iii)中的沉淀包括添加甲基叔丁基醚。

29. 一种药学上可接受的组合物,其包含权利要求1~6中任何一项所述的氢卤化物盐形式的聚合物-活性剂偶联物,以及药学上可接受的赋形剂。

30. 权利要求29所述的药学上可接受的组合物,其包含乳酸盐缓冲剂,处于冻干的形式。

31. 权利要求30所述的药学上可接受的组合物,其包含在一个一次性药瓶中。

32. 权利要求31所述的药学上可接受的组合物,它是无菌的,并且其中包含在所述药瓶中的氢卤化物盐的量等价于100毫克剂量的伊立替康。

33. 权利要求29所述的一种药学上可接受的组合物在制备药物中的用途,其中通过将治疗有效量的所述组合物在一个持续时间内给予被诊断为具有一种或多种癌性实体瘤的受试者,所述药物用于治疗该受试者中的所述癌性实体瘤,所述持续时间将在该受试者中有效地产生对实体瘤生长的抑制。

34. 权利要求33所述的用途,其中所述癌性实体瘤选自下组,该组由以下各项组成:结肠直肠的、卵巢的、宫颈的、乳腺的以及非小细胞肺的癌性实体瘤。

盐形式的多-臂聚合物-药物偶联物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e)要求了以下申请中每一个的优先权:2009年11月18日提交的美国临时专利申请序列号61/262,463,和在2009年12月24日提交的美国临时专利申请序列号61/290,072,这两者通过引用以其全文结合在此。

[0003] 领域

[0004] 本披露总体上涉及盐形式的水溶性聚合物-药物偶联物,它们的药用组合物,以及用于制备、配制、给予并使用这样的混合酸式盐组合物的方法。本披露总体上还涉及用于从预先分离的烷氧基化低聚物制备烷氧基化聚合物材料的烷氧基化方法,并且涉及包括该烷氧基化材料的组合物、使用该烷氧基化聚合物材料的方法、等等。

[0005] 背景

[0006] 多年来,已经提出了用于改进生物活性剂的稳定性和递送的多种方法。与药用试剂的配制以及投递相关联的挑战可以包括:该药用试剂的差的水溶性、毒性、低的生物利用率、不稳定性、以及迅速的体内降解,这仅是列举几例。尽管已经设计了许多办法来改进药用试剂的递送,但是没有一种单独的方法是没有其缺点的。例如,通常采用的药物递送方法的目标在于解决或至少改善一个或多个以下问题,包括如在一种脂质体、聚合物基质、或单分子胶束中的药物胶囊化、共价附接至一种水溶性聚合物如聚乙二醇上、基因靶向剂的使用、盐类的结构、等等。

[0007] 水溶性聚合物的共价附接可以改进活性剂的水溶解度并且改变它的药理学特性。除其他之外,在美国专利号7,744,861描述了某些示例性聚合物偶联物。在另一方法中,具有酸性或碱性官能度的活性剂可以与适合的碱或酸反应并且以盐的形式销售。超过一半的所有活性分子是作为盐类销售(Polymorphism in the Pharmaceutical Industry(制药工业中的多晶型现象),Hilfiker, R., 编辑, Wiley-VCH 出版公司, 2006)。使用盐形式的挑战包括找到最优的盐,并且控制在加工期间的固态行为。生物药剂学盐类可以是无定形的、结晶的,以及作为水合物、溶剂、不同的多晶型物、等而存在。有趣地,很少(如果曾经有过)在药物配制品中使用聚合物偶联物的盐的形式,更不要说是混合酸式盐的形式。

[0008] 与制备水溶性聚合物的活性剂偶联物相关的另一挑战是在相容并且可再现的方法中制备较纯的水溶性聚合物的能力。例如,对于偶合到活性剂(例如小分子和蛋白)上,用反应性官能团活化的聚(乙二醇)(PEG)衍生物是有用的,由此形成PEG和活性剂之间的偶联物。在活性剂被偶联到聚(乙二醇)或“PEG”的聚合物上时,该偶联的活性剂通常被称为已经“PEG化的”。

[0009] 在与未偶联形式的活性剂的安全性和疗效进行比较时,该偶联形式表现出不同的、并且通常是临床有益的特性。PEG化的活性剂的商业成功例如**PEGASYS®**聚乙二醇化干扰素 α -2a(Hoffmann-La Roche(霍夫曼·罗氏集团),新泽西州纳特利市(Nutley), NJ), **PEG-INTRON®**聚乙二醇化干扰素 α -2b(Schering Corporation(先灵公司),新泽西州Kenilworth市),以及**NEULASTA®**PEG-非格司亭(Amgen Inc.(安进公司),加利福尼亚州千橡树市),证明了对其PEG化具有改进活性剂的一种或多种特性的潜能的程度。

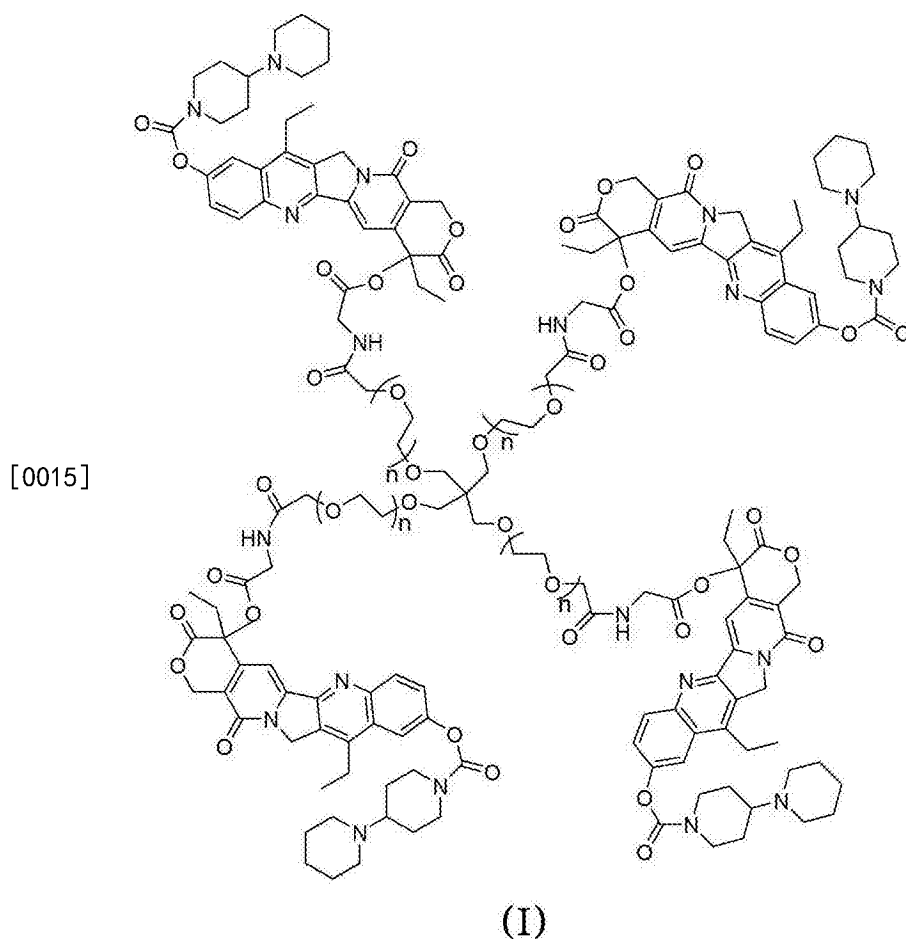
[0010] 在制备偶联物中,典型地使用聚合物试剂来允许用于偶联物合成的较简单的合成方法。通过结合包括聚合物试剂的组合物与包括活性剂的组合物,有可能(在适当反应条件下)来进行较方便的偶联物合成。

[0011] 然而,适合于药物产品法规要求的聚合物试剂的制备通常是挑战性的。常规聚合方法导致较不纯的组合物和/或低产率。虽然在药用领域外这样的杂质和产率可能不是问题,但是在用于人类使用的药物的背景下,安全性和成本代表重要的关注点。因此,常规聚合方法并不适合合成旨在制造药用偶联物的聚合物试剂。

[0012] 在本领域,对于用于以较高产率和纯度制备聚合物试剂,特别是高分子量聚合物的替代方法存在一种需要。在多臂聚合物的情况下,缺乏可用的、希望的水溶性聚合物,该聚合物具有良好控制的和良好限定的特性,同时没有显著量的不希望杂质。因此人们可以容易地获得例如高分子量的多-臂聚(乙二醇),但是从商品化的聚合物制造的药物偶联物会使显著量(即>8%)的聚合物药物偶联物具有非常低的亦或非常高的分子量的生物活性杂质。如果不是不可能,在药物组合物中的该范围的活性杂质会是不可接受的,并且因此使这样的药物的批准具有挑战性。

[0013] 概述

[0014] 在本发明的一个或多个实施方案中,本披露提供了一种对应结构(I)的氢卤化物盐形式的聚合物活性剂偶联物:



[0016] 其中n是范围从约20至约600、或者从约20至500(例如40至约500)的一个整数,并且就包括以上偶联物的组合物而言,包含在该组合物中大于95摩尔百分比(并且在一些实

例中,大于96摩尔百分比、大于97摩尔百分比、并且甚至大于98摩尔百分比)的所有偶联物的伊立替康部分的碱性氮被质子化为氢卤化物(HX)盐的形式,其中X选自氟离子、氯离子、溴离子、和碘离子。

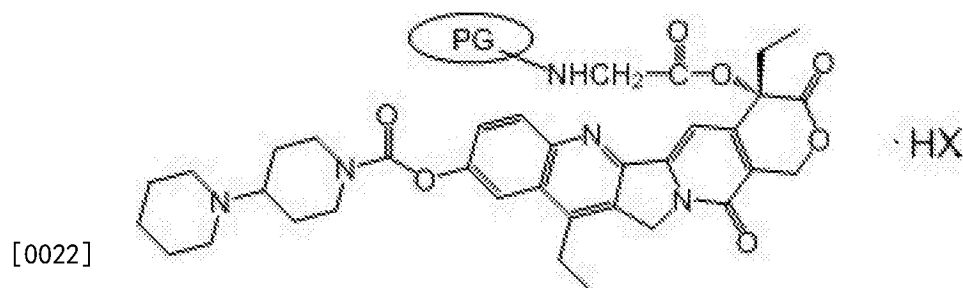
[0017] 在本发明的一个或多个实施方案中,该氢卤化物盐是盐酸盐。

[0018] 在本发明的一个或多个实施方案中,重复的单体的n是范围从约80至约150的一个整数。

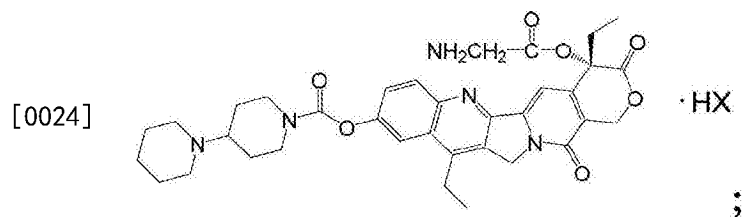
[0019] 在本发明的一个或多个实施方案中,(OCH₂CH₂)_n的任何的n是约113。

[0020] 在本发明的一个或多个实施方案中,该氢卤化物盐是盐酸盐,并且该偶联物的重均分子量是约23,000道尔顿。

[0021] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种用于制备水溶性聚合物活性剂偶联物的氢卤化物盐[例如具有结构(I)的偶联物的水溶性聚合物活性剂]的方法,该方法包括以下步骤:(i)用摩尔过量的氢卤酸对一种受保护形式(II)的甘氨酸-伊立替康氢卤化物进行处理,



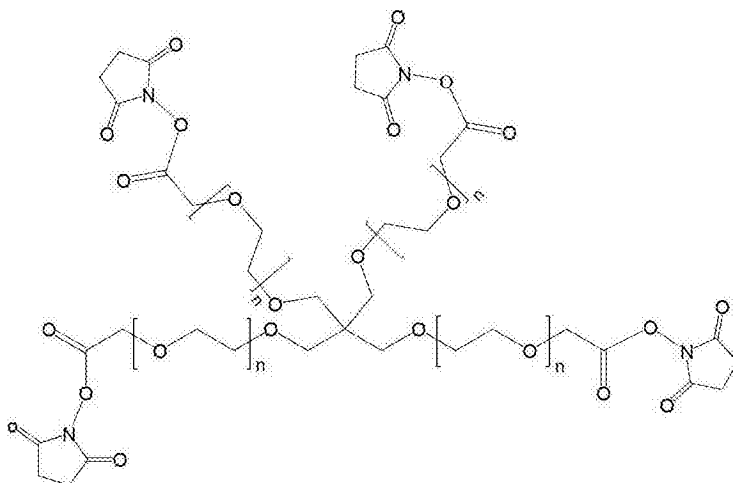
[0023] 由此除去该保护基,以形成甘氨酸-伊立替康氢卤化物,



[0025]

[0026] (ii)在一种碱存在下,将来自步骤(i)的脱保护的甘氨酸-伊立替康氢卤化物与4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-琥珀酰亚胺偶合,

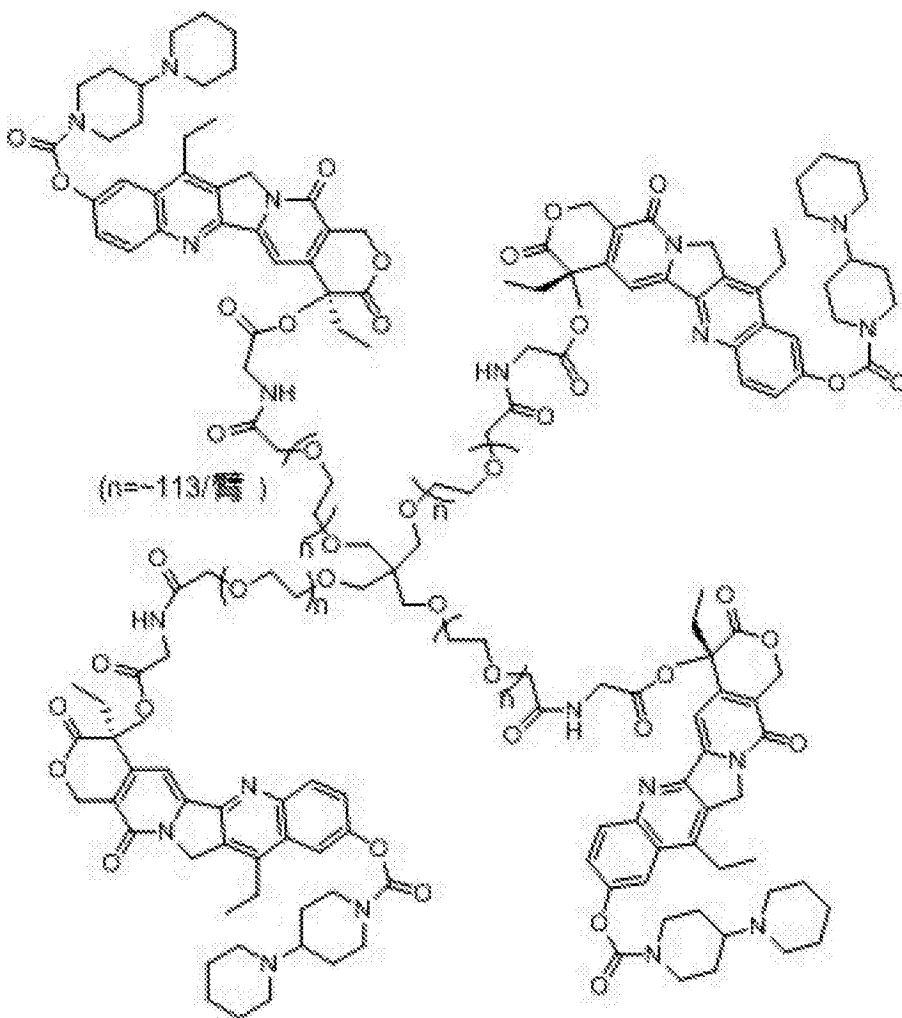
[0027]

[0028] 其中每一个 $n=40$ 至 500

[0029] (IV)

[0030] 以形成4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐(也称为季戊四醇基-4-臂-(PEG-1-亚甲基-2-氧代-乙烯基氨基乙酸酯连接的-伊立替康氢卤化物盐)),

[0031]



; 以及

(I)

[0032] (iii)通过沉淀回收该4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐。关于该方法,用于进行该方法的聚合物试剂并不受具体限制,并且带有一个活化的酯的其他聚合物试剂可以代替该4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-琥珀酰亚胺。

[0033] 在本发明的一个或多个实施方案中,一种回收的4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物被包含在一种组合物内,其中包含在该组合物中的大于95摩尔百分比(并且在一些实例中大于96摩尔百分比、大于97摩尔百分比、以及甚至大于98摩尔百分比)的所有偶联物的伊立替康部分的碱性氮被质子化为氢卤化物(HX)盐形式,其中X选自氟离子、氯离子、溴离子、和碘离子。

[0034] 在本发明的一个或多个实施方案中,用十倍或更大摩尔过量的氢卤酸处理该保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物,用来由此除去该保护基以形成甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

[0035] 在本发明的一个或多个实施方案中,用在十倍至25倍范围内的摩尔过量的氢卤酸处理该保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物,用来由此除去保护基以形成甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

[0036] 在本发明的一个或多个实施方案中,该保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物是叔丁氧羰基(Boc)-甘氨酸-依立替康盐酸盐,其中甘氨酸的氨基是Boc-保护的。

[0037] 在本发明的一个或多个实施方案中,在步骤(i)中的甘氨酸-伊立替康氢卤化物是保护形式的甘氨酸-依立替康盐酸盐,并且用盐酸处理该保护形式的甘氨酸-依立替康盐酸盐以除去该保护基。

[0038] 在本发明的一个或多个实施方案中,用二噁烷中的盐酸溶液处理该保护形式的甘氨酸-依立替康盐酸盐。

[0039] 在本发明的一个或多个实施方案中,一种用于制备水溶性聚合物-活性剂偶联物的氢卤化物盐的方法进一步包括在与聚合物试剂的偶合步骤以前,分离该甘氨酸-伊立替康氢卤化物(例如通过沉淀,通过添加甲基叔丁基醚,“MTBE”)。

[0040] 在本发明的一个或多个实施方案中,在偶合步骤中使用的碱是一种胺(例如三甲胺、三乙胺、和二甲氨基-吡啶)。

[0041] 在本发明的一个或多个实施方案中,在一种氯化物溶剂中进行该偶合步骤。

[0042] 在本发明的一个或多个实施方案中,回收该4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐的步骤包括添加甲基叔丁基醚。

[0043] 在本发明的一个或多个实施方案中,用于制备一种水溶性聚合物-活性剂偶联物的氢卤化物盐的方法包括以下步骤:(iv)分析(例如通过离子色谱)该回收的4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐的卤化物含量,并且如果卤化物含量小于95摩尔百分比,则(v)将该回收的4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐溶解在乙酸乙酯中,并且添加额外的氢卤酸用来由此形成具有大于95摩尔百分比的卤化物含量的4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐。

[0044] 在本发明的一个或多个实施方案中,以乙醇溶液的形式添加氢卤酸。

[0045] 在本发明的一个或多个实施方案中,在其中进行添加额外的氢卤酸的步骤的一种方法中,该方法进一步包括通过沉淀(这可以被例如冷却进行)回收该4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物。

[0046] 在本发明的一个或多个实施方案中,通过进行在此描述的方法,来提供4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康的氢卤化物盐。

[0047] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种药学上可接受的组合物,该组合物包括对应结构(I)的化合物(4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康)的一种氢卤化物盐(例如盐酸盐),以及一种药学上可接受的赋形剂。

[0048] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种组合物,该组合物包括根据在此描述的任何一個或多个实施方案所述的一种盐酸盐,以及(ii)乳酸盐缓冲剂,处于冻干的形式。在本发明的一个或多个实施方案中,该药学上可接受的组合物是无菌组合物。在本发明的一个或多个实施方案中,在容器(例如药瓶)中任选地提供该药学上可接受的组合物,任选地含有100mg剂量的伊立替康的等效物。

[0049] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种方法,该方法将在此描述的含偶联物组合物给予患有有一个或多个类型的癌性实体瘤的个体,其中将该含偶联物组合物任选地溶解在5%w/w葡萄糖的溶液中。在本发明的一个或多个实施方案中,由静脉输注实现给药。

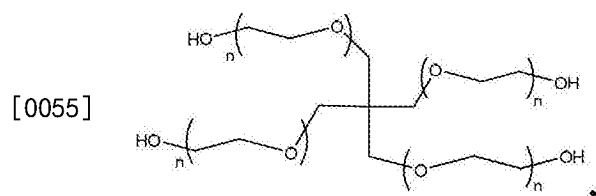
[0050] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了治疗患有癌症的哺乳动物的一种方法,该方法包括给予一个治疗有效量的4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康的氢卤化物(例如盐酸盐)。在受试者中,给予哺乳动物的氢卤化物盐有效地产生了实体瘤生长的减缓或抑制。在本发明的一个或多个实施方案中,该癌性实体瘤类型选自下组,该组由以下各项组成:结肠直肠的、卵巢的、宫颈的、乳房的和非小细胞肺的实体瘤。

[0051] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐,其中该盐是用于制造用于治疗癌症的药剂的一种抗癌剂。

[0052] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种组合物,该组合物包括通过一个方法制备的烷氧基化聚合物产品,该方法包括在适合的溶剂中,将一种预先分离的可烷氧基化低聚物烷氧基化以形成一种烷氧基化聚合物产物的步骤,其中该预先分离的可烷氧基化低聚物具有已知并且限定的大于300道尔顿(例如大于500道尔顿)的重均分子量。

[0053] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种组合物,该组合物包括一种烷氧基化聚合物产物,该产物具有大于92wt%的纯度并且高分子量产物和二醇的总的合并的含量是小于8wt%(例如小于2wt%),如通过例如凝胶过滤色谱法(GFC)分析确定的。

[0054] 在本发明的一个或多个实施方案中,该烷氧基化聚合物产物具有以下结构:



[0056] 其中每一个n都是从20至1000(例如从50至1000)的整数。

[0057] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种方法,该方法包括以下步骤:(i)在适合的溶剂中,将一种预先分离的可烷氧基化低聚物烷氧基化以形成一种烷氧基化聚合物材料,其中该预先分离的可烷氧基化低聚物具有已知并且限定的大于300道尔顿(例如大于500道尔顿)的重均分子量,并且(ii)任选地,进一步活化该烷氧基化聚合物产物以提供

一种活化的烷氧基化聚合物产物,(在其他事物中),该产物作为用于制备聚合物药物偶联物的聚合物试剂是有用的。

[0058] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种方法,该方法包括将得自和/或包含在一种组合物内的烷氧基化聚合物产物进行活化的步骤,该组合物包括具有大于90%的纯度的烷氧基化聚合物产物,由此形成一种活化的烷氧基化聚合物产物,该产物(在其他事物中)作为用于制备聚合物药物偶联物的聚合物试剂是有用的。

[0059] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种方法,该方法包括将一种活化的烷氧基化聚合物产物偶联至一种活性剂上,其中通过一种方法制备该活化的烷氧基化聚合物产物,该方法包括将得自和/或包含在一种组合物内的烷氧基化聚合物产物进行活化由此形成活化的烷氧基化聚合物产物的步骤,该组合物包括具有大于90%的纯度的烷氧基化聚合物产物。

[0060] 在本发明的一个或多个实施方案中,提供了水溶性聚合物活性剂偶联物的混盐,该偶联物已经通过(在偶联条件下)在碱存在下将带有胺的活性剂(例如脱保护的甘氨酸-伊立替康))偶合至一种聚合物试剂(例如4-臂季戊四醇基-聚(乙二醇)-羧甲基琥珀酰亚胺)上以形成一种偶联物来制备,其中该偶联物是以混盐偶联物(例如该偶联物具有氮原子,其中每一个将被质子化亦或未被质子化,其中任何给定的质子化的氨基都是具有两种不同的阴离子之一的酸式盐)的形式存在,并且进一步,其中任选地,该聚合物试剂从如在此所述制备的烷氧基化产物制备。

[0061] 本发明的方法、组合物以及类似物的另外的实施方案从以下的说明、附图、实例以及权利要求中将是清楚的。正如从前述以及以下说明可以认识到在此描述的各自和每一特征、以及二种或多种此类特征的各自和每一组合被包括在本披露的范围之内,前提是包括在这样一种组合中的特征不是互不一致的。此外,可以特别地从本发明的任何实施方案中排除任何的特征或特征组合。在以下的说明以及权利要求中列出了本发明的另外的方面以及优点,特别是在结合所附实例以及图进行考虑时。

[0062] 附图简要说明

[0063] 图1这样一幅图,展示了对“4-臂-PEG-Gly-Irino-20K”(对应于4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康)的三个不同样品的加速应力稳定性研究的结果,每一个相对于三氟乙酸(TFA)和盐酸化物盐类、连同游离碱的相对含量具有不同构成。测试的样品包括>99%的HCl盐(<1%的游离碱,三角)、94%的全盐(6%的游离碱,方块)、和52%的全盐(48%的游离碱,圆圈)。在25°C和60%相对湿度下储存样品,曲线图说明化合物随时间的降解,如在实例3中详细说明的那样。

[0064] 图2是这样一幅图,展示了在40°C和75%相对湿度下储存的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的样品中,游离伊立替康随时间的增加,每一个相对于三氟乙酸和盐酸化物盐类、连同游离碱的相对含量具有不同构成。如在实例3中描述的那样,测试样品对应于含有>99%的HCl盐(<1%的游离碱,方块)的产物和含有86%的全盐(14%的游离碱,菱形)的产物。

[0065] 图3是这样一幅图,展示了在40°C和75%相对湿度下储存的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的样品中,小PEG种类(PEG降解产品)随时间的增加,如在实例3中详细说明的那样。测试样品对应于含有>99%的HCl盐(<1%的游离碱,方块)的产物和含有86%的全盐(14%的游离碱,菱形)的产物。

[0066] 图4是色谱图的叠加的编绘,展示了经由从单-(DS-1)、二-(DS-2)、三-(DS-3)和四伊立替康取代的(DS-4)4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的水解,伊立替康的释放,如在实例5中详细说明的那样。

[0067] 图5是这样一幅图,展示了与如在实例5中说明的水解动力学建模数据相比,在pH 8.4,在猪羧肽酶B存在下,如以上所述的不同种类的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K在水性缓冲液中的水解结果。对于动力学模型,所有种类的水解都被假定为1级动力学。DS4的消失的1级反应速率常数(0.36hr^{-1})被用于产生所有曲线。

[0068] 图6是这样一幅图,展示了与水解动力学建模数据相比,在人血浆中,如以上说明的不同种类的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的水解。在实例5中提供了细节内容内容。对于动力学模型,所有种类的水解都被假定为1级动力学。DS 4的消失的1级反应速率常数(0.26hr^{-1})被用于产生所有曲线。

[0069] 图7是按照如在实例7中说明而制备的材料的凝胶过滤色谱法的色谱图。

[0070] 图8是按照如在实例8中说明而制备的材料的凝胶过滤色谱法的色谱图。

[0071] 详细说明

[0072] 现在将在下文中更全面地描述本发明的不同方面。然而,这些方面可以按许多不同的形式实施并且不得解释为限制于在此列出的实施方案;而是提供这些实施方案使得本披露内容是充分且完全的,并且完全将本发明的范围传达给本领域的普通技术人员。

[0073] 在此引证的所有出版物、专利以及专利申请,不论在前或在后,特此通过引用以其全文进行结合。在本说明书的传授内容与通过引用而结合的技术不一致的情况下,本说明书中的传授内容应优先。

[0074] 必须指出的是,如在本说明书中使用的,单数形式“一个/种(a/an)”以及“该”包括复数个指示物,除非文中另外清晰地指明。因此,例如提及一种“聚合物”,包括一种单一的聚合物连同两种或更多种相同或不同的聚合物,提及一种“偶联物”,是指一种单一的偶联物连同两种或更多种相同或不同的偶联物,提及一种“赋形剂”,包括一种单一的赋形剂连同两种或更多种相同或不同的赋形剂,以及类似物的使用。

[0075] 在对本发明进行描述并且提出权利要求时,以下术语将根据以下描述的定义而使用。

[0076] 一种“官能团”是一种基团,该基团可以在有机合成的正常条件下使用,来在它附接其上的实体与另一个实体之间形成一个共价连接,该另一个实体典型地带有另一个官能团。该官能团一般包括一个或多个多重键和/或一个或多个杂原子。在此描述了优选的官能团。

[0077] 术语“反应性的”是指一种官能团在有机合成的正常条件下容易地或以一个实际速率进行反应。这与不反应的或需要强催化剂或不实用的反应条件而进行反应的那些基团(即,“不反应的”或“惰性的”基团)相反。

[0078] “保护基”是防止或阻断分子中的一个特定化学反应性官能团在某些反应条件下的反应的一个部分。该保护基将取决于受保护的化学反应基团的类型连同有待使用的反应条件以及在分子中另外的反应性或保护性基团的存在而改变。作为举例,可能受保护的官能团包括:羧酸基团、氨基、羟基、硫醇基团、羰基基团以及类似物。针对羧酸的代表性保护基包括酯类(例如一种对甲氧基苄基酯)、酰胺类以及酰肼类;对于氨基是氨基甲酸酯(例如

叔丁氧基羰基)以及酰胺;对于羟基是醚类以及酯类;对于硫醇基团是硫醚类以及硫酯类;对于羰基基团是缩醛类以及缩酮类;以及类似物。此类保护基是本领域技术人员熟知的并且在例如T.W.Greene(格林尼)和G.M.Wuts(伍兹),Protecting Groups in organic Synthesis(有机合成中的保护基),第三版,Wiley(威立),纽约,1999以及P.J.Kocienski(科辛斯基),Protecting Groups(保护基),第三版,Thieme Chemistry出版社,2003以及在此引用的参考文献中进行了描述。

[0079] 处于“保护形式”的官能团是指带有一个保护基的官能团。如在此使用的,术语“官能团”或者它的任何同义词是意在涵盖它的受保护的形式。

[0080] 如在此使用的“PEG”或“聚(乙二醇)”,意思是涵盖任何水溶性聚(氧化乙烯)。典型地,用于本发明中的PEG将包括二个以下结构的一种:“(CH₂CH₂O)_n-”或“(CH₂CH₂O)_n-1CH₂CH₂-”,取决于一个或多个末端氧是否已经例如在一个合成转化期间被置换。变量(n)范围是从3至约3000,并且这些末端基团以及总体PEG的结构可以改变。

[0081] 一种水溶性聚合物,可以带有一个或多个“末端封端基团”,(在这种情况下,可以将该水溶性聚合物称为“末端封端的”。关于末端封端基团,示例性末端封端基团一般是含碳或含氢基团,典型地包括1-20个碳原子和一个共价地键合到该基团的氧原子。就这一点,该基团典型地是烷氧基(例如甲氧基、乙氧基和苄氧基),并且关于这种含碳基团,该基团可以可任选地是饱和的或不饱和的、连同芳基、杂芳基、环、杂环、以及以上任何一项的取代形式。

[0082] 该封端基团还可以包括一个可检出的标记物。当该聚合物具有包括一个可检出标记物的封端基团时,该聚合物所附接的聚合物和/或部分(例如活性剂)的量或位置可以使用合适的检测器来确定。此类标记物包括但不限于荧光增光剂、化学发光剂、在酶标记中使用的部分、比色标记物(例如染料)、金属离子、放射性部分、以及类似物。

[0083] 在本发明的聚合物的上下文中,“水溶性”或“水溶性聚合物片段”是指在室温下,至少35%(按重量计)、优选大于70%(按重量计)、并且更优选大于95%(按重量计)溶于水的任何片段或聚合物。典型地,一种水溶性聚合物或片段将由该过滤之后的同一溶液传输至少约75%更优选至少约95%的光。

[0084] 术语“活化的”在与一个具体的官能团结合使用时,是指一个反应性的官能团,该官能团容易与在另一个分子上的一个亲电体或一个亲核体进行反应。这与那些要求强碱或高度地不切实际的反应条件来进行反应的基团(即,一个“非反应性的”或“惰性的”基团)形成了对比。

[0085] “亲电体”是指一种离子或原子或者多个原子的中性的或离子的集合,它具有一个亲电中心,即寻找电子或能够与一个亲核体进行反应的中心。

[0086] “亲核体”是指一种离子或原子或者多个原子的中性的或离子的集合,它具有一个亲核中心,即寻找亲电中心或能够与一个亲电体进行反应的中心。

[0087] 术语“受保护的”或“保护基”或“保护性基团”是指存在着一个部分(即,这种保护基),该部分防止或阻止在一个分子中的一个特定的化学反应官能团在某些反应条件下的反应。这种保护基将取决于以下各项而变化:受到保护的化学反应基团的类型、连同所采用的反应条件、以及在该分子中额外的反应基团或保护基的存在(若存在的话)。在Greene(格林尼),T.W.等人的PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS(有机合成中的保护性基

团),第三版,John Wiley & Son(约翰威立父子出版公司),纽约,NY(1999)中可以发现本领域已知的保护基。

[0088] 在一种水溶性聚合物(例如PEG)的上下文中,“分子量”是指一种聚合物的重均分子量,该分子量典型地是通过在有机溶剂(像1,2,4-三氯苯)中的尺寸排阻色谱法、光散射技术或特性粘度测定来确定。

[0089] 在此使用的术语“间隔基”或者“间隔基部分”是指可任选地用于连接多个互连部分(例如一系列的单体的一个末端以及一个亲电体)的一个原子或多个原子的一个集合。本发明的间隔基部分可以是水解稳定的或者可能包括一个可生理学水解的或可酶促降解的连接物。

[0090] “可水解的”键是在生理学条件下与水进行反应(即,被水解)的一种相对不稳定的键。一种键在水中水解的趋势将不仅取决于连接两个中心原子的连接的总体类型,而且还取决于附接在这些中心原子上的取代基。说明性水解不稳定的连接包括羧酸酯、磷酸酯、酸酐类、缩醛类、缩酮类、酰氧基烷基醚、亚胺类、原酸酯类、肽类以及寡核苷酸类。

[0091] “酶可降解的连接”表示受到一种或多种酶降解的一种连接。

[0092] 一个“水解稳定的”连接或键是指在水中基本上稳定的一个化学键,也就是说,经一个延长的时间段在生理学条件下不会经历任何可观程度的水解。水解稳定的连接的实例包括但不限于以下各项:碳-碳键(例如在一个脂肪链中)、醚类、酰胺类、氨基甲酸酯类等。总体上,水解稳定的连接是在生理条件下显示出小于约1%至2%每天的水解速率的一种连接。代表性的化学键的水解速率可以在大多数标准的化学教科书中找到。

[0093] 关于一种聚合物的几何形状或总体结构,“多臂的”是指聚合物具有3个或更多个连接到一个“核心”分子或结构上的含聚合物的“臂”。因此,一种多臂聚合物可以具有3个聚合物臂、4个聚合物臂、5个聚合物臂、6个聚合物臂、7个聚合物臂、8个聚合物臂或更多,取决于它的构型和核心结构。一个具体类型的多臂聚合物是称为树枝状聚合物或超支化聚合物的一种高度分支的聚合物,它具有至少3个分支的一个引发剂核心,为2或更大的一个内部分支多样性,为2或更大的世代,以及在单个树枝状化合物分子内的至少25个表面基团。为了这里的目的,树枝状化合物被认为具有不同于多臂聚合物的结构的一种结构。这就是说,一种如在此提及的多臂聚合物明确地排除了树枝状化合物。此外,如在此提供的一种多臂聚合物具有一个非交联的核心。

[0094] 一种“树枝状化合物”或“超支化聚合物”是一种球形的、尺寸单分散的聚合物,其中所有的键从一个中心焦点或核心放射状地形成,具有规则的分枝图案并且具有多个重复单元(各自贡献了一个分枝点)。树枝状化合物是典型地(虽然并不是必需地)使用一种纳米级多步骤构造过程而形成。每个步骤产生了一个新的“世代”,该世代具有前一个世代两倍的或更多倍的复杂性。树枝状化合物展现出某些树枝状状态特性如核心封装,使它们独特于其他类型的聚合物。

[0095] “分枝点”是指包括一个或多个原子的一个分叉点,在这个点处一种聚合物从一种直链结构分裂或分枝成一个或多个另外的聚合物臂。一种多臂聚合物可以具有一个分枝点或多个分枝点,只要这些分枝不是生成一种树枝状化合物的规则的重复。

[0096] “实质性地”或“基本地”意思是几乎全部地或完全地,例如某一给定量的95%或更大。

[0097] “烷基”是指在长度上具有范围从约1至20个原子的烃链。这些烃链优选但不必需是饱和的并且可以是支链或直链。示例性的烷基基团包括甲基、乙基、异丙基、正丁基、正戊基、2-甲基-1-丁基、3-戊基、3-甲基-3-戊基,以及类似物。

[0098] “低级烷基”是指含有从1至6个碳原子的烷基基团,并且可以是直链或支链的,如例证如下:甲基、乙基、正丁基、异丁基以及叔丁基。

[0099] “环烷基”是指饱和的环状烃链,包括桥联的、稠合的、或者螺环的化合物,优选地由3至大约12个碳原子、更优选地3至约8个构成。

[0100] “非干扰取代基”是当在分子中存在时与其他包含在该分子中的官能团典型地是不起反应的那些基团。

[0101] 术语“取代的”,如在例如“取代的烷基”中,是指用一个或多个非干扰性取代基所取代的一个部分(例如,一个烷基基团),这些取代基是例如但不限于: C_3 - C_8 环烷基,如环丙基、环丁基等等;卤代,例如氟代、氯代、溴代、以及碘代;氰基;烷氧基、低级苯基;取代的苯基;以及类似物。对于在一个苯环上的取代,这些取代基可以是在任何方位(即邻位、间位或对位)上。

[0102] “烷氧基”是指一种-O-R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),优选是 C_1 - C_7 烷基。

[0103] 如在此所使用的,“链烯基”是指包含至少一个双键的、具有1至15个原子长度的一种支链的和无支链的烃基团,例如亚乙基(乙烯基)、2-丙烯-1-基(烯丙基)、异丙烯基、3-丁烯-1-基,以及类似物。

[0104] 如在此所使用的术语“炔基”是指包含至少一个三键的、具有从2至15个原子长度的一种支链的和无支链的烃基团,例如乙炔基、1-丙炔基、3-丁炔-1-基、1-辛炔-1-基,等等。

[0105] 术语“芳基”表示具有高达14个碳原子的芳香族基团。芳基包括苯基、萘基、联苯基、菲基、并四苯基以及类似物。

[0106] “取代的苯基”以及“取代的芳基”对应地表示用一个、两个、三个、四个或五个((例如,1-2,1-3,1-4,或1-5取代基)所取代的一个苯基以及芳基,这些取代基是选自卤素(F、Cl、Br、I)、羟基、氰基、硝基、烷基(例如 C_1 - C_6 烷基)、烷氧基(例如 C_1 - C_6 烷氧基)、苄氧基、羧基、芳基等等。

[0107] 无机酸是没有碳原子的酸。实例包括氢卤酸、硝酸、硫酸、磷酸以及类似物。

[0108] “氢卤酸”是指卤化氢,例如氢氟酸(HF)、盐酸(HCl)、氢溴酸(HBr)、和氢碘酸(HI)。

[0109] “有机酸”是指具有一个或多个羧基($-COOH$)的任何有机化合物(即具有至少一个碳原子)。一些具体的实例包括甲酸、乳酸、苯甲酸、乙酸、三氟乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、混合的氯氟乙酸、柠檬酸、草酸、以及类似物。

[0110] 如在此使用的“活性剂”包括任何提供一些药理学的通常有益的效果(可以在体内或体外证实)的试剂、药物、化合物、以及类似物。如在此的使用,这些术语进一步包括在一位患者体内产生一种局部或全身效应的任何生理学或药理学活性物质。如在此使用,尤其是关于在此描述的合成方法,“活性剂”是指涵盖它的衍生的或连接物改性的形式,这样在体内给予时,释放母体“生物活性的”分子。

[0111] “药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指可以被包括在一种组合

物(该组合物包括一种活性剂)中并且对该患者不引起显著的有害的毒理学效应的一种赋形剂。

[0112] “药理学有效量”、“生理学有效量”、以及“治疗有效量”在此可互换地使用,表示存在于一种药物制剂中的活性剂的量被需要以便在血流中或在体内的一种靶组织或位点中提供活性剂和/或偶联物的一个所希望的水平。该精确的量将取决于很多因素,例如该具体的活性剂、药物制剂的组分和物理特征、预期的患者群体、以及患者的考虑因素,并且可以容易地由本领域的普通技术人员基于在此提供的以及在相关文献中可获得的信息来确定。

[0113] 在聚合物的上下文中,“多官能的”是指具有3个或更多个官能团的一种聚合物,其中这些官能团可以是相同或不同的,并且典型地在该聚合物末端存在。多官能聚合物将典型地包含从大约3-100个官能团、或从3-50个官能团、或从3-25个官能团、或从3-15个官能团、或从3至10个官能团,即包含3、4、5、6、7、8、9或10个官能团。

[0114] “二官能的”和“双官能的”在此互换地使用,并且是指一种有(典型地是在聚合物的末端)两个官能团包含在其中的实体,如一种聚合物。当这些官能团相同时,称该实体是同二官能的或同双官能的。当这些官能团不同时,称该实体是杂二官能的或杂双官能的。

[0115] 在此描述的一种碱性的或酸性的反应物包括中性、带电的、以及它们的任何对应的盐形式。

[0116] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在此互换地使用并且是指一种脊椎动物,优选是一种哺乳动物。哺乳动物包括但不限于鼠科动物、啮齿动物、类人猿、人类、家畜、运动动物以及宠物。这样的受试者典型地患有或倾向于一种病情,通过给予如在此说明的水溶性聚合物活性剂偶联物可以防止或治疗这一病情。

[0117] 术语“约”(特别是关于一个给定的量)意在涵盖加上或减去百分之五的偏差。

[0118] 一种具体病症的“治疗”(treatment和treating)包括:(1)预防这样的一种病症,即,在一位可能暴露于或易罹患于该病症但是还没有经历或显示该病症的受试者体内引起该病症不发展或以更小的强度或更小的程度发生,以及(2)抑制该病症,即,停止该发展或逆转该病症。

[0119] “可任选的”或“可任选地”表示随后描述的情形可以但是并非必然发生,这样该说明包括其中该情形发生的情况以及该情形不发生的情况。

[0120] 一种“小分子”是一种有机的、无机的或有机金属的化合物,该化合物典型地具有小于约1000、优选小于约800道尔顿的分子量。如在此提到的小分子涵盖低聚肽以及其他具有小于约1000的分子量的生物分子。

[0121] “肽”是由从约13至50个左右的氨基酸组成的一个分子。寡肽典型地含有从约2至12个氨基酸。

[0122] 除非明确地陈述相反,如在此使用,术语“部分的混盐”和“混盐”可互换地使用,并且在聚合物偶联物(以及包括多个这样的聚合物偶联物的对应组合物)的情况下是指包括一个或多个碱性氨基的(或其他碱性含氮的)基团的偶联物和组合物,其中(i)在该偶联物或偶联物组合物中的任何给定的碱性氨基之一是非质子化的亦或质子化的,并且(ii)关于任何给定的质子化碱性氨基,该质子化的碱性氨基将具有两个不同的抗衡离子之一。(术语“部分的混盐”是指其中并不是化合物或组合物中的所有氨基都被质子化的特征-因此该组合物是一种“部分的”盐,同时“混合的”是指多个抗衡离子的特征)。如在此提供的混盐涵盖

了水合物、溶剂化物、非晶相形式、晶态形式、多晶型物、异构体、和类似物。

[0123] 以“游离碱”形式存在的胺(或其他碱性的氮)基团是这样一种物质,其中该胺基(即伯、仲、或叔胺)具有一个自由电子对。该胺是中性的,即不带电的。

[0124] 以“质子化的形式”存在的胺基存在为质子化的胺,这样该氨基是带正电的。如在此使用,质子化的胺基还可以是处于自胺与酸(例如无机酸或有机酸)的反应生成的酸加成盐的形式。

[0125] 活性剂的氨基的“摩尔百分比”是指包含在一个具体形式的或另一形式的聚合物偶联物中的活性剂分子中的氨基的百分数或分数,其中在该偶联物中的氨基的总摩尔百分比为100%。

[0126] 如在此使用,“psi”是指磅/平方英寸。

[0127] 概述-氢卤化物盐类、烷氧基化方法,以及从该烷氧基化方法所制备聚合物产物制备的的聚合物试剂而制备的偶联物的组合物(以及它们的氢卤化物盐形式)

[0128] 氢卤化物盐类:如以上指出的那样,在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种水溶性聚合物和活性剂的偶联物,其中该偶联物是处于氢卤化物盐的形式(例如4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康的氢卤化物盐)。这样的偶联物表现出新颖的固态形式。提供了一种可重复地制备含伊立替康偶联物的组合物的方法,已经发现并在此提供了其中(对于组合物中的所有伊立替康偶联物)大于95摩尔百分比的所有伊立替康的碱性氮原子被质子化为氢卤化物(HX)盐形式。已经进一步发现,例如在与该偶联物的游离碱形式进行比较时,该氢卤化物盐展示出对水解降解的增强的稳定性。参见例如实例3。

[0129] 通过背景,在4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康的制备过程中,如在实例1中详细描述,发现虽然用碱处理,但是产物总体上形成为具有伊立替康的碱性氮原子(例如氨基)的一种混盐,处于质子化的亦或非质子化的形式,其中任何给出的质子化的氨基是具有两种不同的阴离子(例如三氟乙酸根或氯离子)之一的一种酸式盐。在为了进一步探究所生成的组合物的尝试中,设计了一种用于制备基本上纯的氢卤化物盐的方法。如以上总体所述,在此描述的氢卤化物盐具有某些显著的并且有利的特性。除其他特征之外,在此说明了4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐的结构特征、特性、制造和使用方法、以及额外的特征。

[0130] 简言之,一种水溶性聚合物-活性剂偶联物的氢卤化物盐,例如盐酸盐,典型地包括以下这些:总体而言,该化合物是多臂聚(乙二醇)聚合物和伊立替康的一种偶联物。伊立替康,如从它的结构明显的是具有一个或多个碱性胺基(或其他碱性氮原子),即,在偶联到多臂聚合物核心上以后,具有从约7.5至约11.5的pK值(即在偶联到该水溶性聚合物上以后,该活性剂具有一个或多个碱性胺或其他含氮基团)。生成的偶联物是一种氢卤化物盐,即其中该碱性氮原子被质子化为一种氢卤化物盐(HX,其中X选自氟离子、氯离子、溴离子和碘离子)。

[0131] 如在此使用的,具有大于95摩尔百分比的被质子化为氢卤化物的伊立替康的碱性氮原子的一种氢卤化物盐是指“本体产物”,而不必需指包含在该本体产物内的单独分子种类。因此,包含在该盐内的单独分子种类,由于在该偶联物结构内的聚合物臂的数目,可以含有少量的如以上所述的游离碱形式连同质子化形式的胺基。此外,4-臂PEG-羧甲基偶联物核心一般可以低于被共价地附接的伊立替康全取代,以下将更详细地描述该特征。

[0132] 烷氧基化方法:还如以上指出的那样,在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种方法,该方法包括在适合的溶剂中,将一种预先分离的可烷氧基化低聚物烷氧基化来形成一种烷氧基化聚合物产物的步骤,其中该预先分离的可烷氧基化低聚物具有已知并且限定的大于300道尔顿(例如大于500道尔顿)的重均分子量。在其他优点中,在此提供的这些烷氧基化方法导致了超过(例如在一致性和纯度方面)通过以前已知的方法制备的聚合物产物的聚合物产物。

[0133] 从这些烷氧基化方法所制备聚合物产物制备的聚合物试剂而制备的偶联物的组合(以及它们的氢卤化物盐形式):还如以上指出的那样,在本发明的一个或多个实施方案中,提供了一种水溶性聚合物活性剂偶联物的氢卤化物盐,其中通过(在偶联条件下)在碱存在下将带有胺的活性剂(例如脱保护的甘氨酸-伊立替康))偶合至聚合物试剂(例如4-臂季戊四醇基-聚(乙二醇)-羧甲基琥珀酰亚胺)上以形成偶联物来制备该偶联物,其中该偶联物是氢卤化物盐偶联物(例如该偶联物具有氮原子,其中每一个将被质子化亦或或未被质子化,其中任何给定的质子化的氨基都是氢卤化物),并且进一步,其中任选地,该聚合物试剂从如在此描述的那样制备的烷氧基化产物制备。

[0134] 偶联物-普遍地聚合物

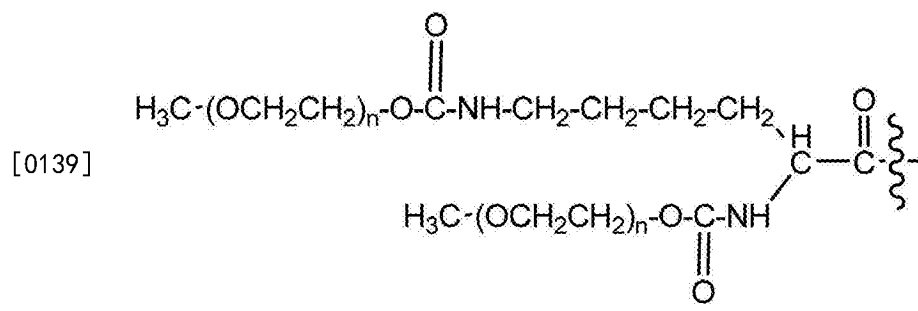
[0135] 水溶性聚合物活性剂偶联物(无论采用的具体形式,例如碱形式、盐形式、混盐、等等)包括一种水溶性聚合物。典型地,为了形成一种偶联物、一种水溶性聚合物(处于一种聚合物试剂形式)在包含在活性剂内的亲电体或亲核体处偶合(在偶联条件下)至一种活性剂上。例如,一种水溶性聚合物(再一次,处于带有例如一个活化的酯的聚合物试剂的形式)可以被偶合至具有一个或多个碱性胺基的活性剂上(即具有从约7.5至约11.5的pK值的胺)(在偶联后确定)。

[0136] 该偶联物的水溶性聚合物组分典型地是一种水溶性和非肽的聚合物。代表性聚合物包括聚(亚烷基二醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖)、聚(α -羟酸)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉、聚(N-丙烯酰吗啉)、或它们的共聚物或三元共聚物。一种具体的水溶性聚合物是包括重复单元 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -的聚乙二醇或PEG,其中n的范围是从约3至约2700或甚至更大,或者优选地是从约25至约1300。典型地,在偶联物中的水溶性聚合物的重均分子量的范围是从约100道尔顿至约150,000道尔顿。该偶联物的说明性总体分子量的范围可以从约800至约80,000道尔顿,或者是从约900至约70,000道尔顿。额外的代表性分子量的范围是从约1,000至约40,000道尔顿,或者是从约5,000至约30,000道尔顿,或者是从约7500道尔顿至约25,000道尔顿,或者对于即用盐类的更高分子量的实施方案,甚至是从约20,000至约80,000道尔顿。

[0137] 该水溶性聚合物可以处于许多几何形状或形式中的任一种,包括直链的、分支的、叉状的。在示例性实施方案中,该聚合物通常是直链的或多臂的。商业上可得的水溶性聚合物简称为水溶性聚合物。此外,可以常规获得的处于活化形式的水溶性聚合物称为聚合物试剂(它可以被偶合至活性剂上而不进一步改性或活化)。在Nektar公司的高级PEG化目录,2005-2006,“Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation(用于高级PEG化的聚乙二醇和衍生物)中可以发现水溶性聚合物和聚合物试剂的描述,除此之外,可以从NOF公司和键凯科技有限公司,美国(JenKem Technology USA)购买可得。

[0138] 具有处于分支模式的两个聚合物臂的示例性的分支聚物如下所示,通常称为PEG-

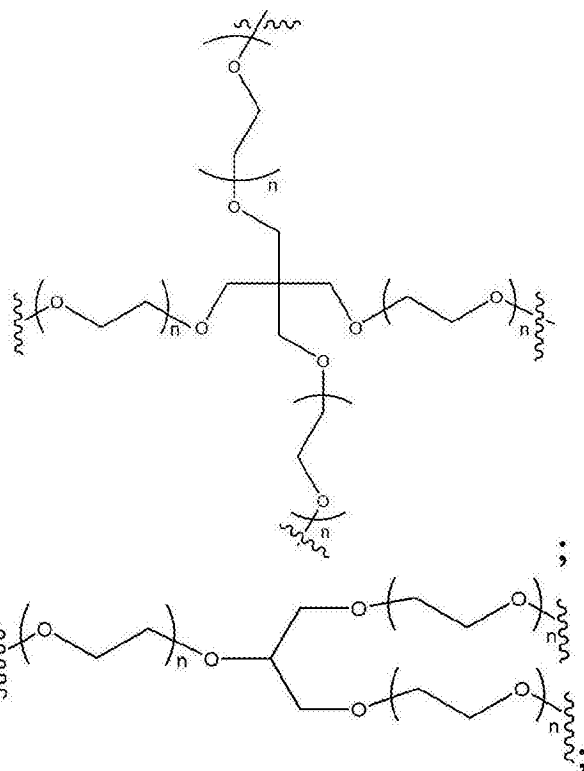
2或mPEG-2:



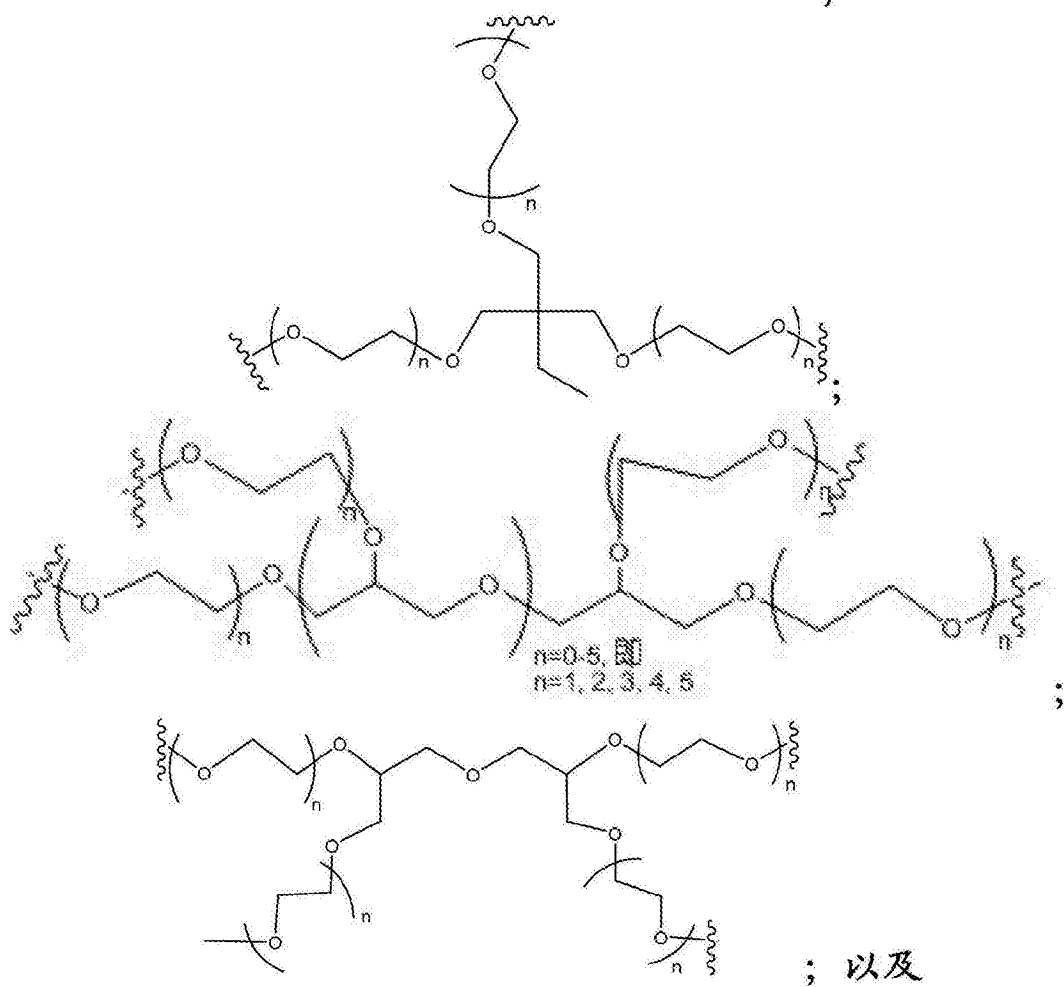
[0140] 其中  表示形成任何适合于包含在活性剂内的亲电体或亲核体反应的官能团的额外的原子的位置。示例性官能团包括NHS酯、醛、等等。

[0141] 对于在此描述的、含有变量“n”的聚合物结构,这样的变量对应一个整数,并且代表该聚合物的重复单体结构内的单体亚单元的数目。

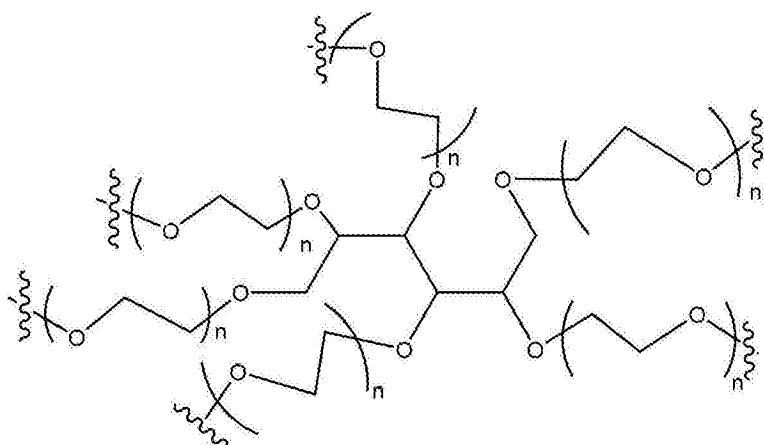
[0142] 用于制备这些偶联物中使用的示例性构造是具有例如3、4、5、6或8个聚合物臂的多臂水溶性聚合物试剂,每一个最优地带有一个官能团。多臂聚合物试剂可以具有任何个数的核心(例如多元醇核心),聚合物臂发源自这些核心。示例性多元醇核心包括甘油、甘油二聚体(3,3'-氧基二丙烷-1,2-二醇)三羟甲基丙烷、糖类(例如山梨醇或季戊四醇、季戊四醇二聚体)、和甘油低聚物,(例如六甘油或3-(2-羟基-3-(2-羟乙氧基)丙氧基)丙烷-1,2-二醇、以及其他甘油缩合产物。示例性的核心和从那里发源的聚合物臂可以具有以下化学式:



[0143]



[0144]



[0145] 在一个举例说明的实施方案中,该水溶性聚合物是如以上示出的4臂聚合物,其中n的范围可以是从约20至约500,或者是从约40至约500。

[0146] 在此描述的多臂实施方案中,每个聚合物臂典型地具有对应于以下项之一的分子量:200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、7500、8000、9000、10000、12,000、15000、17,500、18,000、19,000、20,000道尔顿或更大。对于在此描述的多臂聚合物的构型的总体分子量(这就是说,整体而言该多臂聚合物的分子量)通常对应于以下中的一种:800、1000、1200、1600、2000、2400、2800、3200、3600、4000、5000、6000、8000、10,000、12,000、15,000、16,000、20,000、24,000、25,000、28,000、30,000、32,000、36,000、40,000、45,000、48,000、50,000、60,000、80,000或100,000或更大。

[0147] 该水溶性聚合物,例如PEG,可以经由一个中间连接物,共价地连接到该活性剂上。该连接物可以含有任何数目的原子。总体而言,该连接物具有满足一个或多个以下范围的原子长度:从约1个原子至约50个原子;从约1个原子至约25个原子;从约3个原子至约12个原子;从约6个原子至约12个原子;以及从约8个原子至约12个原子。在考虑原子链长度时,只考虑贡献于总距离的原子。例如,具有结构 $\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-C(=O)-O-}$ 的连接物被认为具有11个原子的链长度,因为认为取代基不显著地贡献于该连接物的长度。说明性连接物包括双官能化合物,例如氨基酸(例如丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、肌氨酸、缬氨酸、赖氨酸、以及类似物)。该氨基酸可以是天然发生的氨基酸或非天然发生的氨基酸。适合的连接物还包括寡肽。

[0148] 画出以上多臂结构主要是为了说明具有附接到其上的PEG链的聚合物核心,并且虽然并未明确画出,取决于活性剂和使用的附接化学物的性质,最终的结构可以任选地包括一个另外的亚乙基, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$,该亚乙基附接到在每一聚合物臂的末端的氧原子上,和/或任选地含有任何数目的中间连接物原子以有助于到活性剂的共价附接。在一个具体的实施方案中,以上说明的每一个PEG臂进一步包括一个羧甲基基团, $\text{-CH}_2\text{-C(=O)-}$,该羧甲基基团共价地附接到末端氧原子上。

[0149] 用于改进的聚合物组合物的新烷氧基化方法

[0150] 如以上指出的那样,(例如)在制备具有活性剂的偶联物中有效的水溶性聚合物(连同它的盐形式)是商业上可得的。然而,如在此进一步描述的那样,提供了用于制备水溶性聚合物的方法,这些方法区别于以上描述的用于制备水溶性聚合物的方法,特别适合于

制备具有活性剂的偶联物(连同它的盐形式)。

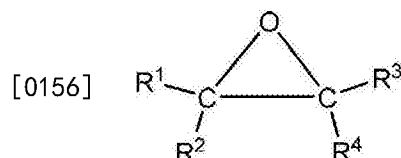
[0151] 就这一点,提供了一种方法,该方法包括在适合的溶剂中,将一种预先分离的可烷氧基化低聚物来形成烷氧基化聚合物产品烷氧基化的步骤,其中该预先分离的可烷氧基化低聚物具有已知并且限定的大于300道尔顿(例如大于500道尔顿)的重均分子量。

[0152] 在新烷氧基化方法中的烷氧基化步骤

[0153] 使用烷氧基化条件进行该烷氧基化步骤,这样单体的顺序加成通过环氧乙烷化合物的重复反应完成。在该可烷氧基化的低聚物最初具有一个或多个羟基官能团时,这些可烷氧基化的低聚物中的羟基中的一个或多个通过与强碱反应而被转化为反应性烷氧化物。然后,环氧乙烷化合物与可烷氧基化的官能团(例如,一种反应性烷氧化物)反应,由此不仅加成至反应性烷氧基化物上,而且以还在另一反应性烷氧基化物中终止的一种方式这样做。此后,在以上加成的并且反应的环氧乙烷化合物的反应性烷氧化物末端的环氧乙烷化合物的重复反应有效地产生了一个聚合物链。

[0154] 虽然一个或多个可烷氧基化的官能团中每一个优选是羟基,但是其他基团(例如胺、硫醇类和羧酸的羟基)也可以用作可接受的可烷氧基化的官能团。而且,由于在醛、酮、腈类和酰胺类中的 α 碳原子的氢的酸性,所以这些基团在 α 碳原子处的加成物可以用作可接受的可烷氧基化的官能团。

[0155] 该环氧乙烷化合物含有一个环氧乙烷基团并且具有以下化学式:



[0157] 其中(关于该结构):

[0158] R¹选自下组,该组由以下各项组成:H和烷基(在是烷基时优选是低级烷基);

[0159] R²选自下组,该组由以下各项组成:H和烷基(在是烷基时优选是低级烷基);

[0160] R³选自下组,该组由以下各项组成:H和烷基(在是烷基时优选是低级烷基);并且

[0161] R⁴选自下组,该组由以下各项组成:H和烷基(在是烷基时优选是低级烷基)。

[0162] 关于以上环氧乙烷化合物的化学式,特别优选的是R¹、R²、R³和R⁴中的每一个都是H,并且优选的是R¹、R²、R³和R⁴中只有一个是烷基(例如甲基或乙基),并且剩余取代基是H。示例性环氧乙烷化合物是环氧乙烷、环氧丙烷和1,2-环氧丁烷。添加以导致最优烷氧基化条件的环氧乙烷化合物的量取决于多个因素,包括起始可烷氧基化低聚物的量、生成的烷氧基化的聚合物材料的希望的大小和在该可烷氧基化的低聚物上的可烷氧基化的官能团的数目。因此,在希望得到更大的烷氧基化的聚合物材料时,在该烷氧基化条件下就存在相对更多的环氧乙烷化合物。类似地,如果(0a)代表需要达到单个可烷氧基化的官能团上的给定大小的聚合物“生长”的环氧乙烷化合物的量,那么带有两个可烷氧基化的官能团的可烷氧基化的低聚物需要2x(0a),带有三个可烷氧基化的官能团的可烷氧基化的低聚物需要3x(0a),带有四个可烷氧基化的官能团的可烷氧基化的低聚物需要4x(0a),并且以此类推。在所有情况下,通过考虑到烷氧基化的聚合物材料的希望的分子量和以下例行试验,本领域的普通技术人员可以确定烷氧基化条件要求的适当的量的环氧乙烷化合物。

[0163] 烷氧基化条件包括存在一种强碱。强碱的目的是对于存在于可烷氧基化低聚物中

的每一个酸性的氢的(例如羟基的氢)进行去质子化,并且形成烷氧化物离子种类(或用于非羟基可烷氧基化的官能团的离子种类)。用作烷氧基化条件的一部分的优选的强碱是:碱金属(例如金属钾、金属钠)、和碱金属混合物(例如钠-钾合金);氢氧化物(例如NaOH和KOH);以及玩氧化物(例如呈现以下环氧乙烷化合物的加成物)。可以由本领域的一个普通技术人员鉴别并使用其他强碱。例如,如果强碱可以形成烷氧化物离子种类(或用于非羟基可烷氧基化的官能团的离子种类),并且还提供并不妨碍烷氧基化物离子种类以致阻碍(或通过不现实地减缓而有效阻碍)烷氧化物离子种类与环氧乙烷分子的反应的阳离子,那么给定的碱就可以用作这里的强碱。强碱总体上以小并且计算出的量存在,它的量可以落入一个或多个以下范围内:基于总反应混合物的重量,从0.001至10.0重量百分比;以及基于总反应混合物的重量,从0.01至约6.0重量百分比。

[0164] 烷氧基化条件包括适合发生烷氧基化的温度。可以适合烷氧基化发生的示例性温度包括落入一个或多个以下范围内的那些:从10°C至260°C;从20°C至240°C;从30°C至220°C;从40°C至200°C;从50°C至200°C;从80°C至140°C;以及从100°C至120°C。

[0165] 烷氧基化条件包括适合发生烷氧基化的压力。可以适合烷氧基化发生的示例性压力包括落入一个或多个以下范围的那些:从10磅/平方英寸至1000磅/平方英寸;从15磅/平方英寸至500磅/平方英寸;从20磅/平方英寸至250磅/平方英寸;从25磅/平方英寸至100磅/平方英寸。此外,该烷氧基化压力可以约为在海平面的大气压(例如14.696磅/平方英寸 $\pm$ 10%)。

[0166] 在一些实例中,烷氧基化条件包括添加液体形式的环氧乙烷化合物。在一些实例中,烷氧基化条件包括添加蒸气形式的环氧乙烷化合物。

[0167] 烷氧基化条件可以包括使用一种适合的溶剂。最优地,其中发生烷氧基化条件的系统将不包括可以被去质子的任何组分(包括任何溶剂)(或者在将发生烷氧基化条件下的pH、温度、等等的条件下,保持基本上质子化)。用于烷氧基化的适合溶剂包括选自下组的有机溶剂,该组由以下各项组成:四氢呋喃(THF)、二甲基甲酰胺(DMF)、甲苯、苯、二甲苯、均三甲苯、四氯乙烯、苯甲醚、二甲基乙酰胺、以及以上的混合物。用作部分烷氧基化条件的稍不理想的溶剂(但是尽管如此,仍是考虑的)是乙腈、苯乙腈和乙酸乙酯;在一些实例中,烷氧基化条件将不包括作为溶剂的乙腈、苯乙腈和乙酸乙酯中的任一种。

[0168] 在本发明的一个或多个实施方案中,当在液相中进行这些烷氧基化条件时,这些烷氧基化条件进行为使得该可烷氧基化低聚物和从烷氧基化该可烷氧基化低聚物形成的所希望的烷氧基化的聚合物材料这二者不仅都具有在使用的适合的溶剂中的类似的溶解度(并且优选地,基本上相同的溶解度),而且都基本上溶于该适合的溶剂。例如,在一个或多个实施方案中,可烷氧基化低聚物将基本上溶于在烷氧基化条件下使用的溶剂,并且生成的烷氧基化的聚合物材料还将基本上溶于烷氧基化条件。

[0169] 在一个或多个实施方案中,烷氧基化低聚物和烷氧基化的聚合物材料在一种适合的溶剂中的基本相同的溶解度与在适合的溶剂中的前体分子(例如在制备以前分离的烷氧基化低聚物中使用的)的溶解度相反,其中该前体分子可以比烷氧基化低聚物和/或烷氧基化的聚合物材料具有在该适合的溶剂中的更低(或者甚至基本上更低)的溶解度。只通过举例,该烷氧基化低聚物和烷氧基化的聚合物材料这二者都将具有季戊四醇核心并且都将基本上溶于甲苯,但是季戊四醇自身在甲苯中具有有限的溶解度。

[0170] 特别优选的是,在烷氧基化条件中使用的溶剂是甲苯。基于在完成添加环氧乙烷化合物以后的反应混合物的重量,用于该反应的甲苯的量大于反应混合物的25wt%并且小于75wt%。通过考虑到该聚合物的是希望的分子量、将发生烷氧基化的位点数目、所使用的可烷氧基化低聚物的重量、等等,本领域的一个普通技术人员可以计算该溶剂的起始量。

[0171] 优选的是,测量甲苯的量,这样对于提供希望的烷氧基化的聚合物材料的烷氧基化条件,该量是足够的。

[0172] 此外,特别优选的是,这些烷氧基化条件基本不存在水。因此,优选的是这些烷氧基化条件具有小于100ppm、更优选50ppm、仍更优选20ppm、远远更优选小于14ppm、并且甚至仍更优选小于8ppm的含水量。

[0173] 在适合的反应器、典型地是一个不锈钢反应器中发生烷氧基化条件。

[0174] 在一个或多个实施方案中,缺少附接到带有一个 α 氢的碳的异氰酸酯基团的可烷氧基化低聚物和/或前体分子是可接受的。在一个或多个实施方案中,以上制备的可烷氧基化低聚物和/或前体分子缺少异氰酸酯基团。

[0175] 在新烷氧基化方法中的可烷氧基化低聚物

[0176] 在新烷氧基化方法中使用的可烷氧基化低聚物必须具有至少一个可烷氧基化的官能团。然而,该可烷氧基化低聚物可以具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或更多可烷氧基化的官能团,优选一个可烷氧基化低聚物具有从一至六个可烷氧基化的官能团。

[0177] 如以上所述,在该可烷氧基化低聚物内的可烷氧基化的官能团可以独立地选自下组,该组由以下各项组成:羟基、羧酸、胺、硫醇、醛、酮、和腈。在其中该可烷氧基化低聚物内存在多于一个的可烷氧基化的官能团的那些实例中,典型的是,每一个可烷氧基化的官能团都是相同的(例如在可烷氧基化低聚物内的每一个可烷氧基化的官能团都是羟基),虽然也考虑了在相同的可烷氧基化低聚物内的不同的可烷氧基化的官能团的实例。在该可烷氧基化官能团是羟基时,优选该羟基是伯羟基。

[0178] 该可烷氧基化低聚物可以采取许多可能的几何形状中的任一种。例如,该可烷氧基化低聚物可以是直链的。在直链的可烷氧基化低聚物的一个实例中,该直链的可烷氧基化低聚物的一个末端是较惰性的官能团(例如封端基团),并且另一个末端是可烷氧基化的官能团(例如羟基)。该结构的示例性可烷氧基化低聚物是甲氧基-PEG-OH,或简称为mPEG,其中一个末端是较惰性的甲氧基基团,而另一个末端是羟基。给出mPEG的结构如下。

[0179] $\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$

[0180] (其中只对于就在前面的结构,n是从13至100的一个整数)。

[0181] 该可烷氧基化低聚物可以采用的直链几何形状的另一个实例是,在每一末端都带有可烷氧基化的官能团(相同的亦或不同的)的一种直链有机聚合物。该结构的示例性可烷氧基化低聚物是 α -、 ω -二羟基聚(乙二醇),或

[0182] $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$

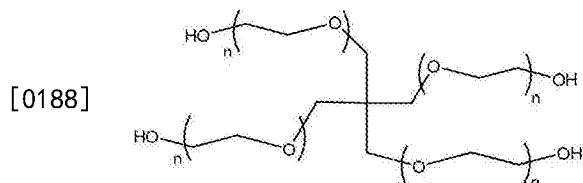
[0183] (其中只对于就在前面的结构,n是从13至100的一个整数),

[0184] 它可以用简要形式HO-PEG-OH代表,其中被理解为,-PEG-符号代表以下结构单元:

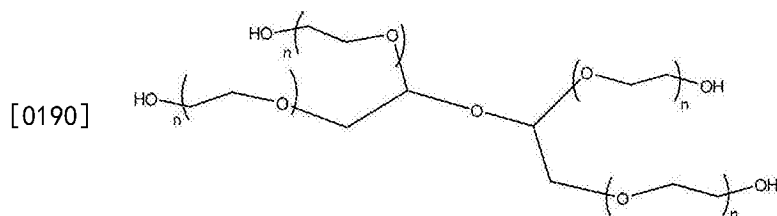
[0185] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$

[0186] (其中只对于就在前面的结构,n是从13至100的一个整数)。

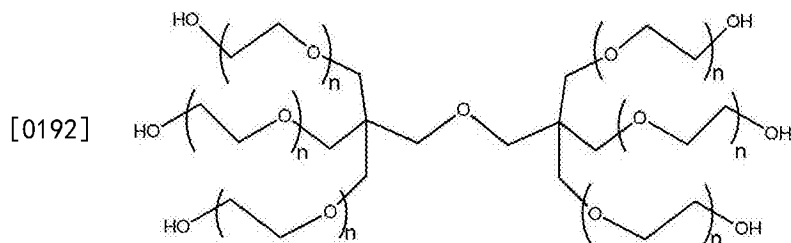
[0187] 可烷氧基化低聚物可以具有的另一几何形状是“多臂的”或支化的结构。关于这一支化结构,可烷氧基化低聚物中的一个或多个原子用作“支化点原子”,通过它们连接了(直接连接亦或通过一个或多个原子连接)两个、三个、四个或更多(但典型地是两个、三个或四个)不同系列的重复单体或“臂”。在最低程度,如在此使用的“多臂”结构具有三个或更多个不同的臂,但是可以具有如四个、五个、六个、七个、八个、九个或更多个那么多的臂,其中4至8个臂的多臂结构是优选的(例如4臂结构、5臂结构、6臂结构、和8臂结构)。以下提供了可烷氧基化低聚物的示例性多臂结构:



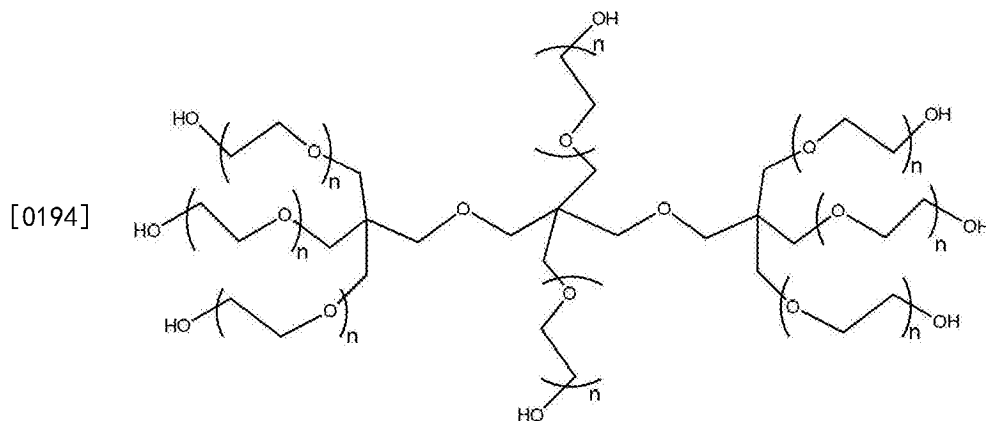
[0189] 其中(只对于就在前面的结构)n的平均值是从1至50,例如从10至50,或另外定义为使得该结构的分子量是从300道尔顿至9,000道尔顿(例如从约500道尔顿至5,000道尔顿);



[0191] 其中(只对于就在前面的结构)n的平均值是从2至50,例如从10至50,或另外定义为使得该结构的分子量是从300道尔顿至9,000道尔顿(例如从约500道尔顿至5,000道尔顿);



[0193] 其中(只对于就在前面的结构)n的平均值是从2至35,例如从8至约40,或另外定义为使得该结构的分子量是从750道尔顿至9,500道尔顿(例如从约500道尔顿至5,000道尔顿);并且



[0195] 其中(只对于就在前面的结构)n的平均值是2至35,例如从5至35,或另外定义为使得该结构的分子量是从1,000道尔顿至13,000道尔顿(例如从约500道尔顿至5,000道尔顿)。

[0196] 对于四个就在前面的结构中的每一个,优选n的值在每一实例中基本上都是相同的。因此,优选在对于给定的可烷氧基化低聚物考虑所有n的值时,该可烷氧基化低聚物的所有n的值都在三个标准差内,更优选地在两个标准差内,并且仍更优选在一个标准差内。

[0197] 在可烷氧基化低聚物的分子量方面,该可烷氧基化低聚物将具有已知的并且定义的重均分子量。对于在此使用,在该烷氧基化低聚物自产生它的合成环境分离时,仅仅已知并且定义可烷氧基化低聚物的重均分子量。可烷氧基化低聚物的示例性重均分子量将落入以下一个或多个范围中:大于300道尔顿;大于500道尔顿;从300道尔顿至15,000道尔顿;从500道尔顿至5,000道尔顿;从300道尔顿至10,000道尔顿;从500道尔顿至4,000道尔顿;从300道尔顿至5,000道尔顿;从500道尔顿至3,000道尔顿;从300道尔顿至2,000道尔顿;从500道尔顿至2,000道尔顿;从300道尔顿至1,000道尔顿;从500道尔顿至1,000道尔顿;从1,000道尔顿至10,000道尔顿;从1,000道尔顿至5,000道尔顿;从1,000道尔顿至4,000道尔顿;从1,000道尔顿至3,000道尔顿;从1,000道尔顿至2,000道尔顿;从1,500道尔顿至15,000道尔顿;从1,500道尔顿至5,000道尔顿;从1,500道尔顿至10,000道尔顿;从1,500道尔顿至4,000道尔顿;从1,500道尔顿至3,000道尔顿;从1,500道尔顿至2,000道尔顿;从2,000道尔顿至5,000道尔顿;从2,000道尔顿至4,000道尔顿;以及从2,000道尔顿至3,000道尔顿。

[0198] 为了本发明的目的,优选预先分离该可烷氧基化低聚物。用预先分离是指该可烷氧基化低聚物存在于产生它的合成环境外并且从中分离(最典型地在用以制备该可烷氧基化低聚物的烷氧基化条件外),并且可以任选地储存较长时段,或者任选地储存更短时间而对于随后使用基本上没有变化。因此,例如如果它封装在一个惰性环境内,那么可烷氧基化低聚物就是预先分离的。就这一点,预先分离的可烷氧基化低聚物可以被封装在一个基本上缺少(例如小于0.1wt%)环氧乙烷化合物的容器中。而且,在15天的过程中,预先分离的可烷氧基化低聚物并未改变它的分子量超过10%。因此,在本发明的一个或多个实施方案中,“预先分离的”这个概念与(例如)其中允许从前体分子进行不间断的并且连续的烷氧基化反应的情况相反,其中该烷氧基化反应生成对应可烷氧基化低聚物的结构,生成对应烷氧基化的聚合物材料的结构,“预先分离的”这个概念要求该可烷氧基化低聚物远离形成它的条件而存在。然而,按照本发明,该预先分离的可烷氧基化低聚物一旦添加入(作为一个分离的步骤)烷氧基化条件中将经历一个烷氧基化步骤。

[0199] 在新烷氧基化方法中的可烷氧基化低聚物的源

[0200] 可以经由合成手段获得可烷氧基化低聚物。就这一点,通过(a)烷氧基化具有小于300道尔顿(例如小于500道尔顿)的分子量的前体分子以形成包括可烷氧基化低聚物或预聚合物的反应混合物,并且(b)从该反应混合物分离可烷氧基化低聚物,来制备可烷氧基化低聚物。对前体分子进行烷氧基化的步骤很大程度上符合以上讨论的烷氧基化步骤的条件和要求。可以使用任何技术上已知的步骤进行分离可烷氧基化低聚物的步骤,但是可以包括允许在该反应中消耗所有环氧乙烷化合物,主动进行骤冷步骤,通过技术上已知的方法(包括例如蒸馏掉所有挥发性物质,通过过滤或洗涤并且施用色谱手段除去固体反应副产

物)分离最终反应混合物。

[0201] 此外,可以从商业来源获得可烷氧基化低聚物。示例性商业来源包括NOF公司(东京,日本),它提供SUNBRIGHT[®]DKH[®]聚(乙二醇),SUNBRIGHT[®]GL甘油、三聚(乙二醇)醚,SUNBRIGHT[®]PTE[®]季戊四醇、四聚(乙二醇)醚,SUNBRIGHT[®]DG二甘油、四聚(乙二醇)醚,以及SUNBRIGHT[®]HGEO[®]六甘油、八聚(乙二醇)醚名下的可烷氧基化低聚物。优选的可烷氧基化低聚物包括具有SUNBRIGHT[®]PTE[®]-2000季戊四醇、四聚(乙二醇)醚(它具有约2,000道尔顿的重均分子量)和SUNBRIGHT[®]DG-2000二甘油、四聚(乙二醇)醚(它具有约2,000道尔顿的重均分子量)的结构的那些。

[0202] 前体分子可以是具有一个或多个可烷氧基化的官能团的任何小分子(例如,分子量小于该可烷氧基化低聚物的重均分子量)。

[0203] 示例性前体分子包括多元醇,它是具有多个可用的羟基的小分子(典型地具有小于300道尔顿的分子量,例如小于500道尔顿)。取决于在该可烷氧基化低聚物或预聚合物内所希望的聚合物臂的数目,用作前体分子的多元醇将典型地包括3个至约25个羟基,优选约3个至约22个羟基,最优选约4个至约12个羟基。优选的多元醇包括甘油低聚物或聚合物,例如如六甘油、季戊四醇以及它们的低聚物或聚合物(例如,二季戊四醇、三季戊四醇、四季戊四醇、和季戊四醇的乙氧基化的形式),以及糖衍生的醇类(例如山梨醇、阿拉伯糖醇(arabinitol)、和甘露醇)。而且,很多可商购的多元醇,例如肌醇的不同异构体(即1,2,3,4,5,6-六羟环己烷)、2,2-二(羟甲基)-1-丁醇、(2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(TRIS)、2-[二(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇、{[2-羟基-1,1-二(羟甲基)乙基]氨基}乙酸(Tricine)、2-[(3-{[2-羟基-1,1-二(羟甲基)乙基]氨基}丙基)氨基]-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇、2-[[2-羟基-1,1-二(羟甲基)乙基]氨基]乙磺酸(TES)、4-[[2-羟基-1,1-二(羟甲基)乙基]氨基]-1-丁基磺酸,以及2-[二(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇盐化物可以用作一种可接受的前体分子。在其中前体分子具有可电离基团或将干扰该烷氧基化步骤的基团的那些情况下,在进行烷氧基化步骤前,必须保护或改性那些可电离基团。

[0204] 示例性优选的前体分子包括选自下组的那些前体分子,该组由以下各项组成:甘油、二甘油、三甘油、六甘油、甘露醇、山梨醇、季戊四醇、二季戊四醇、和第三季戊四醇。

[0205] 在本发明的一个或多个实施方案中,优选的是预先分离的可烷氧基化低聚物和烷氧基化的聚合物产物都不具有前体分子的可烷氧基化官能团(例如羟基)。

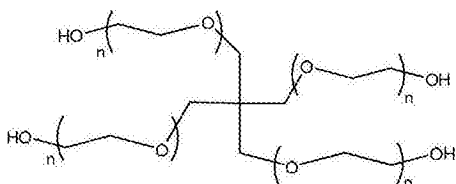
[0206] 通过新烷氧基化方法产生的烷氧基化的聚合物材料

[0207] 在此描述的方法下制备的烷氧基化的聚合物材料将具有对应可烷氧基化低聚物的结构的基本构造(即直链的可烷氧基化低聚物导致了一种直链的烷氧基化的聚合物材料,四臂的可烷氧基化低聚物导致了一种四臂的烷氧基化的聚合物材料,等等)。作为结果,烷氧基化的聚合物材料将采用多种可能的几何形状中的任一个,包括直链的、分支的和多臂的。

[0208] 关于分支的结构,一种分支的烷氧基化的聚合物材料将具有三个或更多个不同的臂,但是可以具有如四个、五个、六个、七个、八个、九个或更多个那么多的臂,其中4至8个臂的分支结构是优选的(例如4臂分支结构、5臂分支结构、6臂分支结构、和8臂分支结构)。

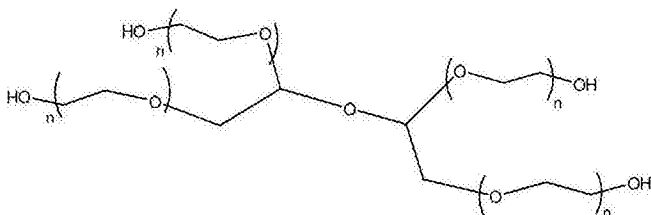
[0209] 以下提供了烷氧基化的聚合物材料的示例性分支结构:

[0210]



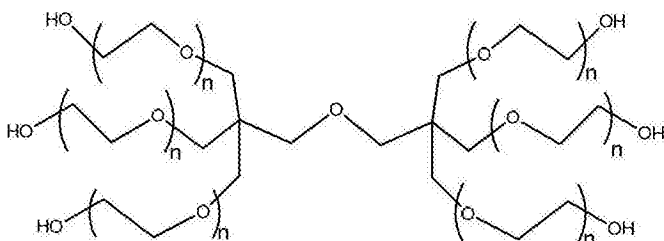
[0211] 其中(只对于就在前面的结构), n 的平均值满足一个或多个以下范围:从10至1,000;从10至500;从10至250;从50至1000;从50至250;以及从50至120(或者另外定义 n ,这样该结构的分子量是从2,000道尔顿至180,000道尔顿,例如从2,000道尔顿至120,000道尔顿);

[0212]



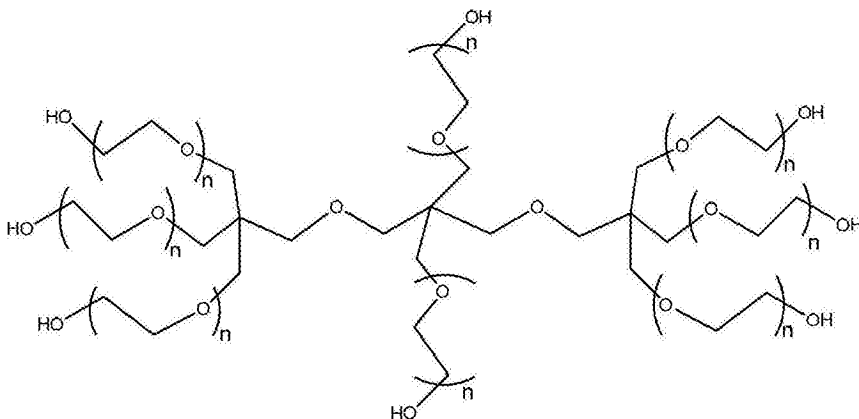
[0213] 其中(只对于就在前面的结构), n 的平均值满足一个或多个以下范围:从10至1,000;从10至500;从10至250;从50至1,000;从50至250;以及从50至120(或者另外定义 n ,这样该结构的分子量是从2,000道尔顿至180,000道尔顿,例如从2,000道尔顿至120,000道尔顿);

[0214]



[0215] 其中(只对于就在前面的结构), n 的平均值满足一个或多个以下范围:从10至750;从40至750;从50至250;以及从50至120(或者另外定义为使得该结构的分子量是从3,000道尔顿至200,000道尔顿,例如从12,000道尔顿至200,000道尔顿);并且

[0216]



[0217] 其中(只对于就在前面的结构), n 的平均值满足一个或多个以下范围:从10至600和从35至600(或者另外定义为使得该结构的分子量是从4,000道尔顿至215,000道尔顿,例如从12,000道尔顿至215,000道尔顿)。

[0218] 对于四个就在刚提供的结构中的每一个,优选 n 的值在每一实例中基本上都是相同的。因此,优选在对于给定的烷氧基化的聚合物材料考虑所有 n 的值时,该烷氧基化的聚

合物材料、可烷氧基化低聚物或预聚合物的所有n的值都在三个标准差以内,更优选地在两个标准差以内,并且仍更优选在一个标准差以内。

[0219] 在烷氧基化的聚合物材料的分子量方面,该烷氧基化的聚合物材料将具有已知的并且定义的数均分子量。对于在此使用,对于自产生它的合成环境分离的材料,会仅仅已知并且定义数均分子量。

[0220] 该烷氧基化的聚合物产物的总分子量可以是适合打算的目标的一个分子量。可以通过试验经由常规实验的误差确定用于任何给定目标的可接受的分子量。烷氧基化的聚合物产物的示例性分子量将具有落入一个或多个以下范围内的数均分子量:从2,000道尔顿至215,000道尔顿;从5,000道尔顿至215,000道尔顿;从5,000道尔顿至150,000道尔顿;从5,000道尔顿至100,000道尔顿;从5,000道尔顿至80,000道尔顿;从6,000道尔顿至80,000道尔顿;从7,500道尔顿至80,000道尔顿;从9,000道尔顿至80,000道尔顿;从10,000道尔顿至80,000道尔顿;从12,000道尔顿至80,000道尔顿;从15,000道尔顿至80,000道尔顿;从20,000道尔顿至80,000道尔顿;从25,000道尔顿至80,000道尔顿;从30,000道尔顿至80,000道尔顿;从40,000道尔顿至80,000道尔顿;从6,000道尔顿至60,000道尔顿;从7,500道尔顿至60,000道尔顿;从9,000道尔顿至60,000道尔顿;从10,000道尔顿至60,000道尔顿;从12,000道尔顿至60,000道尔顿;从15,000道尔顿至60,000道尔顿;从20,000道尔顿至60,000道尔顿;从25,000道尔顿至60,000道尔顿;从30,000道尔顿至60,000;从6,000道尔顿至40,000道尔顿;从9,000道尔顿至40,000道尔顿;从10,000道尔顿至40,000道尔顿;从15,000道尔顿至40,000道尔顿;从19,000道尔顿至40,000道尔顿;从15,000道尔顿至25,000道尔顿;以及从18,000道尔顿至22,000道尔顿。

[0221] 对于任何给定的烷氧基化的聚合物材料,可以进行一个任选的步骤,以进一步转化该烷氧基化的聚合物材料,这样它带有特定的反应基团以形成一种聚合物试剂。因此,使用本领域熟知的技术,该烷氧基化的聚合物材料可以被官能化为包括一个反应基团(例如羧酸、活性酯、胺、硫醇、马来酰亚胺、醛、酮、等等)。

[0222] 在进行一个任选的用于进一步转化烷氧基化的产物以使其带有一个特定的反应基团的步骤中,这样的任选步骤在一种适合的溶剂中进行。本领域的普通技术人员可以确定任何具体的溶剂是否适合任何给定的反应步骤。然而通常,该溶剂优选是一种非极性溶剂或极性溶剂。非极性溶剂的非限制性实例包括苯、二甲苯和甲苯。示例性极性溶剂包括,但并不限于二噁烷、四氢呋喃(THF)、叔丁醇、DMSO(二甲亚砜)、HMPA(六甲基磷酰胺)、DMF(二甲基甲酰胺)、DMA(二甲基乙酰胺)、以及NMP(N-甲基吡咯烷酮)。

[0223] 烷氧基化的聚合物材料的其他组合物

[0224] 在此提供的本发明的另一方面是包括烷氧基化的聚合物材料的组合物,它不但涵盖包括烷氧基化的聚合物材料的任何组合物,而且还有其中烷氧基化的聚合物材料被进一步转化为例如聚合物试剂的组合物,连同用一种活性剂偶合这样的聚合物试剂而形成的偶联物的组合物。除其他之外,在此描述的方法的益处是达到含有高纯度烷氧基化的聚合物材料的组合物的能力。这些组合物可以特征在于具有:基本上低含量的高分子量杂质(例如具有大于希望的烷氧基化的聚合物材料的分子量的分子量的含聚合物种类)和低含量的低分子量二醇杂质(即HO-PEG-OH)这二者,任一种杂质类型(并且优选是这两种杂质类型)总计小于8wt%,并且更优选小于2wt%。此外或可替代地,这些组合物还可以以特征在于具有大

于92wt%、更优选大于97wt%的烷氧基化的聚合物材料的纯度(连同包含自该烷氧基化的聚合物材料所形成的聚合物试剂的组合物,以及自偶联这样的聚合物与活性剂所形成的偶联物的组合物)。可以使用凝胶渗透色谱法(GPC)和凝胶过滤色谱法(GFC)来表征该烷氧基化的聚合物材料。那些色谱方法允许根据分子量将组合物分离为它的组分。在实例7和实例8中描述的产物的示例性GFC痕迹分别作为图7和图8提供。

[0225] 烷氧基化的聚合物材料和由此形成的组合物的示例性用途

[0226] 对于偶联到例如活性剂上,在此提供的烷氧基化的聚合物材料连同那些已经进一步改性为带有一个特定反应基团的烷氧基化的聚合物产物(在此称为“聚合物试剂”)是有用的。适合于用于与在此描述的聚合物试剂进行反应的生物活性剂的优选的基团是亲电子的和亲核的基团。示例性基团包括伯胺、羧酸、醇、硫醇类、肼和酰肼。适合于与在此描述的聚合物试剂反应的这样的基团对于本领域普通技术人员而言是已知的。因此,本发明提供了用于制造偶联物的方法,该方法包括在偶联条件下,使一种活性剂与在此描述的聚合物试剂接触的步骤。

[0227] 适合的偶联条件是时间、温度、pH、试剂浓度、试剂的一个或多个官能团、在活性剂上的可用官能团、溶剂、以及类似的足以影响聚合物试剂与一种活性剂之间的偶联的那些条件。如在本领域已知的那样,除其他之外,具体条件取决于活性剂、所希望的偶联的类型、在反应混合物中其他材料的存在、等等。可以由本领域的普通技术人员在阅读此处的披露内容以后,参考相关文献,和/或通过常规实验来确定在任何具体情况下的足以影响偶联的条件。

[0228] 例如,当该聚合物试剂含有N-羟基丁二酰亚胺活性酯(例如琥珀酰亚胺琥珀酸酯、琥珀酰亚胺基丙酸酯、和琥珀酰亚胺基丁酸酯),并且活性剂含有一个胺基时,该偶联可以在室温下,在从约7.5至约9.5的pH下进行。此外,当该聚合物试剂含有一个乙烯砜反应基团或马来酰亚胺基团并且药理学活性剂含有一个巯基基团时,该偶联可以在室温下,在约7至约8.5的pH下进行。此外,当与该聚合物试剂相关的反应基团是醛或酮,并且该药理学活性剂含有伯胺时,该偶联可以通过其中药理学活性剂的伯胺与聚合物的醛或酮反应的还原氨化来进行。在从约6至约9.5的pH下进行,还原氨化最初导致了其中药理学活性剂和聚合物经由亚胺键连接的一种偶联物。随后用适合的还原剂(例如 NaCNBH_3)处理含有亚胺键的偶联物,将该亚胺还原为仲胺。对于涉及这些和其他偶联反应的额外的信息,可以参考Hermanson(赫曼森)的“Bioconjugate Techniques(生物偶联技术)”,美国学术出版社,1996。

[0229] 示例性偶联条件包括在从4约至约10,并且例如在约4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、或10.0的pH进行偶联反应。允许该反应进行从约5分钟至约72小时,优选从约30分钟至约48小时,并且更优选从约4小时至约24小时。可以发生偶联的温度典型地,虽然并不是必需地,是在从约0°C至约40°C的范围内,并且通常在室温或更低的温度下。通常使用磷酸盐缓冲溶液、乙酸钠、或类似系统进行这些偶联反应。

[0230] 关于试剂浓度,典型地是将过量的聚合物试剂与该活性剂结合。然而在一些情况下,优选是具有聚合物试剂上的反应基团比活性剂的反应基团的化学计算量。因此,例如将一摩尔的带有四个反应基团的聚合物试剂与四摩尔的活性剂结合。聚合物试剂的反应基团比活性剂的示例性比率包括约1:1(聚合物试剂的反应基团:活性剂)、1:0.1、1:0.5、1:1.5、

1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:8、或1:10。允许进行偶联反应直至基本上没有进一步的偶联发生,这总体上可以通过监控反应随时间的进展而确定。

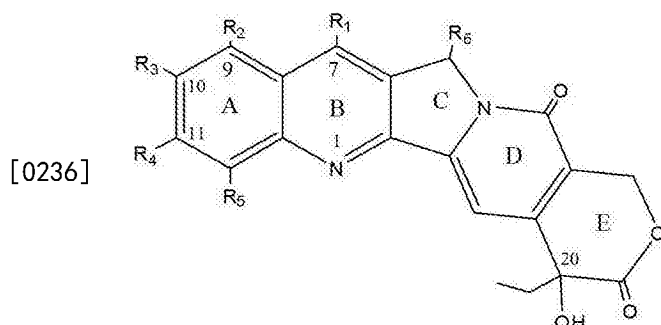
[0231] 可以通过在不同时间点从反应混合物抽取等分部分并且通过色谱方法、SDS-PAGE或MALDI-TOF质谱测定法、NMR、IR、或任何其他适合的分析方法分析反应混合物,来监控反应进展。一旦关于形成的偶联物的量或剩余的未偶联的聚合物试剂的量达到一个稳定态,则假定该反应完成。典型地,偶联反应的时间在任何地方是从数分钟至若干小时(例如从5分钟至24小时或更多)。优选地,但不是必需地纯化所生成产物的混合物,以分离出过量活性剂、强碱、冷凝剂和反应副产物以及溶剂。然后可以使用分析方法(例如色谱方法、分光镜法、MALDI、毛细管电泳法和/或凝胶电泳)来进一步表征所生成的偶联物。可以纯化该聚合物活性剂偶联物以获得/分离出不同的偶联的种类。

[0232] 关于活性剂、烷氧基化的聚合物材料和从烷氧基化的聚合物材料制备的聚合物试剂可以在适合的偶联条件下结合以生成偶联物。就这一点,示例性活性剂可以是选自下组的活性剂,该组由以下各项组成:小分子药物、寡肽、肽、和蛋白。用于在此使用的活性剂包括但不限于以下这些:阿霉素、 γ -氨基丁酸(GABA)、胺碘酮、阿米替林、阿奇霉素、苄非他明、溴苯那敏、卡比沙明、降钙素、苯丁酸氮芥、氯普鲁卡因、氯喹、氯苯那敏、冬眠灵、桂利嗪、克拉霉素、氯米芬、环苯扎林、环喷托酯、环磷酰胺、达卡巴嗪、道诺霉素、地美环素、狄布卡因、双环维林、二乙胺苯丙酮、地尔硫卓、茶苯海明、苯海拉明、吡二丙胺、多塞平、多西环素、多西拉敏、双嘧达莫、EDTA、红霉素、氟西洋、甲紫、羟氯喹、丙米嗪、胰岛素、伊立替康、左醋美沙朵、利多卡因、洛沙平、氮芥、美法仑、美沙酮、左美丙嗪、甲氨蝶呤、甲氧氯普胺、米诺环素、萘替芬、尼卡地平、尼扎替丁、奥芬那君、氯化奥昔布宁、土霉素、酚苄明、酚妥拉明、普鲁卡因胺、普鲁卡因、普马嗪、普鲁米近、丙美卡因、丙氧卡因、右丙氧芬、雷尼替丁、它莫西芬、特比萘芬、丁卡因、四环素、曲马多、三氟丙嗪、三甲泼拉嗪、三甲基苯甲酰胺、曲米帕明、曲吡那敏、醋竹桃霉素、酪胺、乌拉莫司汀、维拉帕米、以及加压素。

[0233] 其他示例性活性剂包括选自下组的那些,该组由以下各项组成:阿伐斯汀、阿莫沙平、阿司咪唑、阿托品、阿奇霉素、贝那普利、苯扎托品、双环己丙醇、布比卡因、丁丙诺啡、丁螺环酮、布托啡诺、咖啡因、喜树碱和属于喜树碱家族的分子、头孢曲松、冬眠灵、环丙沙星、克拉屈滨、氯马斯汀、克林霉素、氯法齐明、氯氮平、可卡因、可待因、赛庚啶、去甲丙咪嗪、氯化麦角胺、地芬尼多、地芬诺酯、潘生丁、多西他赛、多沙普仑、麦角胺、泛昔洛韦、芬太尼、黄酮哌酯、氟达拉滨、氟奋乃静、氟伐他汀、更昔洛韦、格拉司琼、胍乙啶、氟派啶醇、后马托品、氢可酮、氢吗啡酮、羟嗪、莨菪碱、氧米帕明、伊曲康唑、酮咯酸、酮康唑、左卡巴斯汀、左吗南、林可霉素、洛美沙星、洛哌丁胺、氯沙坦、洛沙平、马吲哚、氯苯甲嗪、哌替啶、甲哌卡因、甲砒唑嗪、甲地嗪、乌洛托品、甲巯咪唑、左美丙嗪、美舍吉特、甲硝唑、米诺地尔、丝裂霉素c、吗茛酮、吗啡烷、奈法唑酮、纳布啡、萘啶酸、纳美芬、纳洛酮、纳曲酮、萘甲唑林、奈多罗米、尼古丁、诺氟沙星、氧氟沙星、昂丹司琼、羟考酮、羟吗啡酮、紫杉醇、喷他佐辛、己酮可可碱、奋乃静、毒扁豆碱、毛果芸香碱、匹莫齐特、丙吗卡因、哌唑嗪、丙氯拉嗪、丙嗪、普鲁米近、奎尼丁、奎宁、蛇根木生物碱类、维生素b2、利福布汀、利哌利酮、罗库铵、天仙子碱、舒芬太尼、他克林、特拉唑嗪、特康唑、特非那定、疏利达嗪、替沃噻吨、噻氯匹定、噻吗洛尔、妥拉磺脲、托美丁、曲唑酮、硫乙拉嗪、三氟丙嗪、苯海索、异丁嗪、曲米帕明、筒箭毒碱、维库溴铵、阿糖腺苷、长春碱、长春新碱和长春瑞宾。

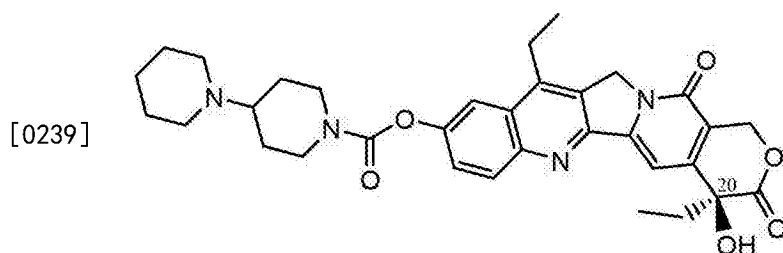
[0234] 仍然是其他示例性活性剂包括选自下组的那些,该组由以下各项组成:乙酰唑胺、阿伐斯汀、阿昔洛韦、磷酸腺苷、别嘌醇、阿普唑仑、氯氧平、氨吡酮、阿可乐定、阿扎他定、氨曲南、比沙可啶、博来霉素、溴苯那敏、丁螺环酮、布康唑、喜树碱和喜树碱家族内的分子、卡比沙明、头孢孟多、头孢唑林、头孢克肟、头孢美唑、头孢尼西、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢替坦、头孢泊肟、头孢曲松、头孢匹林、氯喹、氯苯那敏、西咪替丁、克拉屈滨、克霉唑、氯唑西林、去羟肌苷、潘生丁、多沙唑嗪、多西拉敏、益康唑、依诺沙星、艾司唑仑、乙硫异烟胺、泛昔洛韦、法莫替丁、氟康唑、氟达拉滨、叶酸、更昔洛韦、羟氯喹、双碘喹啉、异烟肼、伊曲康唑、酮康唑、拉莫三嗪、兰索拉唑、氯雷他定、氯沙坦、甲苯达唑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲硝唑、咪康唑、咪达唑仑、米诺地尔、奈法唑酮、萘啶酸、烟酸、尼古丁、尼扎替丁、奥美拉唑、噁丙嗪、奥昔康唑、罂粟碱、喷司他丁、非那吡啶、毛果芸香碱、吡罗昔康、哌唑嗪、伯氨喹、吡嗪酰胺、乙胺嘧啶、吡哆素、奎尼丁、奎宁、利巴韦林、利福平、磺胺嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺甲噁唑、柳氮磺吡啶、磺胺异恶唑、特拉唑嗪、噻苯达唑、硫胺素、硫鸟嘌呤、噻吗洛尔、曲唑酮、氨苯蝶啶、三唑啉、三甲双酮、甲氧苄啶、三甲曲沙、曲吡那敏、托品酰胺、和阿糖腺苷。

[0235] 仍然其他示例性活性剂包括属于喜树碱家族的分子的那些。例如,该活性剂可以具有以下通用结构:



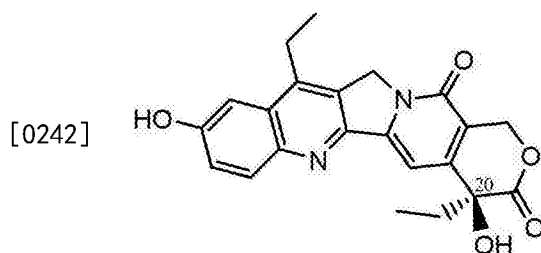
[0237] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 每一个独立选自下组,该组由以下各项组成:氢;卤素;酰基;烷基(例如,C1-C6烷基);取代的烷基;烷氧基(例如,C1-C6烷氧基);取代的烷氧基;链烯基;炔基;环烷基;羟基;氰基;硝基;叠氮基;酰氨基;肼;氨基;取代的氨基(例如,单烷基氨基和二烷基氨基);羟基羰基;烷氧基羰基;烷基羰基氧基;烷基羰基氨基;氨基甲酰基烷氧基;芳基磺酰基氧基;烷基磺酰基氧基; $-C(R_7)=N-(O)_i-R_8$,其中 R_7 是H、烷基、链烯基、环烷基、或芳基, i 是0或1,并且 R_8 是H、烷基、链烯基、环烷基、或杂环;以及 $R_9C(O)O-$,其中 R_9 是卤素、氨基、取代的氨基、杂环、取代的杂环,或 $R_{10}-O-(CH_2)_m-$,其中 m 是一个1-10的整数并且 R_{10} 是烷基、苯基、取代的苯基、环烷基、取代的环烷基、杂环、或取代的杂环;或 R_2 与 R_3 一起或 R_3 与 R_4 一起形成取代的或未取代的亚甲二氧基、亚乙二氧基、或亚乙基氧基; R_6 是H或 OR' ,其中 R' 是烷基、链烯基、环烷基、卤烷基、或羟烷基。虽然未示出,但是就在以上结构中,具有对应于除了位置20的一个位置(例如位置10或11、等等)的羟基的类似物被包含在可能的活性剂内。

[0238] 一种示例性活性剂是伊立替康。



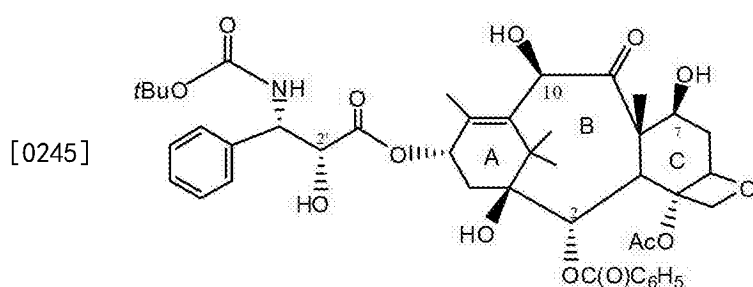
[0240] 伊立替康

[0241] 另一种示例性活性剂是7-乙基-10-羟基-喜树碱(SN-38),它的结构在以下示出。



[0243] 7-乙基-10-羟基-喜树碱

[0244] 仍然其他示例性种类的活性剂包括属于紫杉烷家族的分子的那些。来自这一种类的分子的一种示例性活性剂是多西他赛,其中在形成优选的多臂聚合物偶联物中,涉及在2'羟基的H:



[0246] 在此描述的聚合物试剂可以被共价地亦或非共价地附接到多个实体上,这些实体包括膜,化学分离和纯化表面,固相支持体,金属表面(例如金、钛、钽、铌、铝、钢、和它们的氧化物),氧化硅、大分子(例如蛋白、多肽、等等)、以及小分子。额外地,还可以在生化传感器、生物电子开关、和门中使用这些聚合物试剂。这些聚合物试剂还可以用于肽合成的、用于制备聚合物涂覆的表面和聚合物接枝的的载体、用来制备用于亲和分配的聚合物配体偶联物的、用来制备交联的或非交联的水凝胶的、以及用来制备用于生物反应器的聚合物辅因子加合物。

[0247] 任选地,该偶联物可以被提供为用于兽医的和用于人类医学的用途的一种药用组合物。这样的一种药用组合物通过将该偶联物与一种或多种药学上可接受的赋形剂,以及任选地任何其他治疗成分结合来制备。

[0248] 示例性的药学上可接受的赋形剂包括但不限于来自下组的那些,该组由以下各项组成:碳水化合物、无机盐类、抗微生物剂、抗氧化剂类、表面活性剂类、缓冲剂类、酸类、碱类以及它们的组合。

[0249] 一种碳水化合物,例如糖、衍生的糖(例如糖醇、醛糖酸)、酯化的糖、和/或糖聚合物可以作为一种赋形剂存在。具体的碳水化合物赋形剂包括,例如:单糖类,如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖、以及类似物;二糖类,例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖、以及类似物;多糖类,如棉白糖、松三糖、麦芽糊精、葡聚糖、淀粉、以及类似物;以及糖醇类,如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、吡喃糖基山梨糖醇(pyranosyl sorbitol)、肌醇、以及类似物。

[0250] 该赋形剂还可以包括无机盐或缓冲液,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、以及它们的组合。

[0251] 该组合物还可以包括一种抗微生物剂用于防止或阻止微生物生长。适合于本发明的一个或多个实施方案的抗微生物剂的非限制性的例子包括氯化苄烷铵、苄索氯铵、苯甲醇、西吡氯铵、三氯叔丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞、硫柳汞(thimersol)、以及它们的组合。

[0252] 在该组合物中还可以存在一种抗氧化剂。抗氧化剂类被用来防止氧化,由此防止该偶联物或该制剂的其他组分的变质。用于本发明的一个或多个实施方案的合适的抗氧化剂包括例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚、丁羟甲苯、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、以及它们的组合。

[0253] 一种表面活性剂可以作为一种赋形剂存在。示例性的表面活性剂包括:聚山梨酸酯类,如“吐温20”和“吐温80”;以及普流尼克,如F68和F88(二者都是从BASF(巴斯夫公司),橄榄山,新泽西可获得的);脱水山梨糖醇酯类;脂质,如磷脂如卵磷脂及其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(虽然优选不处于脂质体形式);脂肪酸和脂肪酸酯类;类固醇,如胆固醇;以及螯合剂,如EDTA、锌及其他这类适合的阳离子。

[0254] 酸或碱在该组合物中可以作为一种赋形剂存在。可以使用的酸的非限制性实例包括选自下组的那些酸,该组由以下各项组成:盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、马来酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸、以及它们的组合。适合的碱的例子包括但不限于选自下组的碱,该组由以下各项组成:氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、富马酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾,以及它们的组合。

[0255] 在该组合物中的偶联物的量(即在活性剂与聚合物试剂之间形成的偶联物)将取决于多个因素而改变,但是当该组合物储存在一个单位剂量容器(如一个药瓶)中时它最佳地是一个治疗上有效的剂量。另外,可以将该药物制剂装在一个注射器中。治疗上有效剂量可以通过重复给予渐增量的偶联物而实验性地确定,以便确定哪一个量产生临床上所希望的终点。

[0256] 在组合物中任何单独的赋形剂的量都将取决于该赋形剂的活性以及该组合物的具体需要而改变。典型地,任何单独的赋形剂的最佳量都是通过常规实验来确定的,即通过制备含有不同量的赋形剂(范围是从低至高)的组合物、检查稳定性以及其他参数、并且然后确定获得最佳性能而没有显著不良作用时所处的范围。

[0257] 然而,总体上该赋形剂将在该组合物中以按重量计约1%至约99%、优选按重量计从约5%至约98%,更优选按重量计从约15%至约95%的赋形剂的量存在,其中浓度最优选是小于按重量计30%。

[0258] 这些上述的药用赋形剂连同其他的赋形剂一起被描述于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy(药学的科学&实践)”,第19版,Williams & Williams公司,(1995),the “Physician’s Desk Reference(医生的案头参考)”,第52版,Medical Economics(医学经济学),Montvale(蒙特威尔),NJ(1998),以及Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients(药用赋形剂手册),第3版, American Pharmaceutical Association(美国药学会),华盛顿,2000。

[0259] 这些药学上可接受的组合物涵盖所有类型的配制品并且尤其是那些适于注射的类型,例如可以将其连同液体复原(reconstituted)的粉剂或冻干物(lyophilate)。适合的用于将固体组合物在注射之前进行复水的稀释剂的实例包括抑菌性注射用水、在水中的5%的右旋糖、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、盐水、无菌水、去离子水以及它们的组合。关于液

体药用组合物,溶液以及悬浮液是预想的。

[0260] 本发明的一个或多个实施方案的这些组合物典型地是(虽然不是必需)通过注射给药并且因此总体上在立即给药之前是液体溶液或悬浮液。该药物制剂还可以采取其他的形式,如糖浆、乳剂、软膏、片剂、粉剂、以及类似物。还包括其他给药模式,例如肺部、直肠、经皮、经粘膜、口腔、鞘内、皮下、动脉内等等。

[0261] 本发明还提供了向患有病症(对用偶联物治疗有反应)的患者给予如在此提供的偶联物的方法。该方法包括总体上经注射向患者给予一个治疗有效量的偶联物(优选作为一种药物组合物的部分来提供)。如以上所述,可以通过静脉注射,胃肠外地注射给予这些偶联物。用于肠胃外给药的适当的配制品类型包括:准备好的注射溶液、用于在使用前与一种溶剂组合的干粉、准备好的注射悬浮液、用于在使用前与一种载体组合的干燥的不溶的组合物、以及除了别的以外用于在给药前稀释的乳剂和液体浓缩物。

[0262] 给药的方法可以用来治疗通过给予该偶联物可以得到治疗或防止的任何病症。本领域的普通技术人员理解一种具体的偶联物可以有效地治疗的那些病症。有利的是,可以在另一个活性剂的给药之前、同时、或之后将该偶联物给予患者。

[0263] 待给予的实际剂量可以改变,这取决于受试者的年龄、重量以及总体病症,连同待处理的病症的严重程度,健康专家的判断、以及有待给予的偶联物。治疗有效量对于本领域普通技术人员是已知的和/或描述于相关的文件和文献中。总体来说,一个治疗上有效量的范围是从大约0.001mg至100mg,优选它的剂量是从0.01mg/天至75mg/天,并且更优选它的剂量是从0.10mg/天至50mg/天。一种给定的剂量可以是定期给予直到例如症状减轻和/或被完全消除。

[0264] 任何给出的偶联物的单位剂量(再次,优选地作为一种药物制剂的一部分来提供)可以按不同的给药方案来确定,这取决于临床医生的判断、病人的需要,等等。具体的给药方案对于本领域普通技术人员是已知的或可以使用常规的方法实验确定。示例性的给药方案包括(不限于):每日给药一次、每周三次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次、以及其任何组合。一旦达到临床终点,则停止该组合物的给药。

[0265] 给予在此描述的某些偶联物的一个优点在于:当一种水解地可降解的连接被包含在活性剂部分的残基与水溶性聚合物之间时,单独的水溶性聚合物部分可以裂开。在由于该聚合物的大小从体内清除是潜在的一个问题时,这样的一种结果是有利的。最佳地,通过使用生理学上可裂开的和/或酶可降解的连接(如酰胺、碳酸酯或含有酯的连接)有利于每一水溶性聚合物部分的裂解。以这种方式,可以通过选择该聚合物的分子大小以及将提供所希望的清除性质的官能团的类型而调整该偶联物的清除率(通过单独的水溶性聚合物部分的裂解)。本领域的普通技术人员可以确定聚合物的适当的分子大小以及可裂开的官能团。例如,本领域的普通技术人员使用常规实验可以通过对具有不同聚合物重量和可裂开的官能团的多种聚合物衍生物的第一次制备而确定一个适当的分子大小以及可裂开的官能团,然后,通过将该聚合物衍生物给予一位患者并且周期性进行血液和/或尿的取样来获得该清除率曲线(例如通过周期性血液或尿取样)。,一旦获得一系列的对于每种测试的偶联物的清除特征曲线,就可以鉴定出一种适合的偶联物。

[0266] 氢卤化物盐类-涉及活性剂的考虑,“D”

[0267] 在此描述的氢卤化物盐包括一种水溶性聚合物活性剂偶联物,优选是一种多臂聚

合物生物活性偶联物。以上描述了示例性水溶性聚合物。现在转到活性剂,该活性剂是一种小分子药物、寡肽、肽、或蛋白。在偶联至该水溶性聚合物上时,该活性剂含有至少一个碱性氮原子,例如胺基(即一种胺或未偶联到该水溶性聚合物上的其他碱性含氮基团)。在该氢卤化物盐中,该碱性氮原子是按作为氢卤化物盐的质子化的形式存在,也就是说,其中至少90摩尔百分比、或至少91摩尔百分比、或至少92摩尔百分比、或至少93摩尔百分比、或至少94摩尔百分比、或至少95摩尔百分比、更优选大于95摩尔百分比的在偶联物内的药物的碱性氮原子被质子化为HX形式。

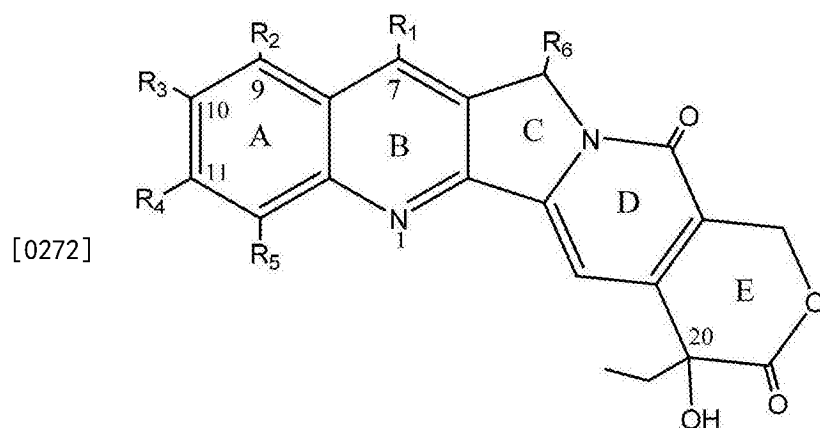
[0268] 含有至少一个胺基或适合提供如在此描述的混合酸式盐的碱性氮原子的活性剂包括但并不限于以下这些:阿霉素、 γ -氨基丁酸(GABA)、胺碘酮、阿米替林、阿奇霉素、苄非他明、溴苯那敏、卡比沙明、降钙素、苯丁酸氮芥、氯普鲁卡因、氯喹、氯苯那敏、冬眠灵、桂利嗪、克拉霉素、氯米芬、环苯扎林、环喷托酯、环磷酰胺、达卡巴嗪、道诺霉素、地美环素、狄布卡因、双环维林、二乙胺苯丙酮、地尔硫卓、茶苯海明、苯海拉明、吡二丙胺、多塞平、多西环素、多西拉敏、双噬达莫、EDTA、红霉素、氟西洋、甲紫、羟氯喹、丙米嗪、胰岛素、伊立替康、左醋美沙朵、利多卡因、洛沙平、氮芥、美法仑、美沙酮、左美丙嗪、甲氨蝶呤、甲氧氯普胺、米诺环素、萘替芬、尼卡地平、尼扎替丁、奥芬那君、氯化奥昔布宁、土霉素、酚苄明、酚妥拉明、普鲁卡因胺、普鲁卡因、普马嗪、普鲁米近、丙美卡因、丙氧卡因、右丙氧芬、雷尼替丁、它莫西芬、特比萘芬、丁卡因、四环素、曲马多、三氟丙嗪、三甲泼拉嗪、三甲氨基甲基、曲米帕明、曲吡那敏、醋竹桃霉素、酪胺、乌拉莫司汀、维拉帕米、以及加压素。

[0269] 额外的活性剂包括含有一个或多个含氮杂环的那些,例如阿伐斯汀、阿莫沙平、阿司咪唑、阿托品、阿奇霉素、贝那普利、苯扎托品、双环己丙醇、布比卡因、丁丙诺啡、丁螺环酮、布托啡诺、咖啡因、喜树碱和属于喜树碱家族的分子、头孢曲松、冬眠灵、环丙沙星、克拉屈滨、氯马斯汀、克林霉素、氯法齐明、氯氮平、可卡因、可待因、赛庚啶、去甲丙咪嗪、氢化麦角胺、地芬尼多、地芬诺酯、潘生丁、多沙普仑、麦角胺、泛昔洛韦、芬太尼、黄酮哌酯、氟达拉滨、氟奋乃静、氟伐他汀、更昔洛韦、格拉司琼、胍乙啶、氟派啶醇、后马托品、氢可酮、氢吗啡酮、羟嗪、莨菪碱、氧米帕明、伊曲康唑、酮咯酸、酮康唑、左卡巴斯汀、左吗南、林可霉素、洛美沙星、洛哌丁胺、氯沙坦、洛沙平、马吲哚、氯苯甲嗪、哌替啶、甲哌卡因、甲砒唑嗪、甲地嗪、乌洛托品、甲巯咪唑、左美丙嗪、美舍吉特、甲硝唑、米诺地尔、丝裂霉素c、吗茛酮、吗啡烷、奈法唑酮、纳布啡、萘啶酸、纳美芬、纳洛酮、纳曲酮、萘甲唑林、奈多罗米、尼古丁、诺氟沙星、氧氟沙星、昂丹司琼、羟考酮、羟吗啡酮、喷他佐辛、己酮可可碱、奋乃静、毒扁豆碱、毛果芸香碱、匹莫齐特、丙吗卡因、哌嗪嗪、丙氯拉嗪、丙嗪、普鲁米近、奎尼丁、奎宁、蛇根木生物碱类、维生素b2、利福布汀、利哌利酮、罗库铵、天仙子碱、舒芬太尼、他克林、特拉唑嗪、特康唑、特非那定、硫利达嗪、替沃噻吨、噻氯匹定、噻吗洛尔、妥拉磺脲、托美丁、曲唑酮、硫乙拉嗪、三氟丙嗪、苯海索、异丁嗪、曲米帕明、筒箭毒碱、维库溴铵、阿糖腺苷、长春碱、长春新碱和长春瑞宾。

[0270] 额外的活性剂包括含有一个芳环氮的那些,例如乙酰唑胺、阿伐斯汀、阿昔洛韦、磷酸腺苷、别嘌醇、阿普唑仑、氯氮平、氨吡酮、阿可乐定、阿扎他定、氨曲南、比沙可啶、博来霉素、溴苯那敏、丁螺环酮、布康唑、喜树碱和喜树碱家族内的分子、卡比沙明、头孢孟多、头孢唑林、头孢克肟、头孢美唑、头孢尼西、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢替坦、头孢泊肟、头孢曲松、头孢匹林、氯喹、氯苯那敏、西咪替丁、克拉屈滨、克霉唑、氯唑西林、去羟肌苷、潘生丁、

多沙唑嗪、多西拉敏、益康唑、依诺沙星、艾司唑仑、乙硫异烟胺、泛昔洛韦、法莫替丁、氟康唑、氟达拉滨、叶酸、更昔洛韦、羟氯喹、双碘喹啉、异烟肼、伊曲康唑、酮康唑、拉莫三嗪、兰索拉唑、氯雷他定、氯沙坦、甲苯达唑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲硝唑、咪康唑、咪达唑仑、米诺地尔、奈法唑酮、萘啶酸、烟酸、尼古丁、尼扎替丁、奥美拉唑、噁丙嗪、奥昔康唑、罂粟碱、喷司他丁、非那吡啶、毛果芸香碱、吡罗昔康、哌唑嗪、伯氨喹、吡嗪酰胺、乙胺嘧啶、吡哆素、奎尼丁、奎宁、利巴韦林、利福平、磺胺嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺甲噁唑、柳氮磺吡啶、磺胺异恶唑、特拉唑嗪、噻苯达唑、硫胺素、硫鸟嘌呤、噻吗洛尔、曲唑酮、氨苯蝶啶、三唑啉、三甲双酮、甲氧苄啶、三甲曲沙、曲吡那敏、托品酰胺、和阿糖腺苷。

[0271] 优选的活性剂是属于喜树碱家族的分子之一。例如,活性剂可以具有以下通用结构:

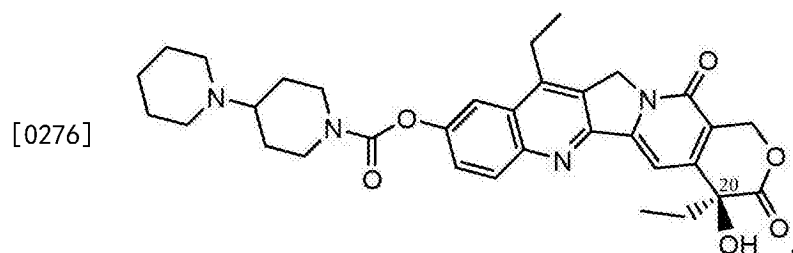


II

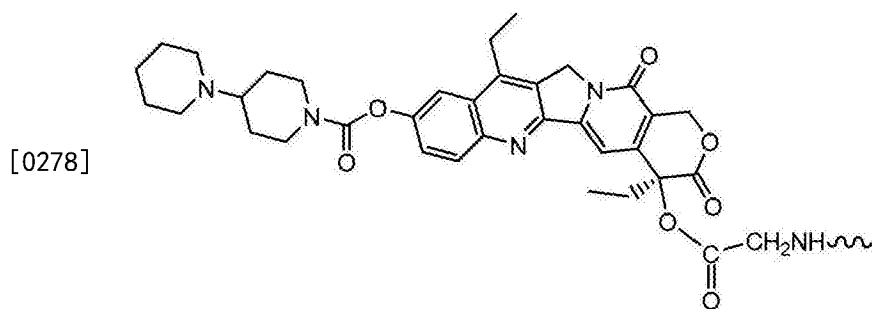
[0273] 其中R₁-R₅是各自独立地选自下组,该组的组成为:氢;卤素;酰基;烷基(例如,C1-C6烷基);取代的烷基;烷氧基(例如,C1-C6烷氧基);取代的烷氧基;链烯基;炔基;环烷基;羟基;氰基;硝基;叠氮基;酰氨基;肼;氨基;取代的氨基(例如,单烷基氨基和二烷基氨基);羰基羰基;烷氧基羰基;烷基羰基氧基;烷基羰基氨基;氨基甲酰基烷氧基;芳基磺酰基氧基;烷基磺酰基氧基;-C(R₇)=N-(O)_i-R₈,其中R₇是H、烷基、链烯基、环烷基、或芳基,i是0或1,并且R₈是H、烷基、链烯基、环烷基、或杂环;以及R₉C(O)O-,其中R₉是卤素、氨基、取代的氨基、杂环、取代的杂环,或R₁₀-O-(CH₂)_m-,其中m是一个1-10的整数并且R₁₀是烷基、苯基、取代的苯基、环烷基、取代的环烷基、杂环、或取代的杂环;或R₂与R₃一起或R₃与R₄一起形成取代的或未取代的亚甲二氧基、亚乙二氧基、或亚乙基氧基;R₆是H或OR',其中R'是烷基、链烯基、环烷基、卤烷基、或羟烷基。

[0274] 关于以上结构,虽然未示出,但是具有在除了位置20(例如位置10或11、等)处的羟基的类似物是类似地优选的。

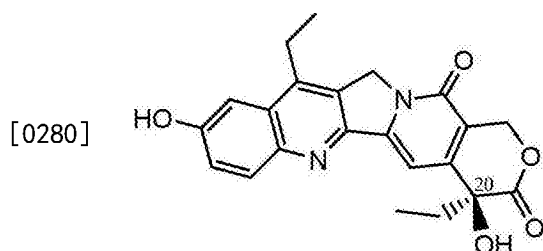
[0275] 在一个具体实施方案中,活性剂是伊立替康(结构就在以下示出)。



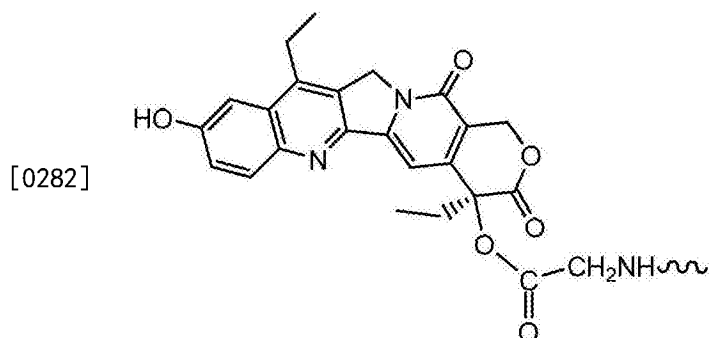
[0277] 在另一实施方案中,活性剂是具有在20-羟基位置处的一个甘氨酸连接物的伊立替康(结构就在以下示出),



[0279] 仍在另一个具体实施方案中,该活性剂是7-乙基-10-羟基-喜树碱(SN-38)、伊立替康的代谢物,它们的结构在以下示出。



[0281] 在一个实施方案中,活性剂,SN-38到多臂聚合物核心上的共价附接类似地在20-羟基位置发生,任选地经由一个中间连接物,例如甘氨酸,如以下所示。

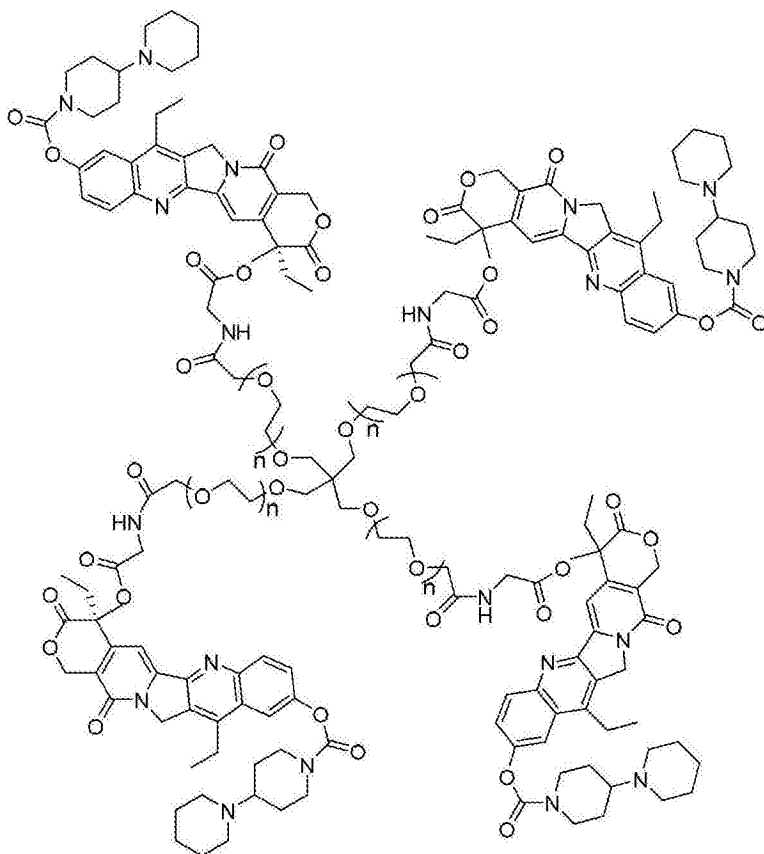


[0283] 氢卤化物盐类-涉及这些偶联物的考虑

[0284] 水溶性聚合物和活性剂的说明性偶联物可以具有任何以上描述的多个结构特征。也就是说,该偶联物可以具有一个直链的结构,即具有共价地附接到其上的一个或两个活性剂分子,典型地分别在该聚合物末端或终端。可替代地,该偶联物可以具有叉状的、分支的或多臂的结构。优选地,该偶联物是一种多臂聚合物偶联物。

[0285] 一个说明性多臂聚合物偶联物对应于以下结构:

[0286]



[0287] 以上结构在此被以速记方式称为“4-臂-PEG-Gly-Irino”(4-臂-季戊四醇基-PEG-羧甲基甘氨酸伊立替康)；一个更完整的名字对应于“季戊四醇基-4-臂-(PEG-1-亚甲基-2-氧代-乙烯基氨基乙酸酯连接的伊立替康)”。以上只以中性形式示出了偶联物的活性剂部分中的碱性氨基和/或氮基团，同时应理解，偶联物具有如在此详细描述氢卤化物盐(HX)的特征。如从以上结构中可见，羧甲基改性的4-臂季戊四醇基PEG试剂具有介于聚合物部分和活性剂伊立替康之间的一个甘氨酸连接物。

[0288] 典型地，虽然并非必要地，聚合物臂的数目将对应于共价地附接到该水溶性聚合物核心上的活性剂分子的数目。也就是说，在聚合物试剂具有某一数目的聚合物臂(例如对应变量“q”)的情况下，每一个在它的末端都具有反应性官能团(例如羧基、活化的酯(例如琥珀酰亚胺基酯、苯并三唑基碳酸酯、等等))，在对应的偶联物中，可以共价地附接到其上的活性剂(例如伊立替康)的最优化的个数最希望地是“q”。也就是说，最优化的偶联物被认为具有1.00(q)(或100%)的载药值。在一个优选实施方案中，该多臂聚合物偶联物的特征是0.90(q)(或90%)或更大的载药程度。优选的载药满足一个或多个以下条件：0.92(q)或更大；0.93(q)或更大；0.94(q)或更大；0.95(q)或更大；0.96(q)或更大；0.97(q)或更大；0.98(q)或更大；以及0.99(q)或更大。最优选地，该多臂聚合物偶联物的载药是百分之百。包括多臂水溶性聚合物偶联物氢卤化物盐的组合物可以包括分子偶联物的混合物，这些分子偶联物具有附接到该聚合物核心上的一种活性剂，具有附接到该聚合物核心上的两个活性剂分子，具有附接到聚合物核心上的三个活性剂，等等，直至并且包括具有附接到聚合物核心上的“q”个活性剂的偶联物。生成的组合物将具有一个总体载药值，是对包含在组合物中的偶联物种类的平均。理想地，该组合物将包括主要(例如大于50%、但是更优选大于60%、仍更优选大于70%、仍更优选大于80%、并且最优选大于90%)的满载药物的聚合物偶联物(即“q”

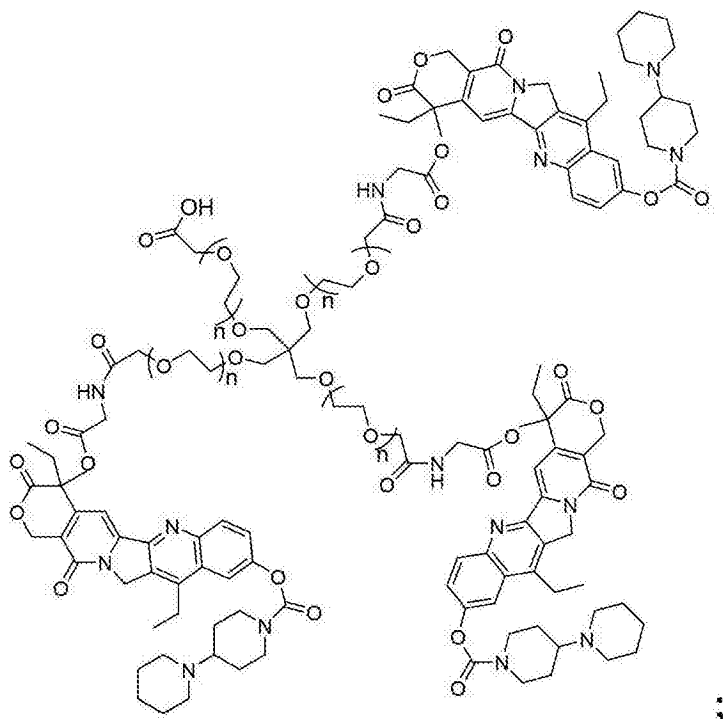
个臂具有“q”个活性剂分子,每个臂具有一个单个的活性剂分子)。

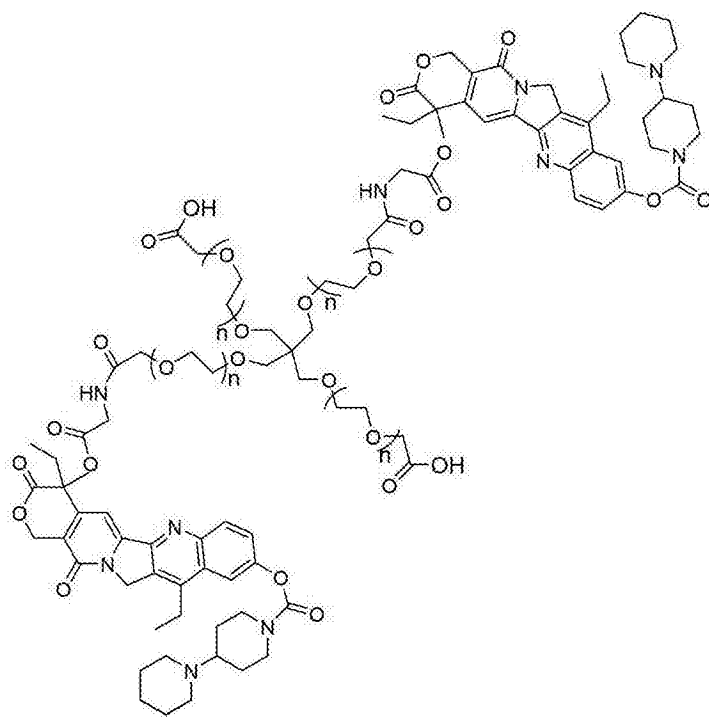
[0289] 作为一个例证,在该多臂聚合物偶联物含有四个聚合物臂的实例中,每个多臂聚合物的共价附接药物分子的数目的理想化值是四,并且关于在这样的偶联物的组合物的背景下描述的平均数,将存在加载到该多臂聚合物上的药物分子的一个值(即百分比),该值的范围是该理想值的约90%至约100%。也就是说,共价地附接到给定的四臂聚合物上的药物分子(作为部分的四臂聚合物组合物)的平均数目典型地是满载值的90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、和100%。这对应于每个多臂聚合物偶联物的D的平均数(范围是从约3.60至4.0)。

[0290] 仍在另一个实施方案中,对于一种多臂聚合物偶联物组合物,例如其中聚合物臂的数目范围是从约3至约8,多数(例如大于50%、但是更优选大于60%、仍更优选大于70%、仍更优选大于80%、并且最优选大于90%)的存在于组合物中的种类是具有一个理想化数目(“q”)的附接至该聚合物核心上的药物分子的那些亦或具有(“q”)及(“q-1”)个附接至该聚合物核心上药物分子的一种组合的那些。

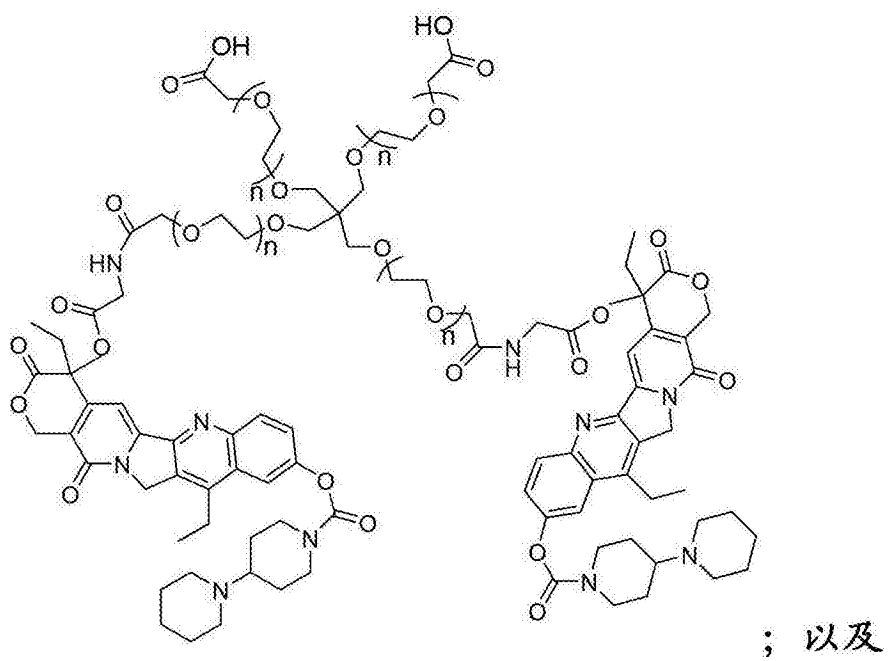
[0291] 根据以上内容,除了药物满载结构(例如具有共价附接到四个聚合物臂中的每一个的甘氨酸改性的伊立替康分子),氢卤化物盐(以及含有它们的组合物)可以包括任何一个或多个以下结构:

[0292]

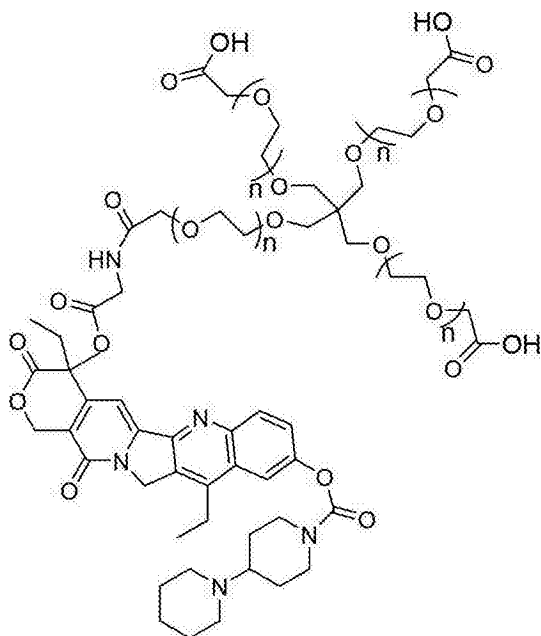




[0293]



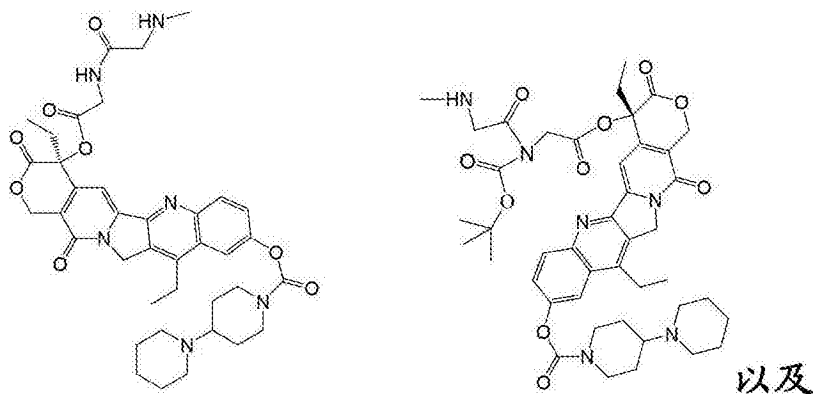
[0294]



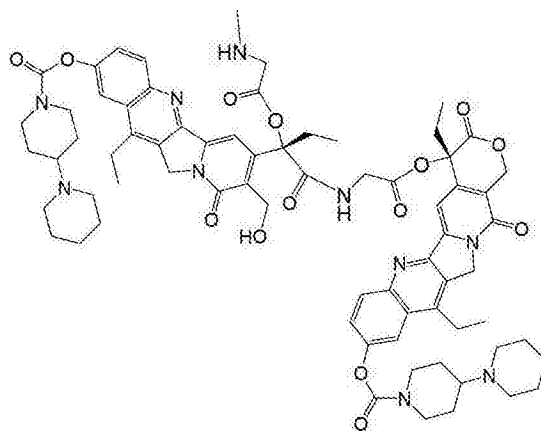
[0295] 对于以上示出的、具有一个羧酸的给定的聚合物臂末端(并且因此并未共价地附接到一种活性剂,例如伊立替康上),从4-臂-PEG-CM(“CM”= $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$)的臂延伸的其他可

能的末端包括: $-\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{N}(\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2)$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OCH}_3$ 、

[0296]



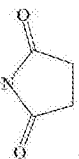
[0297]



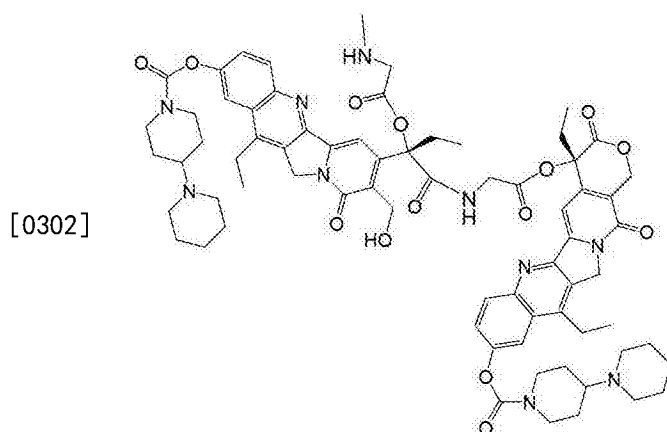
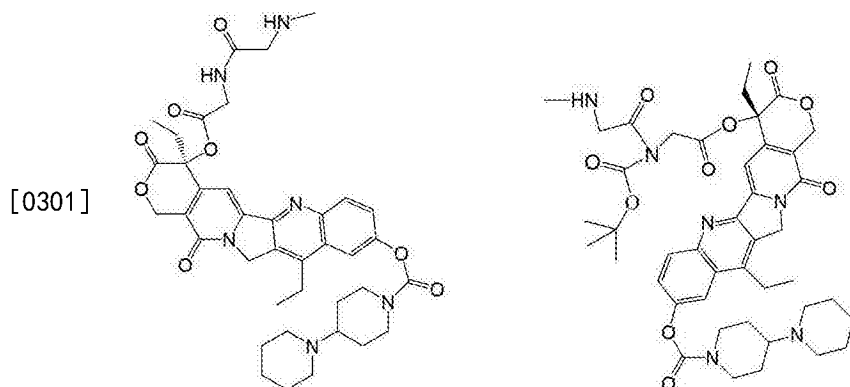
[0298] 例如在此提供了包括多个4-臂季戊四醇基-丁二醇-羧甲基偶联物的一种组合物,其中在该组合物中至少90%的偶联物(i)具有以下化学式所涵盖的一个结构:

[0299] $C-[CH_2-O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2-C(O)-TERM]_4$,

[0300] 其中n,在每一实例中,是具有从20至约500、或者从40至约500的值的一个整数;并

且TERM,在每一实例中,选自下组,该组由以下各项组成: -OH、-OCH₃、 -NH-CH₂-C

(O)-OH, -NH-CH₂-C(O)-OCH₃、



[0303] 以及-NH-CH₂-C(O)-O-Irino(“GLY-Irino”),其中Irino是伊立替康的一个残基;并且

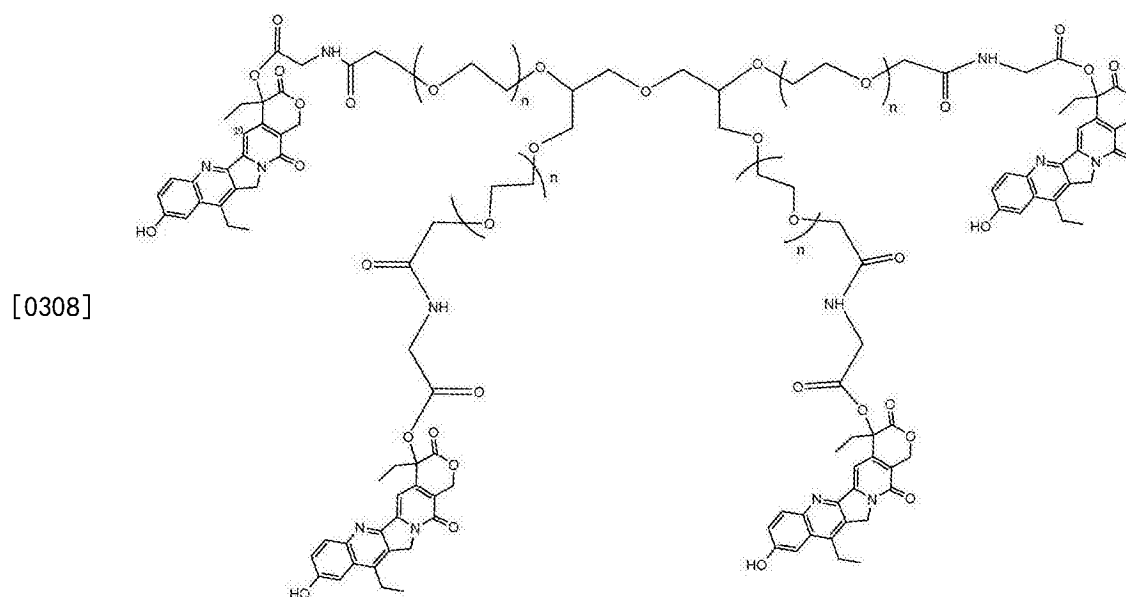
[0304] (ii)对于在该组合物中至少90%的四-臂偶联物中的每一个Term,它的至少90%是-NH-CH₂-C(O)-O-Irino,并且(iii)在该组合物中至少90%的NH-CH₂-C(O)-O-伊立替康部分中,至少90摩尔百分比的伊立替康的碱性氮原子被质子化为氢卤化物形式,例如盐酸盐。优选地,在该组合物中至少90%的NH-CH₂-C(O)-O-伊立替康部分中,至少91摩尔百分比、或至少92摩尔百分比、或至少93摩尔百分比、或至少94摩尔百分比或95摩尔百分比或大于95摩尔百分比的伊立替康碱性氮原子被质子化为氢卤化物形式,其中可以通过离子色谱确定氢卤化物含量。

[0305] 在此提供的多臂聚合物偶联物组合物旨在涵盖包括在这样的组合物中的偶联物的任何的和所有的立体异构形式。在偶联物的一个具体的实施方案中,在处于偶联形式(例如在4-臂-PEG-Gly-Irino的组合物中)时,在伊立替康的C-20的立体化学保持完整,即在处于其偶联形式时,C-20保持它的(S)-构型。参见例如实例4。

[0306] 一个优选的多臂结构是具有介于在每一个臂中的聚合物部分与该活性剂之间的一个甘氨酸连接物的、羧甲基改性的4-臂季戊四醇基PEG(以上示出了聚合物部分和连接

物),其中该活性剂是7-乙基-10-羟基-喜树碱。再一次,在此包括多个实施方案,其中该多臂聚合物是(i)满载的,连同具有(ii)三个共价地附接到其上的7-乙基-10-羟基-喜树碱分子,(iii)两个共价地附接到其上的7-乙基-10-羟基-喜树碱分子,以及(iv)一个共价地附接到四臂聚合物核心的7-乙基-10-羟基-喜树碱分子。典型的载药如以上所述。

[0307] 仍另一个代表性多臂偶联物结构是具有共价地附接到聚合物核心上的7-乙基-10-羟基-喜树碱(SN-38)的、羧甲基改性的4-臂甘油二聚体(3,3'-氧基二丙烷-1,2-二醇)PEG。在此包括以下实施方案,其中该多臂聚合物核心是满载药物的(即具有共价地附接到其上的四个7-乙基-10-羟基-喜树碱分子),或者小于满载(即具有共价地附接到其上的一个、两个、或三个7-乙基-10-羟基-喜树碱分子)。以下示出了这些具有共价地附接到每一个聚合物臂上的药物(即7-乙基-10-羟基-喜树碱)的偶联物。



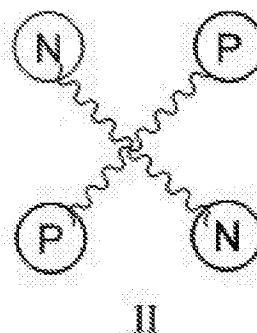
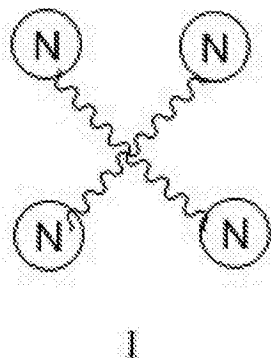
[0309] 仍在另一个示例性实施方案中,该偶联物是一个多臂结构,该结构包括具有共价地附接到聚合物核心上的伊立替康分子的、羧甲基改性的4-臂甘油二聚体(3,3'-氧基二丙烷-1,2-二醇)PEG。在此包括以下实施方案,其中该多臂聚合物核心是满载药物的(即具有共价地附接到其上的四个伊立替康分子),或者小于满载的(即具有共价地附接到其上的一个、两个、或三个伊立替康分子)。

[0310] 氢卤化物盐类的参数

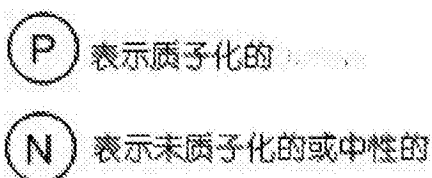
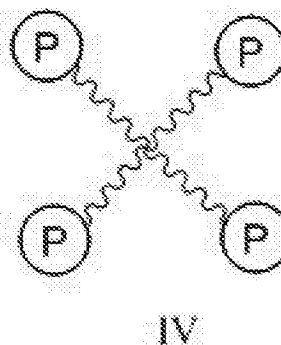
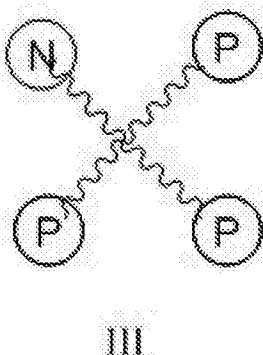
[0311] 主题组合物是氢卤化物盐,典型地是盐酸盐。也就是说,偶联物(例如上述那些)被提供在组合物中,这样在该偶联物(连同本体组合物)中,至少90%的碱性氮原子以质子化的形式(即作为氢卤化物盐)存在。这些氢卤化物盐组合物稳定并且可重复地制备。

[0312] 在它的本体或宏观特性方面对如在此提供氢卤化物盐进行表征。也就是说,偶联物中的碱性氮原子(即氨基)几乎全部以质子化的形式存在。在基于本体特性表征本发明的这些组合物时,不同的单独的分子种类被典型地包含在本体组合物内。采用实例6中描述的示例性4-臂聚合物偶联物,4-臂-PEG-Gly-Irino-20K盐酸盐,该盐产物含有的多种单独分子种类中的任一种,虽然总体上至少90%被质子化为氢卤化物盐。一个分子种类是这样一种分子,其中每一个聚合物臂含有一个处于中性形式的伊立替康分子,即它的氨基是未质子化的。参见以下结构I。另一种分子种类是这样一种分子,其中每一个聚合物臂含有一个

处于质子化的形式的伊立替康分子。参见以下结构IV。一个额外的分子种类是这样一种分子,其中三个聚合物臂含有处于质子化的形式的伊立替康分子,并且一个聚合物臂含有处于中性形式的伊立替康分子(结构III)。在仍另一个分子种类中,四个聚合物臂中的两个含有处于中性形式的伊立替康分子(即它的氨基是未质子化的),并且四个聚合物臂中的两个含有处于质子化的形式的伊立替康分子(结构II)。



[0313]



[0314] 如实例1中中证明的那样,某些聚合物前药偶联物可以作为盐酸和三氟乙酸这二者的混合酸式盐被获得。在实例1中,通过使用酸式盐形式的活性剂分子引入盐酸以形成所生成的聚合物偶联物,同时在脱保护步骤将三氟乙酸引入该反应混合物中。在该活性剂(或如实例1中说明的改性的活性剂)共价附接到水溶性聚合物试剂上,并且用碱处理,甚至在其中进行额外的纯化步骤的实例中之后,生成的偶联物作为一种部分的混合酸式盐被获得。

[0315] 混合酸式盐偶联物总体上含有定义的比例和范围的每一组分(即游离碱、无机酸式盐、有机酸式盐)。观察到最终偶联物产物中对水解的增加的稳定性和增加的盐的摩尔百分数之间的正相关。基于图中的斜率,可以确定随着游离碱含量增加,产物稳定性减小。

[0316] 图2进一步说明了关于对具有更大程度的质子化的胺基(即酸式盐),水解降解更大的稳定性(或耐受性)。例如,观察到与对应的富含酸式盐的产物相比,含有14摩尔百分比

或更多的游离碱的偶联物产物对水解显著地更不稳定。

[0317] 额外地,如在图3中说明的那样,在加速应力条件下,与含有可测量的量的游离碱的混盐形式相比,富含盐酸盐的产物似乎更稍微更容易地裂解聚(乙二醇)骨架,虽然在最终组合物中的缓冲可以有效地减轻该特征或倾向。

[0318] 这些集合的结果表明,聚(乙二醇)-活性剂偶联物(例如4-臂-PEG-Gly-Irino-20K)的氢卤化物盐超过单独使用游离碱的出人意料的优点。

[0319] 氢卤化物盐类-用于形成的方法

[0320] 在形成并且表征该混合酸式盐时,设计了一种方法以合成全氢卤化物盐,即如在实例6中提供的那样,该盐具有至少90%的伊立替康的碱性氮原子被质子化成氢卤化物盐的形式。鉴于在此呈现的指导,结合在本化学合成领域已知内容,可以从可商购的起始材料制备一种水溶性聚合物偶联物的酸式盐。

[0321] 从多个如以上所述的商业来源可获得直链的、分支的、和多臂的水溶性聚合物试剂。可替代地,可以如在此所述,合成地制备PEG试剂,例如多臂反应性PEG聚合物。参见例如在此的实例7。

[0322] 可以使用将活化的聚合物(例如一种活化的PEG)共价附接到生物学活性剂的已知化学偶合技术来形成该酸式盐(参见例如POLY(ETHYLENEGLYCOL)CHEMISTRY AND BIOLOGICAL APPLICATIONS(聚(乙二醇)化学和生物应用),American Chemical Society(美国化学会),华盛顿(1997;以及美国专利公开号2009/0074704和2006/0239960)。为了达到根据本发明的混合酸式盐而对合适的官能团、连接物、保护基以及类似物的选择将部分地取决于该活性剂上的官能团以及该聚合物起始材料,并且本领域的技术人员基于本披露的内容对此将是清楚的。鉴于该酸式盐的某些特征,该方法包括以无机酸加成盐的形式提供含胺(或其他碱性氮)的活性剂,以及一个无机酸处理步骤。在合成方法的背景中提及“活性剂”,是指涵盖任选地改性以具有共价地附接到其上的连接物的活性剂,以有助于促进到水溶性聚合物上的附接。

[0323] 总体上,该方法包括以下步骤:(i)通过用摩尔过量的氢卤酸处理,使处于保护形式的含胺(或其他碱性氮)活性剂的无机酸(氢卤酸)盐(例如保护形式的甘氨酸-伊立替康氢卤化物)脱保护,以形成一种脱保护的酸式盐,例如甘氨酸-伊立替康氢卤化物,(ii)在碱存在下,将步骤(i)的脱保护的无机酸式盐与水溶性聚合物试剂(例如4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-琥珀酰亚胺(或化学当量的活化的酯或类似物))偶合,以形成一种聚合物-活性剂偶联物,例如4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐(也称为季戊四醇基-4-臂-(PEG-1-亚甲基-2-氧代-乙烯基氨基乙酸酯连接的伊立替康氢卤化物盐),并且(iii)通过沉淀回收该聚合物-活性剂偶联物,4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-伊立替康氢卤化物盐。

[0324] 生成的聚合物-活性剂偶联物组合物特征在于具有至少90%摩尔百分比的质子化为氢卤化物盐形式的偶联物的活性剂的碱性氨基(例如伊立替康的碱性氨基)。总体上,通过离子色谱法确定在产物中的氢卤化物基团的摩尔百分数。

[0325] 现在转到优选的种类的活性剂(喜树碱)之一中,因为喜树碱家族内的化合物的20-羟基是空间位阻的,单步结合反应难以达到显著的产率。作为结果,优选的方法是使生物活性起始材料(例如盐酸依立替康)的20-羟基与携带适合与水溶性聚合物反应的官能团

的短连接物或间隔基部分进行反应。这样的一种方法适用于很多小分子,特别是具有一个难以共价附接到一种引入的反应性聚合物的位点的那些。用于与羟基反应以形成酯键的优选的连接物包括t-BOC-甘氨酸或其他氨基酸,例如具有一个保护的氨基和一个可用的羧酸基团的丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、和缬氨酸(参见Zalipsky等人,“Attachment of Drugs to Polyethylene Glycols(药物到聚乙二醇的附接)”,Eur. Polym. J. (欧洲聚合物杂志),19卷,12期,1177-1183页,(1983))。还可以在上述氨基酸的地方使用其他间隔基或连接物部分,这些部分具有一个可用的羧酸基团或与羟基反应的其他官能团并且具有一个受保护保护的氨基。

[0326] 典型的不稳定的保护基(例如用于保护甘氨酸氨基)包括t-BOC和FMOC(9-芴甲氧羰基)。t-BOC在室温下是稳定的,并且易于用三氟乙酸和二氯甲烷的稀释溶液除去。它还可以通过用酸(例如无机酸,氢卤酸)处理来除去。FMOC是易于用胺类的浓溶液(通常是N-甲基吡咯烷酮中的20%-55%的哌啶)除去的碱不稳定的保护基。

[0327] 在实例6中,针对4-臂-PEG20K-伊立替康盐酸盐的制备,N-保护的甘氨酸的羧基在偶合剂(例如二环己基碳二亚胺(DCC))和碱催化剂(例如二甲基氨基吡啶(DMAP)或其他适合的碱)存在下,与盐酸依立替康(或其他适合的喜树碱,例如7-乙基-10-羟基-喜树碱,或任何其他活性剂)的20-羟基反应,以提供N-保护的连接物改性的活性剂,例如t-Boc-甘氨酸-伊立替康盐酸盐。虽然示例了盐酸盐,但是也可以使用其他无机酸盐。优选地,在惰性的、干燥的气氛下进行每一反应步骤。

[0328] 在一个随后的步骤中,通过在适合的反应条件下用盐酸(或另一种氢卤酸)处理,来除去氨基保护基,t-BOC(N-叔丁氧基羰基)。这不同于混合酸式盐的制备,其中如在实例1中,通过用三氟乙酸盐处理来除去t-BOC。生成的脱保护的中间体是连接物改性的活性剂,例如20-甘氨酸-伊立替康盐酸盐。在实例6中描述了说明性反应条件,并且可以由本领域的技术人员通过常规优化来进一步优化。总体上使用摩尔过量的酸来除去保护基。优选地,用十倍或更大摩尔过量的氢卤酸处理该受保护的甘氨酸-伊立替康以除去保护基。在一些情况下去,可以使用10倍至25倍的摩尔过量。典型地,例如通过沉淀,从反应混合物回收所生成的脱保护的药物盐。作为一个实例,可以采用甲基叔丁基醚(MTBE)的添加来沉淀中间体。然后例如通过过滤分离中间体产物,并且干燥。

[0329] 然后在碱(例如DMAP、三甲胺、三乙胺、等)存在下,将脱保护的活性剂(任选地被连接物改性)(例如20-甘氨酸-伊立替康HCl)偶合到所希望的聚合物试剂(例如4-臂季戊四醇基-PEG-琥珀酰亚胺(或任何其他类似的地活化的酯对应物上,其性质已经在前面描述过)),以形成所希望的偶联物。可以在过量的碱(例如约1.1至约3.0倍摩尔过量)存在下,进行该偶联步骤。偶合反应的反应产率典型地交高,大于约90%。

[0330] 例如通过用醚(例如甲基叔丁基醚、乙醚)或其他适合的溶剂沉淀来回收该酸式盐偶联物。为了确保形成全氢卤化物盐(即至少90摩尔百分比的氢卤化物盐),例如通过离子色谱分析粗产物,以确定卤化物含量。如果氢卤化物含量小于所希望值,例如小于90摩尔百分比,或小于91、92、93、94、或95摩尔百分比,那么在适合的溶剂(例如乙酸乙酯或类似物)中溶解该偶联物酸式盐,并且用额外的氢卤酸处理。然后如以上所述回收该产物。

[0331] 可以通过任何适合的方法进一步纯化该酸式盐产物。纯化以及分离方法包括沉淀、之后是过滤以及干燥,连同色谱法。合适的色谱方法包括凝胶过滤色谱法、离子交换色

谱法以及Biotage快速色谱法。另一种纯化方法是重结晶。例如,将该部分酸式盐溶解在适合的一种单一或混合溶剂系统(例如异丙醇/甲醇)中,并且然后允许结晶。可以多次进行重结晶,并且还可以用一种适合的溶剂(其中它们是不溶或只是微溶)(例如甲基叔丁基醚或甲基叔丁基醚/甲醇)来洗涤晶体。可以任选地进一步空气或真空干燥纯化的产物。

[0332] 优选地,在适合保护产物避免暴露于氧、湿气、和光中的任何一种或多种的条件下储存该酸式盐产物。可以在储存期间使用任何的多个储存条件或包装方案来适当地保护该酸式盐产物。在一个实施方案中,通过在一个或多个聚乙烯袋中的安置,在惰性气氛(例如氩气或氮气)下包装产物,并且安置在铝内衬聚酯可热封袋中。

[0333] 在实例6中提供了代表性摩尔百分比的盐酸盐。如那里所述,4-臂-季戊四醇基-聚乙二醇-羧甲基-甘氨酸-依立替康盐酸盐被制备为全盐酸盐,即含有近99摩尔百分比的氯化物。

[0334] 氢卤化物盐类-含有氢卤化物盐偶联物的药用组合物

[0335] 酸式盐可以是处于用于兽医的亦或用于人类医学的用途的药用配制品或组合物形式存在。说明性配制品将典型地包括与一种或多种药学上可接受的载体、以及任选地任何其他治疗成分、稳定剂、或类似物结合的该酸式盐。该一种或多种载体必须是在药学上可接受的意义是与该配制品的其他成分是相容的并且没有不适当地有害于受体/患者。氢卤酸盐任选地按本体形式或以单位剂型包含在容器或器皿中,该容器或器皿包括保护产物不暴露于湿气和氧的包装。

[0336] 该药用组合物可以包括聚合物赋形剂/添加剂或载体,例如聚乙烯吡咯酮、衍生的纤维素如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、以及羟丙基甲基纤维素、Ficolls(一种聚合物糖)、羟乙基淀粉(HES)、葡萄糖结合剂(例如,环糊精,如2-羟丙基- β -环糊精以及磺丁基醚- β -环糊精)、聚乙二醇、以及果胶。这些组合物可以进一步包括稀释剂、缓冲剂、粘合剂、崩解剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂(包括抗氧化剂)、调味剂、掩味剂、无机盐(例如氯化钠)、抗微生物剂(例如氯化苄烷铵)、增甜剂、防静电剂、表面活性剂(例如聚山梨醇酯如“吐温20”以及“吐温80”、以及普流尼克如从BASF可得的F68和F88、脱水山梨糖醇酯、类脂(例如磷脂,如卵磷脂以及其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、脂肪酸以及脂肪酸酯、类固醇(例如胆固醇)、以及螯合剂(例如EDTA、锌以及其他合适的阳离子)。其他适合用在根据本发明的组合物中的药用赋形剂和/或添加剂在以下文件中列出:“Remington:The Science &Practice of Pharmacy(药学的科学&实践)”,第19版,Williams &Williams公司,(1995),the “Physician’s Desk Reference(医生的案头参考)”,第52版,Medical Economics(医学经济学),Montvale(蒙特威尔),NJ(1998),以及在“Handbook of Pharmaceutical Excipients(药用赋形剂手册)”中,第3版,A.H.Kibbe编辑,英国医药出版社,2000。

[0337] 该酸式盐可以配制成适合于口服、直肠、局部、鼻腔、眼部、或肠胃外(包括腹腔注射、静脉注射、皮下注射、或肌肉注射)给药的组合物。该酸式盐组合物可以方便地以单位剂量的形式呈现并且可以通过药学领域熟知的任何方法来制备。所有的方法包括将该酸式盐带入与一种载体缔合的步骤,该载体构成一种或多种辅助成分。

[0338] 在一个具体实施方案中,以用于通过注射使用的无菌一次性药瓶中的冻干形式提供该酸式盐,例如4-臂-PEG-Gly-Irino-20K氢卤化物。在一个实施方案中,包含在一次性药瓶中的偶联物产物的量等价于100mg剂量的伊立替康。更具体地,冻干组合物包括与在

pH3.5的乳酸盐缓冲剂结合的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K氢卤化物盐。也就是说,通过结合4-臂-PEG-Gly-Irino-20K氢卤化物(例如以等价于100mg剂量的伊立替康)与约90mg的乳酸,,并且通过添加酸亦或碱来调整溶液的pH至3.5,由此制备冻干组合物。然后将生成的溶液在无菌条件下冻干,并且在使用前,在-20°C下储存所生成的粉末。在静脉输注以前,使冻干组合物结合一种葡萄糖溶液,例如5%(w/w)的葡萄糖溶液。

[0339] 该酸式盐(即活性剂)在配制品中的量取决于所使用的具体的活性剂、它的活性、该偶联物的分子量、以及其他因素(如剂型、目标患者群体以及其他的考虑)而变化,并且总体上将由本领域的一个技术人员容易地进行确定。在该配制品中的偶联物的量将是这样一个量,该量对于将一个治疗有效量的化合物(例如生物碱抗癌剂(例如伊立替康或SN-38))递送至一位对其有需要的患者以便实现至少与该化合物相关的多种治疗效果之一(例如,对于癌症的治疗)是必需的。在实践中,这将取决于具体的偶联物、它的活性、有待治疗的病症的严重性、该患者群体、该配制品的稳定性等等而在很大程度上变化。这些组合物将总体上包含从按重量计约1%至按重量计约99%中任一数值的偶联物,典型地从按重量计约2%至约95%的偶联物,并且更典型地是从按重量计约5%至85%的偶联物,并且还取决于在该组合物中所包含的赋形剂/添加剂的相对量值。更确切地说,该组合物典型地包括以下百分比中至少约一项的偶联物:按重量计2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多。

[0340] 适合于经口给药的组合物可以按以下形式提供:作为不连续的单元,例如胶囊、扁囊剂、片剂、锭剂以及类似物,其中各自含有预定量的作为一种粉末或颗粒的该偶联物;或是在一种水性液体或非水性液体中的悬浮液,例如糖浆、酏剂、乳剂、顿服水剂、以及类似物。

[0341] 适合于肠胃外给药的配制品适宜地包括该药物前体偶联物的一种无菌水性制剂,它可以被配制为与接受者的血液是等渗的。

[0342] 鼻喷雾配制品包括该多臂聚合物偶联物的带有防腐剂以及等渗剂的纯化过的水溶液。此类配制品优选被调节到与鼻黏膜相容的pH以及等渗状态。

[0343] 用于直肠给药的配制品可以作为带有一种合适载体(例如可可豆油或氢化的脂肪或脂肪酸)的一种栓剂存在。

[0344] 眼睛用的配制品是通过一种类似于鼻喷雾的方法制备的,除了将pH以及等渗因素优选地调节至与眼睛的相配。

[0345] 局部用的配制品包括溶解或悬浮于一种或多种介质(例如矿物油、石油、多羟基醇或其他用于局部用配制品的碱)中的该多臂聚合物偶联物。加入以上所指出的其他配合剂可能是希望的。

[0346] 还提供了适合作为气溶胶通过例如吸入法进行给药的药物配制品。这些配制品包括该希望的多臂聚合物偶联物或其盐的一种溶液或悬浮液。这种希望的配制品可以置于一个小室中并且进行喷雾。喷雾法可以通过压缩空气或通过超声能量完成以形成多个包含该偶联物或其盐的液滴或固体颗粒。

[0347] 氢卤化物盐类-使用氢卤化物盐偶联物的方法

[0348] 在此描述的酸式盐可以用来治疗或预防任何动物中、特别是哺乳动物(包括人类)中对未改性的活性剂有反应的任何病症。包括抗癌剂(伊立替康)的一种代表性酸式盐,4-臂-季戊四醇基-PEG-甘氨酸-伊立替康氢卤化物,在治疗不同类型的癌症中是特别有用的。

[0349] 酸式盐偶联物,特别是在其中该小分子药物是一种抗癌剂(例如像在此描述的喜树碱化合物(例如伊立替康或7-乙基-10-羟基-喜树碱)或其他溶瘤细胞药物),在治疗实体型肿瘤中是有用的,这些实体型肿瘤例如乳癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、恶性黑色素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食道癌、霍奇金病、肾上腺皮质癌、以及类似疾病。额外的用该酸式盐可治疗的癌症包括淋巴瘤、白血病、横纹肌肉瘤、成神经细胞瘤、以及类似疾病。如上所述,该主题偶联物在靶向和集聚在实体瘤内是特别有效的。该偶联物还在HIV(艾滋病毒)和其他的病毒的治疗中是有用的。

[0350] 在用于治疗具有显示出难以用一种或多种抗癌剂治疗的癌症的患者时,代表性偶联物(例如4-臂-季戊四醇基-PEG-甘氨酸-伊立替康)已经显示出是特别有利的。

[0351] 治疗方法包括给予需要它的哺乳动物一个治疗有效量的如在此所述的酸式盐组合或配制品。

[0352] 额外的方法包括通过给予如在此所述的一种酸式盐组合物,来治疗(i)对基于蒽环类抗生素和/或紫杉烷的治疗抵抗的转移性乳癌,(ii)抵抗铂的卵巢癌,(iii)转移性宫颈癌,以及(iv)在具有K-Ras突变基因状态的患者体内的结肠直肠癌。

[0353] 在转移性乳癌的治疗中,如在此提供的偶联物的酸式盐(例如4-臂-季戊四醇基-PEG-甘氨酸-伊立替康)以一个治疗有效量被施用至一位患有局部进展转移性乳癌的患者,其中该患者已经具有不超过二种先前的(不成功的)用基于蒽环类抗生素和/或紫杉烷的化学治疗剂的治疗。

[0354] 对于治疗铂抵抗的卵巢癌,一种如在此提供的组合物以一个治疗有效量被施用至一位患有局部进展性或转移性卵巢癌的患者,其中该患者在基于铂的治疗期间已经显示出肿瘤进展,具有小于六个月的无进展间期。

[0355] 在另一方法中,对一个患有局部进展期结直肠癌的受试者给予一种氢卤酸盐(例如像在实例6中的那种),其中该一种或多种结直肠肿瘤对具有一种K-Ras癌基因突变(K-Ras突变体类型)使得该肿瘤对EGFR抑制剂如西妥昔单抗无响应。受试者们是那些已经失败于一种在先的含有5-FU的治疗并且也是初次接受伊立替康的那些。

[0356] 任意具体的酸式盐的一个治疗有效剂量将从偶联物到偶联物、患者到患者而变化,并且将取决于多个因素如该患者的病况、所使用的具体的活性剂的活性、癌症的类型、以及递送的途径。

[0357] 对于喜树碱型活性剂(例如伊立替康或7-乙基-10-羟基-喜树碱),优选的剂量是从约0.5至约100mg喜树碱/每公斤体重,优选从约10.0至约60mg/kg。在与其他的药理学活性剂结合地给予时,甚至更少的该酸式盐可以是治疗有效的。对于给予在此例证的伊立替康的一种酸式盐,伊立替康的剂量范围将典型地是从约50mg/m²至约350mg/m²。

[0358] 治疗方法还包括给予一个治疗有效量的、与一种第二抗癌剂结合的、如在此所述的酸式盐组合物或配制品(其中该活性剂是喜树碱型分子)。优选地,与如在美国专利号6,403,569中描述的5-氟尿嘧啶和亚叶酸结合给予这样的喜树碱基偶联物(以酸式盐的形式)。

[0359] 可以按一天一次或若干次、优选一天一次或更少地给予这些氢卤酸盐盐组合物。治疗的持续时间可以是每天一次持续从二周至三周的一个时期并且可以持续几个月或甚至几年的时间。每天的剂量可以通过单个剂量单元形式或几个更小剂量单元的单剂量形式

亦或通过以某些间隔再分的剂量的多次给药来进行给药。

[0360] 应当理解,虽然已经结合本发明的优选的特定实施方案说明了本发明,但以上说明连同下面的这些实例旨在展示而非限制本发明的范围。在本发明的范围之内的其他方面、优点以及修改对于本发明所涉及的本领域的普通技术人员而言将是清楚的。

[0361] 实验

[0362] 除非另外指明,本发明的实施将采用本领域技能之内的有机合成以及类似的常规技术。此类技术在文献中全面地进行了描述。除非确切地指出是与此相反,否则试剂以及材料是可商购的。参见例如M.B.Smith和J.March, March's Advanced organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure(马奇的高级有机化学:反应机理和结构),第6版,(纽约:Wiley-Interscience,2007),在前,以及Comprehensive organic Functional Group Transformations II(综合有机官能团转化II),卷1-7,第二版:A Comprehensive Review of the Synthetic Literature 1995-2003(合成文献1995-2003的综述)(Organic Chemistry Series(有机化学系列)),编辑:Katritzky(卡特里特斯基),A.R.,等人, Elsevier Science。

[0363] 在以下的例子中,已经作出了努力来确保关于所使用的数字(例如量、温度等)的准确度,但对此仍应将一定的实验误差和偏差考虑在内。除非另外指明,温度是以摄氏度(C)为单位并且压强是在或接近海平面的大气压。

[0364] 以下实例展示了本发明的某些方面和优点,然而,本发明不得被视为限制于以下描述的具体实施方案。

[0365] 缩写

[0366]	Ar	氩
[0367]	CM	羧甲基或羧基亚甲基($-\text{CH}_2\text{COOH}$)
[0368]	DCC	1,3-二环己基碳二亚胺
[0369]	DCM	二氯甲烷
[0370]	DMAP	4-(N,N-二甲氨基)吡啶
[0371]	GLY	甘氨酸
[0372]	HCl	盐酸
[0373]	RP-HPLC	反相高效液相色谱法
[0374]	IPA	异丙醇
[0375]	IRT	伊立替康
[0376]	IPC	离子对色谱
[0377]	MeOH	甲醇
[0378]	MTBE	甲基叔丁基醚
[0379]	MW	分子量
[0380]	NMR	核磁共振
[0381]	PEG	聚乙二醇
[0382]	RT	室温
[0383]	SCM	琥珀酰亚胺基羧甲基($-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{N}$ -琥珀酰亚胺基)
[0384]	TEA	三乙胺

[0385] TFA 三氟乙酸

[0386] THF 四氢呋喃

[0387] 材料和方法

[0388] 从NOF公司(日本)获得季戊四醇基-基4-ARM-PEG_{20K}-OH。4-臂-PEG_{20K}-OH具有以下结构： $C-(CH_2O-(CH_2CH_2O)NH)_4$ ，其中每一个n是约113。

[0389] 季戊四醇基-基的4-ARM-PEG_{20K}-OH(也简称为4-Arm PEG-OH)的额外的供应商包括Creative PEGWorks(温斯顿-塞勒姆)，它也提供了琥珀酰亚胺基-功能化的形式，以及JenKem Technology USA(艾伦市，德克萨斯州)。

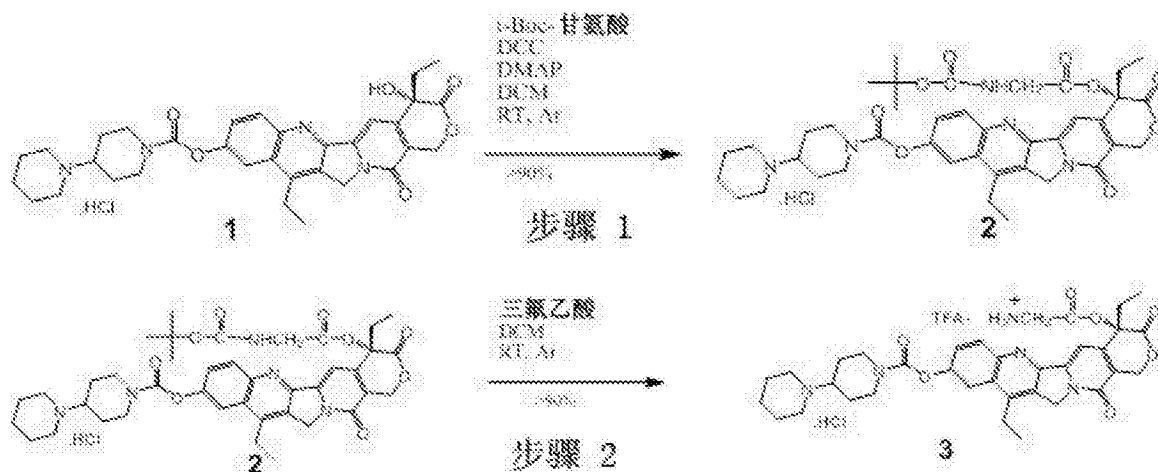
[0390] 所有¹HNMR数据是通过由Bruker制造的一种300或400MHz核磁共振波谱仪产生的。

[0391] 实例1

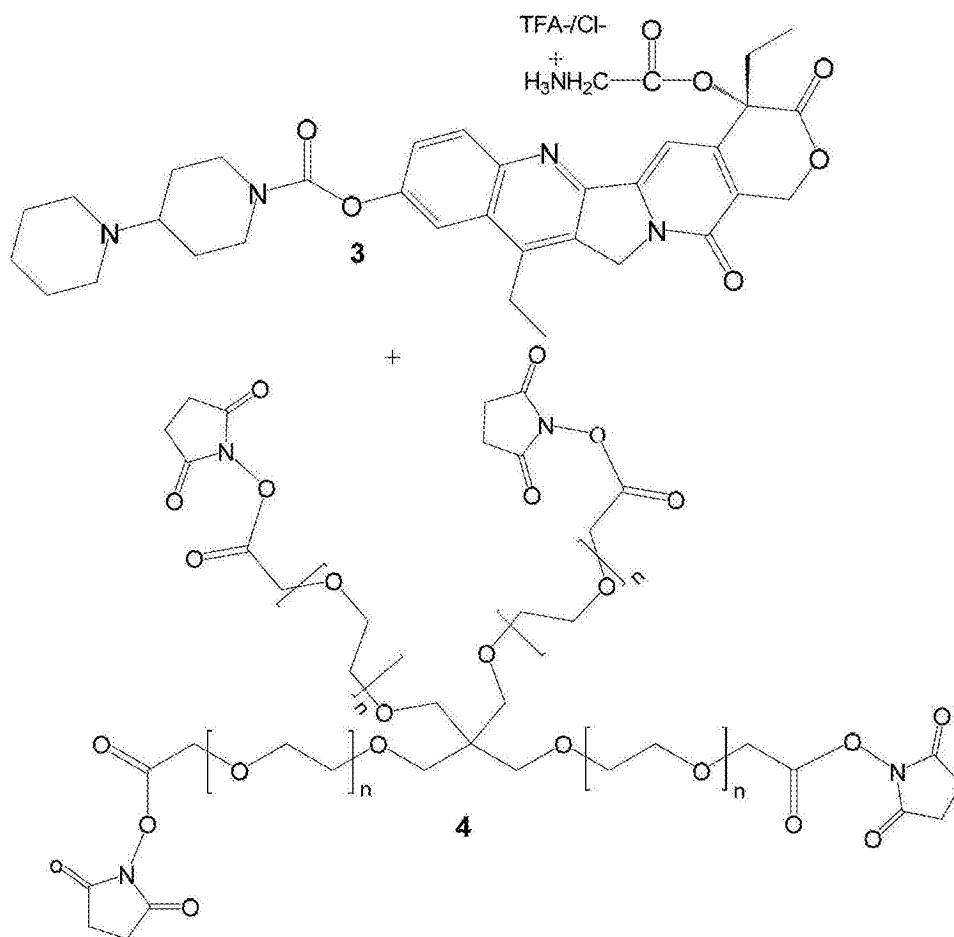
[0392] 季戊四醇基-4-臂-(PEG-1-亚甲基-2氧代-乙烯基氨基乙酸酯连接的伊立替康)-20K“4-臂PEG-GLY-伊立替康-20K”混合三氟乙酸·盐酸盐的制备

[0393] 反应方案：

[0394]



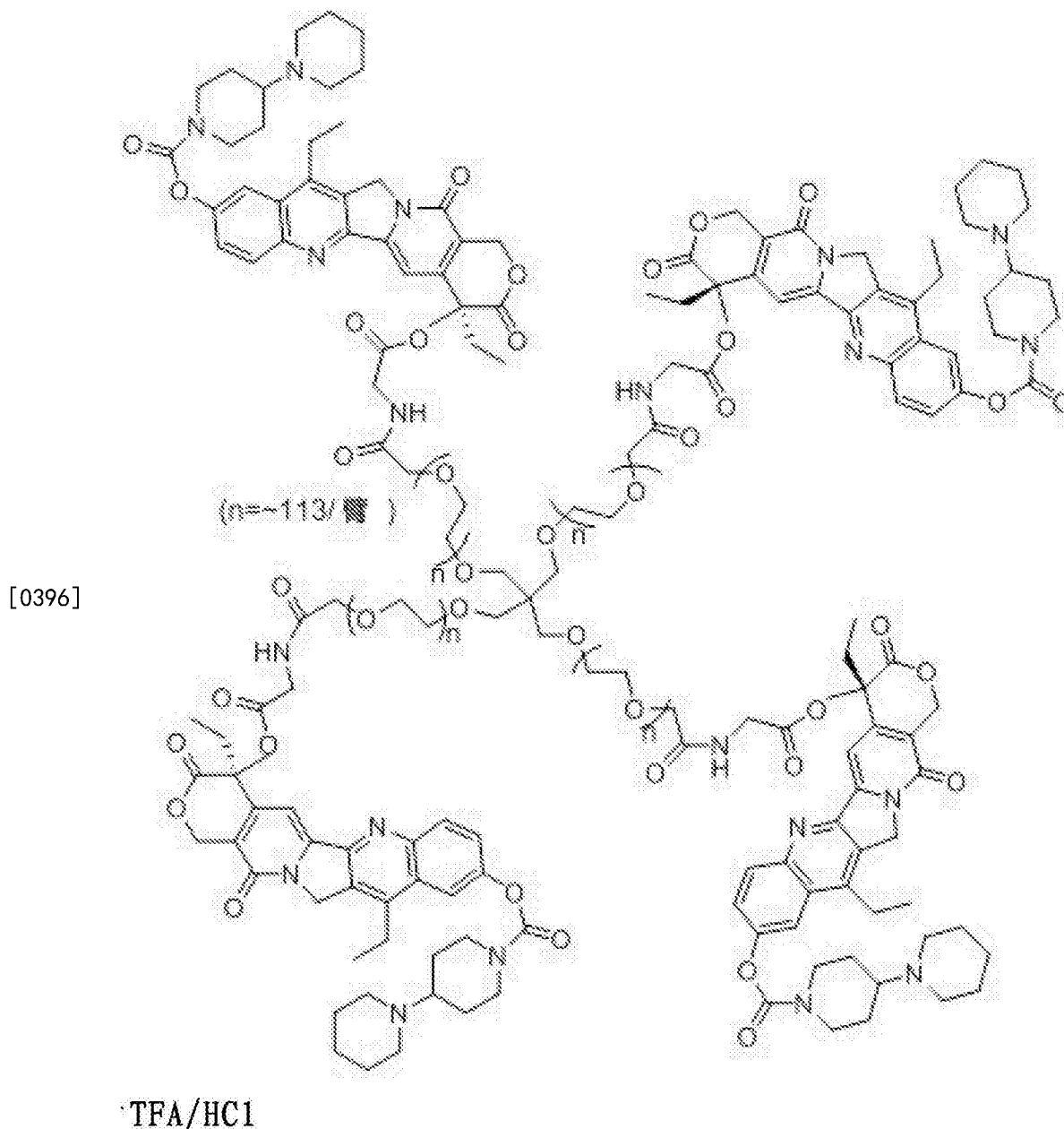
[0395]



分离自 MeOH/IPA (x3)

>90%

步骤 3



5

[0397] 该实例描述了4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的混合TFA.HCl酸式盐。

[0398] 在合成中使用的所有溶剂都是无水的。

[0399] 步骤1. 偶联t-boc-甘氨酸到伊立替康HCl盐上(>95%产率)

[0400] 将伊立替康HCl三水合物(1摩尔或677g)和DMF(10L)加入到60°C的蒸馏器中。在DMF中溶解伊立替康HCl三水合物时,缓慢地施用全真空,用来通过在60°C共沸蒸馏而从伊立替康HCl三羟化物中除去水。在从残留DMF中形成固体时,将庚烷(高达60L)加入到该蒸馏器中以在40°C-50°C除去残留DMF。在通过目测除去庚烷时,停止共沸蒸馏并且允许固体(伊立替康HCl)冷却至17°C±2°C。为了偶合反应,将溶解在DCM(1L)中的t-boc-甘氨酸(1.2摩尔)、4-DMAP(0.1摩尔),以及DCM(19L)加入到该蒸馏器中。一旦该混合物在视觉上很好地分散,则添加熔化的DCC(1.5摩尔)并且允许进行反应。在氩气层或氮气层下进行该反应,同时充分混合并且锅的温度在17°C±2°C。

[0401] 在2-4小时的反应时间以后,取样以通过色谱法测量残留伊立替康(IRT)峰面积百分比。确定残留伊立替康存在的量是不超过5%。通过过滤除去偶合反应过程中形成的DCU,并且用DCM洗涤。在45###C以下,在真空下合并并浓缩含有粗t-boc-甘氨酸-伊立替康HCl盐的生成的滤液,以除去DCM。在通过蒸馏除去它的初始体积的约75%时,然后将IPA添加至浓缩物中以达到初始体积,并且进一步蒸馏该混合物直至浓缩物体积达到它的初始体积的约25%。冷却生成的澄清溶液至室温,随后将其添加至庚烷中,同时混合。将该混合物混合额外的0.5至1小时,在这个过程中中形成一种沉淀物。将该沉淀排出并过滤以获得一个湿饼,并且然后将其用庚烷(高达6L)洗涤。真空干燥该湿饼以产生用于步骤2的t-boc-甘氨酸-伊立替康粉末。产率>95%。

[0402] 步骤2. 使t-boc-甘氨酸-伊立替康脱保护

[0403] 在搅拌下,在DCM中溶解来自步骤1的t-boc-甘氨酸-伊立替康(1摩尔)。在5至10分钟的一个时段内,向该溶液添加TFA(15.8摩尔),并且搅拌生成的溶液约2小时。通过RP-HPLC测量残留起始材料并且确定小于约5%。然后将乙腈添加至该反应溶液中以在RT下形成一种视觉上均匀的溶液。然后将该溶液添加至正充分搅拌的在35°C的MTBE(46.8kg)中以促进结晶。任选地为了减少MTBE的使用,通过在15###C至40°C的蒸馏,用乙腈取代反应溶液中的DCM。在溶剂交换以后,将该含产物溶液添加到约50%更少体积的、正充分搅拌的、在结晶温度(35°C)的MTBE(23kg)中。继续混合半小时至一小时。过滤生成的固体并且用MTBE洗涤该饼。

[0404] 真空干燥该湿饼以产生用于步骤3的甘氨酸-伊立替康盐粉末。通过使用电导率检测器的离子层析确定产物的三氟乙酸盐和氯化物含量。(产率>95%)。

[0405] 步骤3. 使用-臂-PEG-CM-SCM的甘氨酸-伊立替康的PEG化

[0406] 将来自步骤2的甘氨酸-伊立替康TFA/HCl盐粉末添加到一个反应器中,向其中添加DCM(约23L)。搅拌该混合物约10-30分钟以允许甘氨酸-伊立替康TFA/HCl分散在DCM中。然后以维持锅的温度在24###C或更低的速率,缓慢添加三乙胺(甘氨酸-伊立替康TFA/HCl盐粉末摩尔数中约1.05摩尔的(HCl+TFA))。搅拌生成的混合物10至30分钟以允许溶解GLY-IRT(甘氨酸改性的伊立替康)游离碱。

[0407] 在一个高达30分钟的过程,将约80%的总量(6.4kg)的4-臂PEG-SCM-20kD添加到该反应器中。在溶解该PEG试剂以后,通过IPC监控反应进展。(如果在反应似乎已经达到一个平台时,非偶联的GLY-IRT的量是大于5%,那么将剩余的20%的4-臂PEG SCM添加到该反应器中,并且监控反应进展,直至观察到一个恒定值的未反应的GLY-IRT。

[0408] 通过在从1-1.5小时的时段,将反应溶液添加至室温下搅拌的MTBE(113.6L)中,随后搅拌,来沉淀粗产物。将生成的混合物转移到具有搅拌器的过滤器-干燥器中,以除去母液。将沉淀物(粗产物)在约10###C-25###C,使用最小间歇搅拌而部分地真空干燥。

[0409] 然后将粗产物放入反应器中,向其中添加IPA(72L)和MeOH(8L),随后搅拌高达30分钟。加热以达到在50°C的锅的温度下视觉上完全溶解(澄清的溶液),随后搅拌30至60分钟。然后冷却该溶液至37###C,保持在那里若干小时,随后冷却至20°C。然后将该混合物转移到搅拌的过滤器干燥器中,并且过滤以除去母液,由此在过滤器上形成一个饼。用在IPA中的70%MTBE和30%MeOH洗涤该饼,并且进行部分地真空干燥。该步骤重复额外的两次,除了在冷却前,使用在50###C的在线过滤器(in-line filter)(1um)过滤过滤含4-臂PEG-Gly-

IRT的澄清IPA/MeOH溶液,以除去在最后的(第三次)结晶中的任何潜在的微粒。

[0410] 从经洗涤的湿饼取三个代表性样品,并且使用NMR测量NHS水平。真空干燥该湿饼。

[0411] 将产物(“API”)包装在惰性气氛下密封的双袋中,并且在-20°C避光储存。产物产率为约95%。

[0412] 实例2

[0413] 作为混盐的来自实例1的“4-臂-PEG-Gly-Irino-20K”产物的表征

[0414] 通过离子色谱分析来自实例1的产物(IC分析)。参见下表1,是不同产物批次的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的IC分析结果。

[0415] 表1

[0416] 结合到PEG上的伊立替康的摩尔百分比

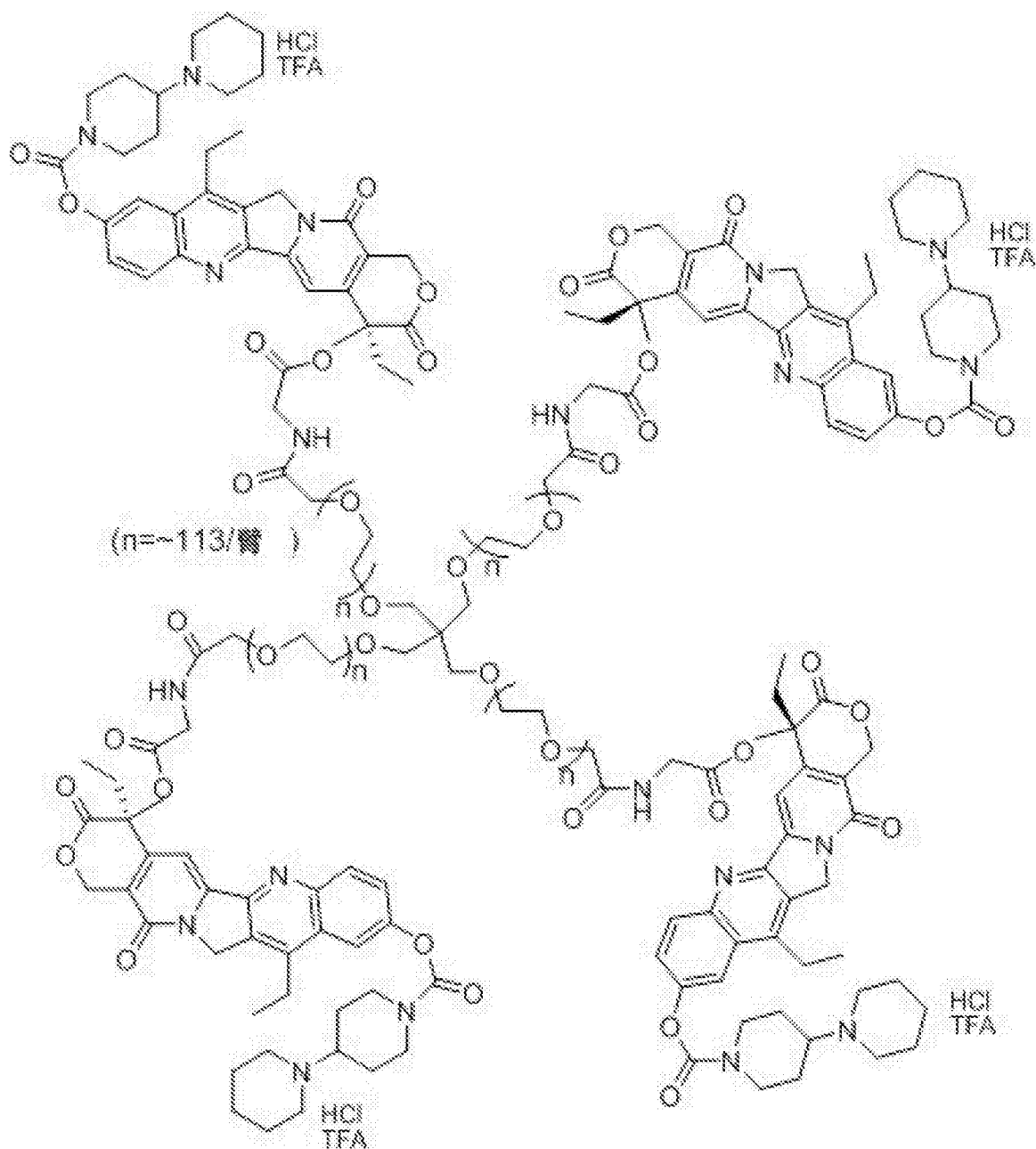
[0417]

批号	TFA	HCl盐	游离碱
010	59	36	5(低)
020	64(高)	30	6
030	27(低)	24	49(高)
040	53	26	21
050	54	26	20
060	57	28	15
070	53	33	14
080	53	27	20
090	44	19	36
100	33	41	26
最后7个批次的平均	50	29	22

[0418] 基于表1中提供的IC结果,可见实例1中形成的产物(4-臂-PEG-Gly-Irino-20K)是基于产物中的偶联的伊立替康分子,约50摩尔百分比的TFA盐,30摩尔百分比的HCl盐,以及20摩尔百分比的游离碱的一种部分的混盐。甚至在产物的重复(1-3次)的重结晶以后,仍观察到盐的混合物。在以上分析的而不同的产物批次中,可见在该组合物中约35-65摩尔百分比的伊立替康分子被质子化为TFA盐,在该组合物中约25-40摩尔百分比的伊立替康分子被质子化为HCl盐,同时剩余的5-35摩尔百分比的伊立替康是非质子化的(即作为游离碱)。

[0419] 以下示出了产物的通用结构,其中以游离碱形式示出伊立替康部分,并且与HCl和TFA缔合-作为产物的混盐性质的一种象征。

[0420]



VI

[0421] 实例3

[0422] 4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的应力稳定性研究

[0423] 试图进行加速稳定性研究以评价4-臂-PEG-Gly-Irino-20K产物组合物。检验含有不同量的质子化的伊立替康的、并且不同之处在于TFA对比HCl盐的量的组合物。

[0424] 应力稳定性研究

[0425] 称取(约1-2g)的实例1中形成的产物、4-臂-PEG-Gly-Irino-20K、化合物5,放入PEG PE‘旋转顶部’袋中,并且放入另一‘旋转顶部’袋中,来模拟API包装条件。在一个研究中(结果在图1中示出),将样品放置在25°C/60%RH下的环境室中4周。在另一研究中,将样品放置在40°C/75%RH下的环境室中高达若干个月(结果在图2和图3中示出)。在研究过程中,

定期取样并且分析。

[0426] 结果

[0427] 研究结果在图1、图2和图3中示出。在图1中,对比时间,绘出在25°C和60%相对湿度下储存的样品的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K峰面积百分比。示出的数据是对于由>99%的HCl盐(<1%的游离碱,三角)、94%的全盐(6%的游离碱,方块)、和52%的全盐(48%的游离碱,圆圈)组成的样品。图中的斜率表明,随着游离碱含量增加,产物的稳定性降低。在使用的应力条件下(即在25°C下高达28天),4-臂-PEG-Gly-Irino-20K峰面积的下降与游离伊立替康的增加明确地相关,从而表明分解模式主要是通过酯键水解以释放伊立替康。基于观察到的结果,看来产物中更大量的游离碱导致对水解的降低的稳定性。因此,与含有更少的质子化的伊立替康的产物相比,含有更大程度的质子化的伊立替康似乎具有有针对水解的更大稳定性(基于摩尔百分比)。

[0428] 图2和图3示出,从储存在40°C和75%相对湿度下含有>99%的HCl盐的样品(小于1%的游离碱,方块)和由86%的全盐组成的样品(14%的游离碱,菱形)获得的另一套数据。图2示出,对于这两个样品,在3个月内的游离伊立替康的增加。该数据与来自以前描述的研究的数据(总结在图1中)一致,这示出了具有更高游离碱含量的产物对水解更不稳定。图3示出,对于3个月内的相同的样品,更小的PEG种类的增加。更小的PEG种类的增加表明PEG骨架分解以提供多个PEG种类。该数据表明,在加速稳定性条件下,与含有14%的游离碱的混盐样品相比,对应于HCl盐的产物更倾向于PEG骨架分解。因此,尽管不打算受理论束缚的同时,看来在该部分的混盐可以主要通过水解释放药物而降解时,盐酸盐似乎通过不同机理降解,即降解聚合物骨架。然而,可以最小化骨架降解的程度,例如通过控制储存条件。

[0429] 总之,观察到的两种分解模式表现出关于盐/游离碱含量的相反的倾向。虽然在加速稳定测试下盐酸盐确实展示出更大程度骨架降解(可能由于配制品的酸度),与游离碱亦或混合的TFA. 盐酸盐相比,盐酸盐示出具有更大的水解稳定性。

[0430] 实例4

[0431] 手性研究

[0432] 确定了4-臂-PEG-Gly-Irino-20K中伊立替康的碳-20的手性。

[0433] 如在来自供应商的文件中详细说明的那样,盐酸依立替康起始材料是旋光的,其中C-20处于它的(S)-构型中。伊立替康中的C-20位置带有一个叔醇,它是不易于电离的,因此并不期待该位点外消旋,除了在极端(强酸)条件下。为了确定4-臂-PEG-Gly-Irino-20K中C-20的手性,使用手性HPLC方法来分析经由化学水解从产物释放的伊立替康。

[0434] 基于生成的色谱图,对于4-臂-PEG-Gly-Irino-20K样品,没有检测到(R)-对映异构体。在水解以后,确认从该偶联物释放的伊立替康是(S)-构型。

[0435] 实例5

[0436] 水解研究

[0437] 所有PEG化的伊立替康种类被认为是4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的部分(无论具体形式-游离碱、混合TFA. 盐酸盐、或氯化物盐);每一种类清楚地水解以产生大于99%纯度的伊立替康。此外,主要地,满载药物的DS4种类(伊立替康共价地附接到四个聚合物臂中的每一个上)和部分取代的种类-DS3(伊立替康共价地附接到三个聚合物臂上)、DS2(伊立替康共价地附接到两个聚合物臂上)和DS1种类(伊立替康共价地附接到一个单个的聚合物臂

上)-均以相同速率水解以释放游离的药物(伊立替康)。

[0438] 进行实验以确定在酯交换反应(在CH₃OH中的K₂CO₃)和水性水解(pH10, 20°C)条件下, 4-臂-PEG-Gly-Irino-20K混合的TFA. 盐酸盐中含伊立替康的PEG种类的结果(fate)。在45分钟以后, 酯交换反应完成>99%。在24小时内, 水性水解反应完成>99%。对于这两种反应类型, 在相同条件下进行使用伊立替康的对照反应, 并且观察到一些假象的峰。在对假象的峰的调整以后, 在这两种情况下, 产生的伊立替康具有>99%的色谱纯度。

[0439] 基于这些结果, 得出的结论是4-臂-PEG-Gly-Irino-20K(例如盐酸盐)中基本上所有的PEG化的种类均释放伊立替康。来自水性水解反应的、随时间所取的多个HPLC的叠加示出以下转化: DS4到DS3到DS2到DS1到伊立替康。如在图4中说明的那样, 所有这些种类均水解以释放伊立替康, 这证明伊立替康经由水解从单、二、三和四取代的4-臂-PEG-Gly-Irino-20K种类释放。

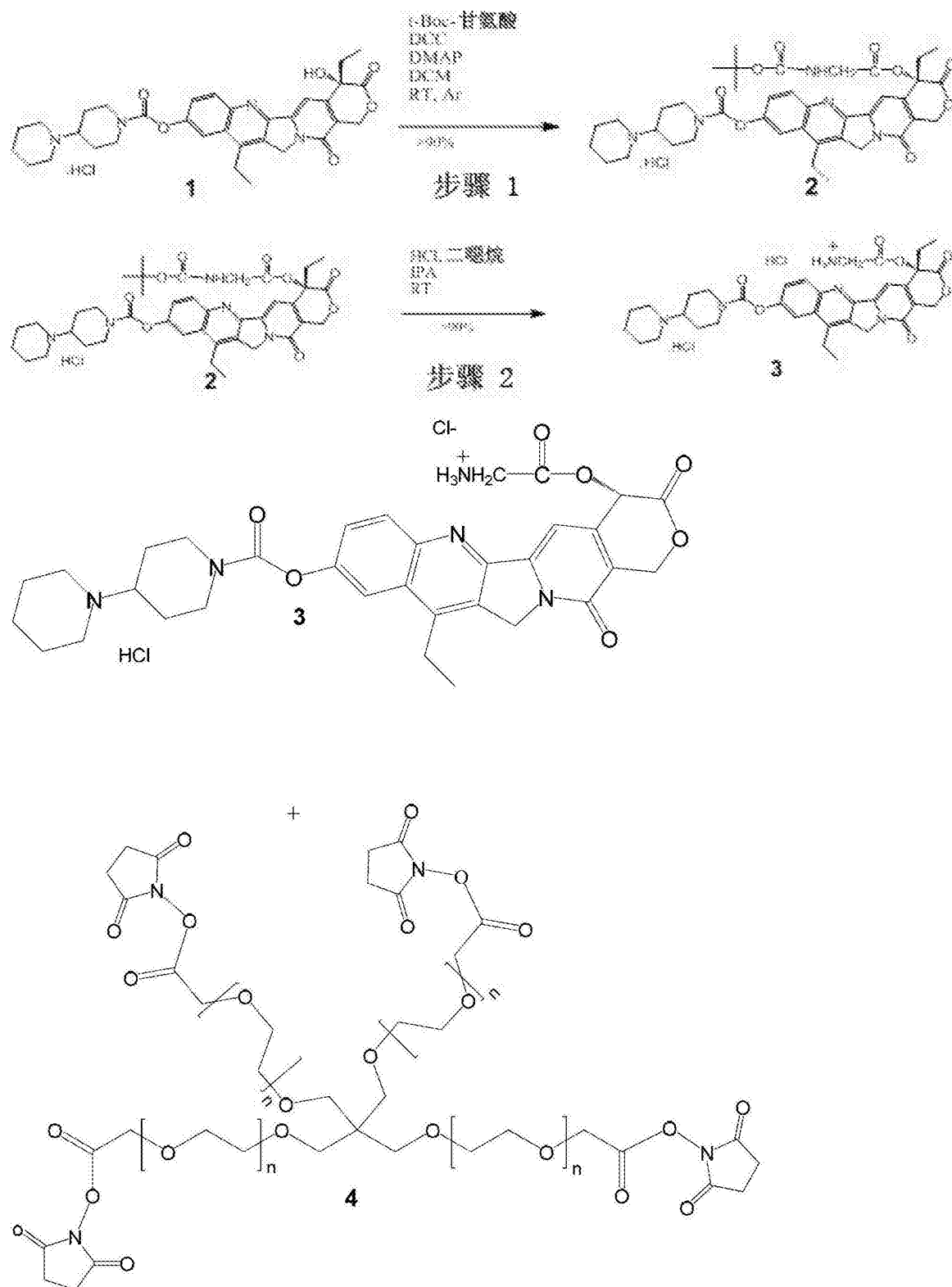
[0440] 进行额外的实验以测量在存在猪羧肽酶B的水性缓冲液(pH 8.4)中和在人类血浆中, 主要组分4-臂-PEG-Gly-Irino-20K(DS4), 和它的更少地取代的中间体DS3、DS2和DS1的水解速率。在存在猪羧肽酶B的水性缓冲液中的水解是对进行酶基水解的一次尝试。在pH 8.4但是没有酶的对照实验稍后示出水解是pH驱动的, 并且因此主要是一种化学水解。虽然如此, 对于与从人类血浆中进行的水解所获得的数据比较, 该数据是有价值的。这些实验示出, 不同组分的水解速率并不是显著不同的, 并且比理论预测更好。额外的实验测量了人类血浆中4-臂-PEG-Gly-Irino-20K的主要组分(DS4、DS3、DS2和DS1)的水解速率。这些实验还示出, 不同组分以相同速率水解, 并且比理论预测更好。

[0441] 图5和图6呈现了这样的图, 其中分别示出化学水解(在酶存在下)和血浆水解的理论水解速率对比实验数据。在这两种情况下, 理论预测基于每一种类水解以产生下一个更低的同系物加上游离伊立替康的相同速率(即DS4>DS3>DS2>DS1)。

[0442] 实例6

[0443] 季戊四醇基-4-臂-(PEG-1-亚甲基-2氧代-乙烯基氨基乙酸酯连接的伊立替康)-20K“4-臂PEG-GLY-伊立替康-20K”氢卤化物盐的制备

[0444]

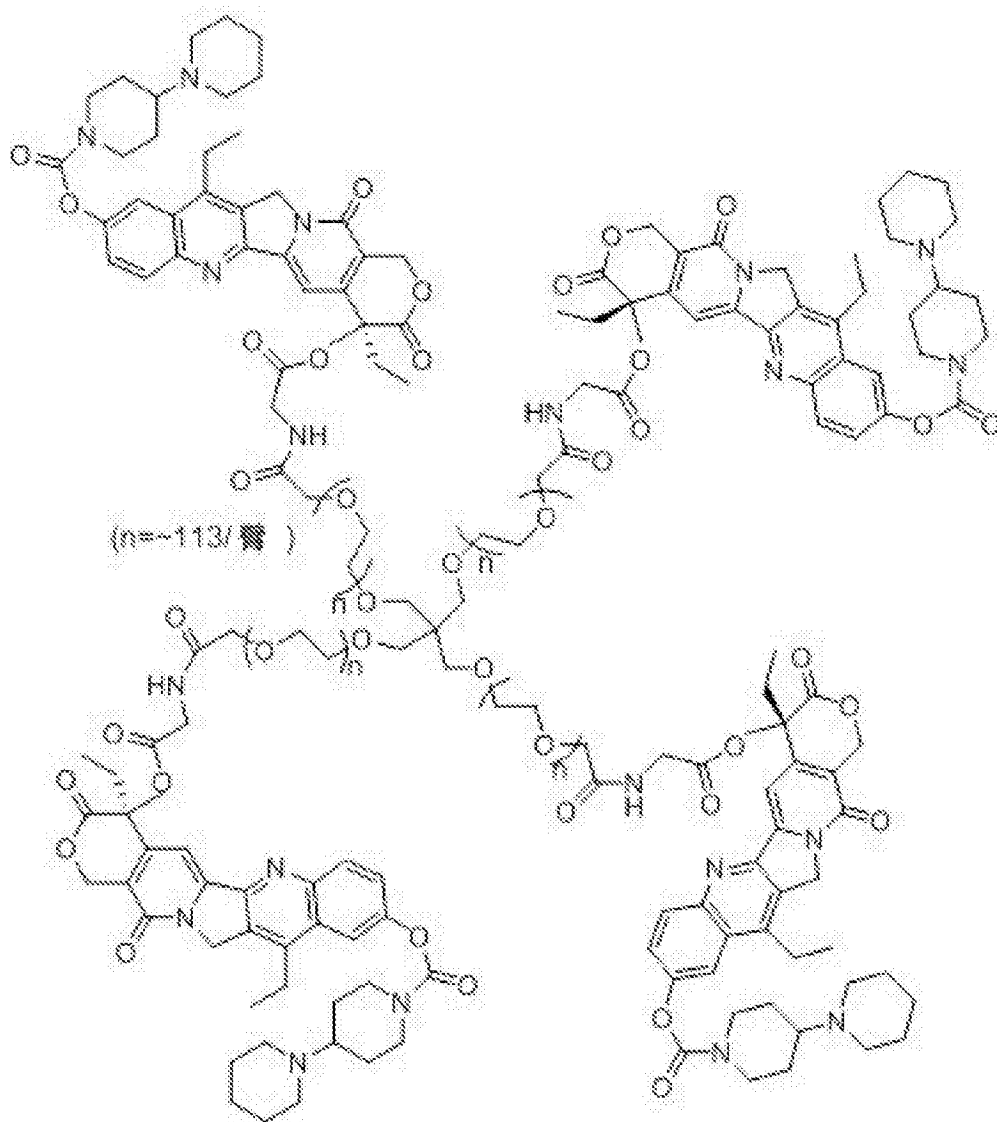


步骤
3

TEA
DCM
RT, Ar

分离物
w/ MTBE

[0445]



[0446] >95摩尔% HCl

[0447] 步骤1. Boc-甘氨酸-依立替康盐酸盐(Gly-IRT HCl)的合成

[0448] 部分1:干燥盐酸依立替康三水合物(IRT·HCl·3H₂O)

[0449] 将IRT□HCl□3H₂O(45.05g, 66.52mmol)加入到一个反应器中。将无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(666mL, 14.7mL/g的IRT□HCl□3H₂O, DMF含水量不超过300ppm)加入到该反应器中。在缓慢搅拌下,将该反应器加热至60°C(夹套温度)。在伊立替康(IRT)完全溶解以后(5-10分钟),缓慢施用真空至达到5-10毫巴,并且蒸馏掉DMF。在缩合的馏出物(DMF)体积达到初始DMF加料的85%-90%时,释放真空。将庚烷(1330mL, 30.0mL/g的IRT□HCl□3H₂O, 含水量不超过50ppm)引入该反应器中,并且将该夹套温度降至50°C。真空蒸馏庚烷(100-150毫巴),直至馏出物的体积为初始加料的庚烷的约90%。再进行两个循环的庚烷蒸馏(2×1330mL的庚烷加料并且蒸馏)。从反应器除去溶剂相样品并且使用气相色谱法分析DMF含量以确保样品的DMF含量小于3%w/w。(如果残留DMF>3.0%w/w,那么进行一个第四共沸蒸馏循环)。生成物浆料被用于偶合反应。

[0450] 部分2:偶合反应:

[0451] 将二氯甲烷(1330mL, 29.5mL DCM/g IRT·HCl·3H₂O)加入到在搅拌下的反应器中,其中干IRT□HCl(1.0当量)的浆料在残留庚烷中(残留庚烷与IRT□HCl的近似质量比为3)。将反应成分搅拌15-30分钟,并且批次温度维持在17°C。将Boc-甘氨酸(14.0g, 79.91mmol, 1.2当量)和DMAP(0.81g, 6.63mmol, 0.1当量)作为固体到反应器中。制备了DCC的一个DCM溶液(40mL的二氯甲烷中的1.5当量),并且经15-30min添加它,并且将生成物的混合物在17°C(批次温度)搅拌2-3hr。通过HPLC监控反应完成。将预制骤冷溶液加入到该反应混合物中,以骤冷任何剩余DCC。简言之,预制骤冷溶液是二氯甲烷中的TFA和IPA的一种预混溶液,通过在DCM(15.3mL, 0.34mL/g IRT·HCl·3H₂O)中混合TFA(1.53mL, 0.034mL/g IRT·HCl·3H₂O)和IPA(3.05mL, 0.068mL/g IRT·HCl·3H₂O)制备,并且在转化率为至少97%时,经5-10分钟的时间将其添加至反应器V1。将这些成分搅拌额外的30-60min以允许骤冷。将含DCU的反应混合物过滤通过1微米过滤器到另一反应器中。在35°C,在真空下,蒸馏反应滤液到1/3体积。将异丙醇(IPA)(490.5mL, 10.9mL/g IRT·HCl·3H₂O)添加至该浓缩的混合物中,并且在50°C(夹套温度)搅拌该混合物30-60min。通过真空蒸馏将生成的均匀溶液浓缩至初始IPA加料体积的约85%,并且将生成物浓缩物冷却至20°C(夹套温度)。在60-80min内,将IPA中的反应混合物转移至在20°C的庚烷(1750mL, 38.8mL庚烷/g IRT·HCl·3H₂O)中。将含Boc-gly-IRT HCl沉淀物的所生成物浆料搅拌额外的60-90分钟,并且通过过滤收集产物。用庚烷(2×490mL, 20.0mL庚烷/g IRT·HCl·3H₂O)漂洗反应烧瓶,并且用漂洗液洗涤产物饼。将湿饼在20°C至25°C,在真空下干燥至少12hr。产率:57.13g(110%,高是因为残余溶剂)

[0452] 步骤2. 甘氨酸-依立替康盐酸盐(Gly-IRT HCl)的合成

[0453] 向100ml圆底烧瓶中加入BOC-Gly-IRT(2.34g, 0.003摩尔)和IPA(12ml),在10分钟的一个时段内,向其中添加HCl(12ml, 4M, 在二噁烷中, 0.045摩尔)。将反应混合物在R.T.下搅拌6hr(并且通过HPLC监控反应完成),随后添加干乙腈(12mL)。将所生成的反应混合物缓慢添加(5min)到MTBE的搅拌溶液中(140ml)。过滤由此获得的固体,并且在真空下干燥以给出Gly-IRT HCl盐,为一种黄色粉末。产率:2.17g。

[0454] 步骤3. 4-臂-PEG20K-甘氨酸依立替康盐酸盐的合成

[0455] 将Gly-IRT HCl(5.04g, 14.61wt%HCl)加入到一个100mL反应器中并且用氩气冲

洗。设置夹套温度在20°C。添加DCM(100mL)和TEA(4mL)。将该溶液搅拌10分钟。

[0456] 添加初始加料4-arm-PEG20K-SCM(26.5g)并且搅拌反应混合物30分钟。取样并且经由HPLC分析。HPLC数据示出6.1%的剩余Gly-IRT.HCl。将一个第二次加料4-臂-PEG20K-SCM(1.68g)添加至该反应混合物中,并且搅拌该溶液约2小时。取样用于HPLC分析。HPLC分析数据示出1.2%的剩余Gly-IRT.HCl。

[0457] 然后将该反应溶液缓慢添加至MTBE(800mL)中以沉淀产物。将沉淀搅拌30分钟并且经由过滤收集。湿饼用MTBE(200mL)洗涤两次。在真空下干燥产物。通过离子色谱分析粗4-臂-PEG20K-依立替康盐酸盐中间体的氯化物含量。

[0458] 表2总结了所生成的4-臂-PEG20K-依立替康盐酸盐中间体的盐含量分析(IC色谱法)。

[0459] 表2

[0460]

氯化物	IRT含量	氯化物
Wt%	Wt%	摩尔%
0.493%	9.8%	83.3%

[0461] 盐调整和乙酸乙酯分离

[0462] 在35°C,将粗4-臂PEG20K-依立替康盐酸盐中间体(29.1g、83.3mole%Cl)溶解在600mL的乙酸乙酯中。在固体的可见溶解以后,搅拌溶液15分钟。将乙醇中的0.1N HCl溶液(8.5mL)加入到该溶液中并且搅拌30分钟。在强搅拌下,将烧瓶浸入冰浴中。在10分钟以后,从溶液中沉淀出可见固体。在该浴中,将该混合物搅拌总计60分钟。通过施用轻真空,在玻璃料中通过过滤收集沉淀物。该湿饼用30%MeOH/70%MTBE溶液(400mL)洗涤。将产物置于真空中来进行干燥。产率:28.3g

[0463] 最终产物中的氯化物含量(如通过离子色谱确定)为以下所示:

[0464] IRT含量,Wt% 氯化物,摩尔%

[0465] 9.8% 98.8%

[0466] 通过离子色谱确定通过以上方法制备的另一批次,为具有103.8%摩尔%的氯化物(即全部以盐酸盐的形式)。经在40°C,4周的一个时段进行储存并且评价时,总产物相关种类从98.7%变为97.0%,同时游离伊立替康从0.4%变为1.25%,表明盐酸盐对水解降解的稳定性(即耐受性)。在这些相同条件下,在4周以后检测聚乙二醇骨架裂解,但是为不可测量的。

[0467] 实例7

[0468] 在1.9KG规模的季戊四醇-基4-臂-PEG-20K的制备

[0469] 材料和方法。应当使用具有可达到的最低含水量的非常高等级的环氧乙烷,因为含水量导致了聚合物二醇杂质。注意:环氧乙烷是会与水分爆发性反应的非常反应性的化合物,因此应当小心地避免在反应和转移装置中的渗漏。而且,在操作中还应小心,包括使人员在防护屏后或在防护舱中工作。

[0470] 在两加仑的带有夹套的不锈钢压力反应器中回流无水甲苯(4L)两小时。接下来,在大气压下蒸馏掉一部分溶剂(3L)。然后排出残留甲苯,并且通过使蒸汽通过反应器夹套并且施用减压(3-5mm Hg)将该反应器干燥过夜。接下来将反应器冷却至室温,填充无水甲苯(4L)并且添加季戊四醇基4ARM-PEG-2K(SUNBRIGHTPTE®-2000季戊四醇,分子量为约2,

000道尔顿,NOF公司,200g,0.100摩尔)。在减压条件下蒸馏掉溶剂,并且然后在干燥的氮气气氛下将反应器冷却至30°C。将一升的分子筛干燥的甲苯(含水量约5ppm)和液态钠-钾合金(Na 22%,K 78%;1.2g)添加到该反应器中。将该反应器加热至110°C并且在三小时内连续添加环氧乙烷(1,800g),保持反应温度在110°C-120°C。接下来,将反应器内容物在约100°C加热两小时,并且然后降温至约70°C。在减压条件下蒸馏掉过量的环氧乙烷和甲苯。在蒸馏以后,反应器内容物保持在减压下,并且进行氮喷雾以除去痕量的环氧乙烷。添加磷酸(1N)以中和碱性残余物,并且在减压条件下干燥产物。最终从反应器排出产物,并且在冷却后过滤给出1.900g的白色固体。施用凝胶过滤色谱法(GFC)来表征该烷氧基化的聚合物产物,季戊四醇基4-臂-PEG-20K。该分析方法提供了具有根据分子量的组分分离的组合物的色谱图。使用装备有Shodex KW-803 GFC柱(300×8mm)系统和差示折射仪检测器的一个Agilent 1100 HPLC。流动相(0.1M NaNO₃)的流速为0.5ml/min。在图7中示出GFC色谱图。

[0471] GFC分析示出4臂-PEG-20K产物含有以下物质:高MW产物0.42%,4臂-PEG-20K99.14%,HO-PEG(10K)-OH0.44%。

[0472] 实例9

[0473] 可商购的4臂-PEG-20K的分析

[0474] NOF公司在提供商业PEG方面是当前领导者。因此获得了一种新鲜的可商购的季戊四醇-基4臂-PEG-20K(SUNBRIGHT**PTE**®-20,000,分子量约20,000道尔顿,NOF公司),并且使用凝胶过滤色谱法(GFC)进行分析。使用装备有Shodex KW-803 GFC柱(300×8mm)系统和差示折射仪检测器的一个Agilent 1100 HPLC。流动相(0.1M NaNO₃)的流速为0.5ml/min。在图8中示出GFC色谱图。

[0475] GFC分析示出该商业4臂-PEG-20K产物含有:高MW产物3.93%,4臂-PEG-20K 88.56%,HO-PEG(10K)-OH 3.93%,HO-PEG(5K)-OH 3.58%。

[0476] 实例10

[0477] 可烷氧基化的低聚物的制备:在15KG规模的季戊四醇基4-臂-PEG-2K

[0478] 在95°C,用95kg的去离子水洗涤二十加仑的带有夹套的不锈钢压力反应器两次。除去洗涤水,并且通过使蒸汽通过反应器套并且施用减压(3-5mm Hg)将该反应器干燥过夜。将25kg的无水甲苯填充到该反应器中并且在减压条件下蒸馏掉部分溶剂。然后排出残留甲苯,并且将反应器保持在减压条件下。然后将该反应器冷却至室温,填充无水甲苯(15 L),并且添加季戊四醇(1,020g)。在减压条件下蒸馏掉部分溶剂(约8L),并且然后在干燥的氮气气氛下将反应器冷却至30°C。将液体钠-钾合金(Na 22%,K 78%;2.2g)添加到该反应器中。在三小时内连续添加无水环氧乙烷(14,080g),保持反应温度在150°C-155°C。接下来,在约150°C将反应器的内容物加热30分钟,并且然后降温至约70°C。在减压条件下蒸馏掉过量的环氧乙烷和甲苯。在蒸馏以后,反应器内容物保持在减压下,并且进行氮喷雾以除去痕量的环氧乙烷。最终从反应器排出产物,给出14,200g的粘稠液体。施用凝胶过滤色谱法(GFC)来表征该产物,季戊四醇基4-臂-PEG-2K。该分析方法提供了具有根据分子量的组分分离的组合物的色谱图。使用装备有Shodex KW-803 GFC柱(300×8mm)系统和差示折射仪检测器的一个Agilent 1100HPLC。流动相(0.1M NaNO₃)的流速为0.5ml/min。

[0479] GFC分析示出,4臂-PEG-2K产物为约100%纯,具有低于可检测极限的低或高分子量杂质。

[0480] 实例11

[0481] 在20KG规模的季戊四醇-基4-臂-PEG-20K的制备

[0482] 在95°C,用95kg的去离子水洗涤二十加仑的带有夹套的不锈钢压力反应器两次。排出水,并且通过使蒸汽通过反应器套并且施用减压(3-5mmHg)将该反应器干燥过夜。将25kg的甲苯填充到该反应器中并且在减压条件下蒸馏掉部分溶剂。然后排出残留甲苯,并且将反应器保持在减压条件下。然后将该反应器冷却至室温,填充无水甲苯(21L)和预先分离的可烷氧基化的低聚物:添加来自实例10的季戊四醇基的4臂-PEG-2K(2,064g)。在减压条件下蒸馏掉部分溶剂(16L),并且然后在干燥的氮气气氛下将该反应器冷却至30°C。添加四升的分子筛干燥的甲苯(含水量约5ppm)和液态钠-钾合金(Na 22%,K 78%;1.7g),并且将该反应器加热至110°C。接下来,在五小时内连续添加环氧乙烷(19,300g),保持反应温度在145-150°C。接下来,在约140°C将反应器的内容物加热30分钟,并且然后降温至约100°C。添加冰乙酸(100g)以中和催化剂。在减压条件下蒸馏掉过量的环氧乙烷和甲苯。在蒸馏以后,反应器内容物保持在减压下,并且进行氮喷雾以除去痕量的环氧乙烷。最终从反应器排出产物,给出20,100g的白色固体。施用凝胶过滤色谱法(GFC)来表征该烷氧基化的聚合物产物,季戊四醇基4-臂-PEG-20K。该分析方法提供了具有根据分子量的组分分离的组合物的色谱图。使用装备有Shodex KW-803 GFC柱(300×8mm)系统和差示折射仪检测器的一个Agilent 1100 HPLC。流动相(0.1MNaNO₃)的流速为0.5ml/min。

[0483] GFC分析示出4臂-PEG-20K产物含有以下物质:高MW产物0.75%,4臂-PEG-20K 97.92%,HO-PEG(10K)-OH 1.08%,HO-PEG(5K)-OH 0.48%。

[0484] 已经关于具体的示例性实施方案对在此列出的这个或这些发明进行了说明。然而,以上说明并非旨在将本发明限制于这些示例性实施方案,并且这些技术人员应该认识到可以在以上说明书所描述的本发明的精神和范围内做出多种改变。

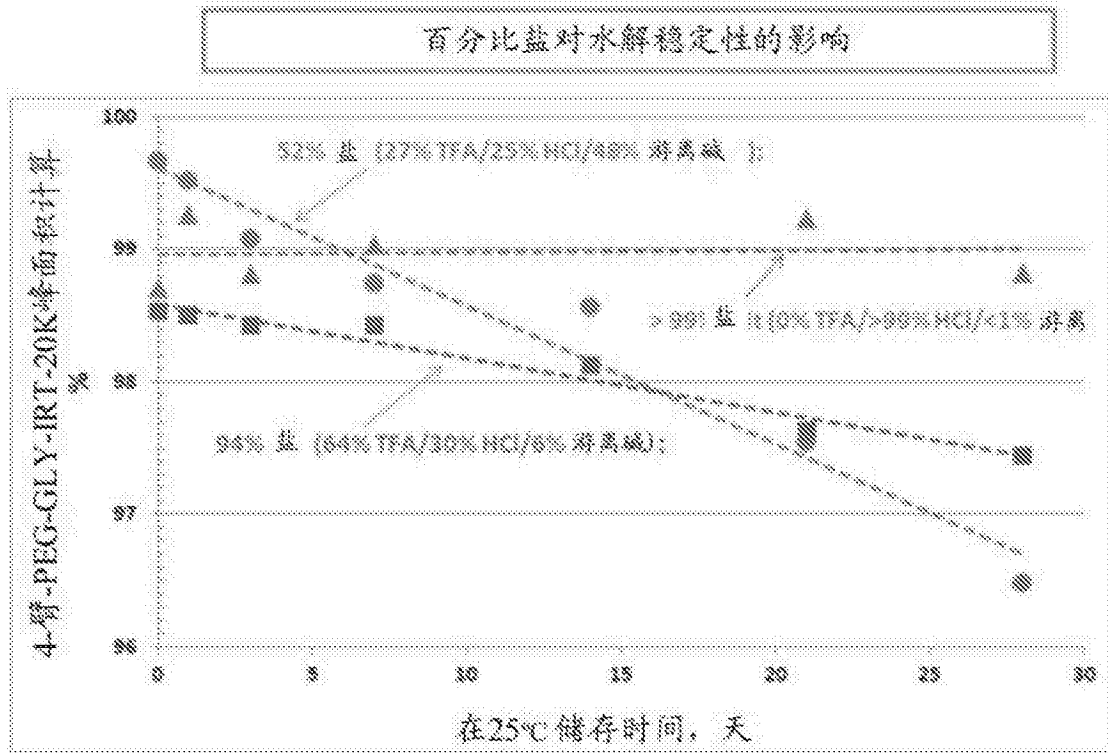


图1

4-臂-PEG-Gly-Irino-20k盐种类的稳定性

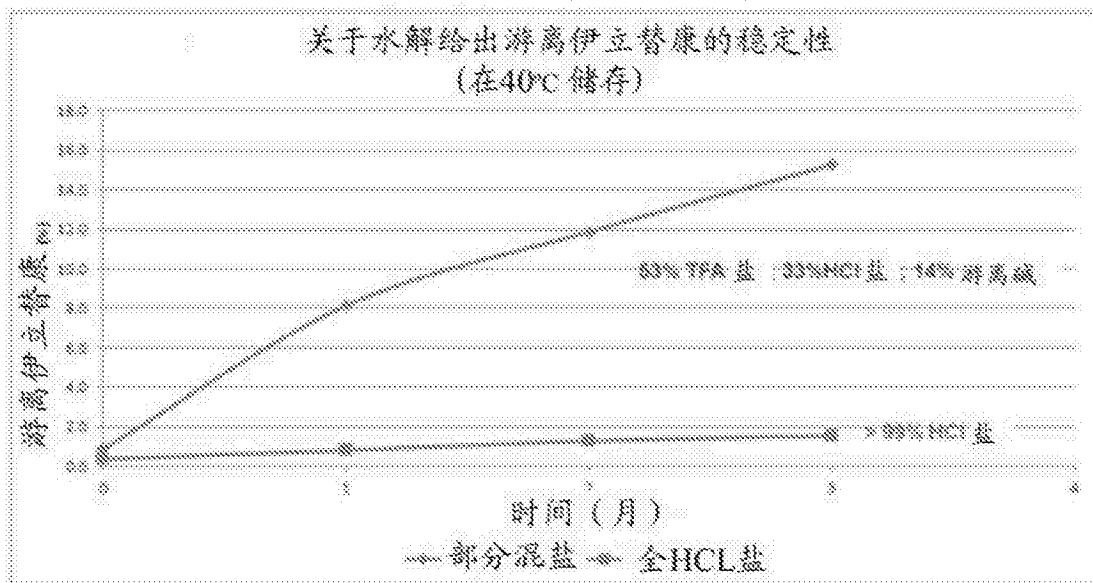


图2

4-臂-PEG-Gly-Irino-20k盐种类的稳定性

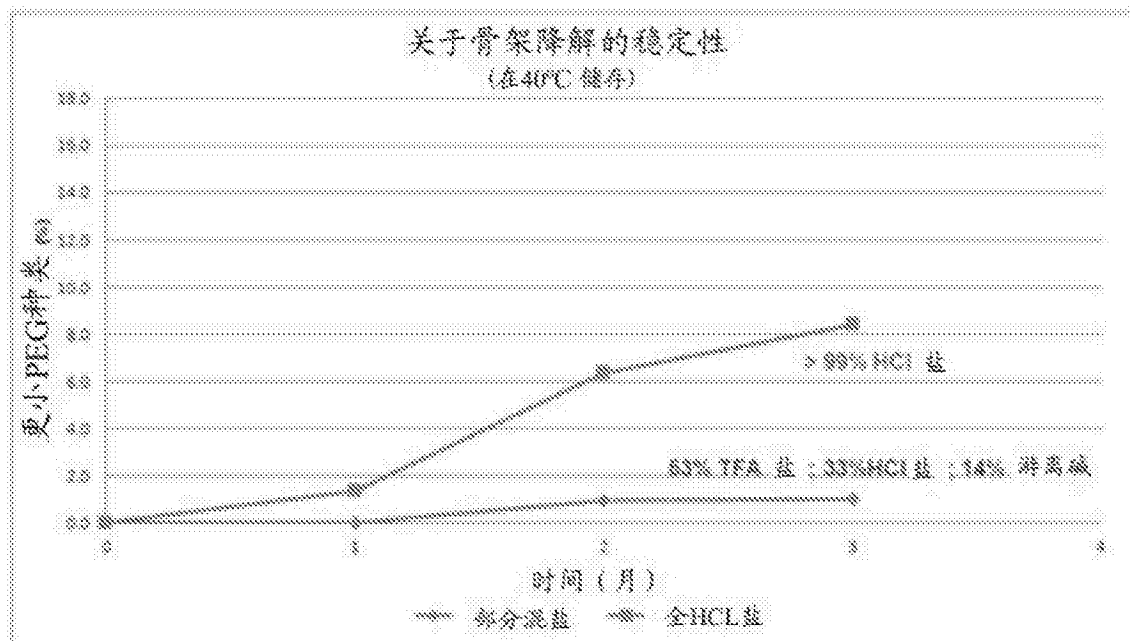


图3

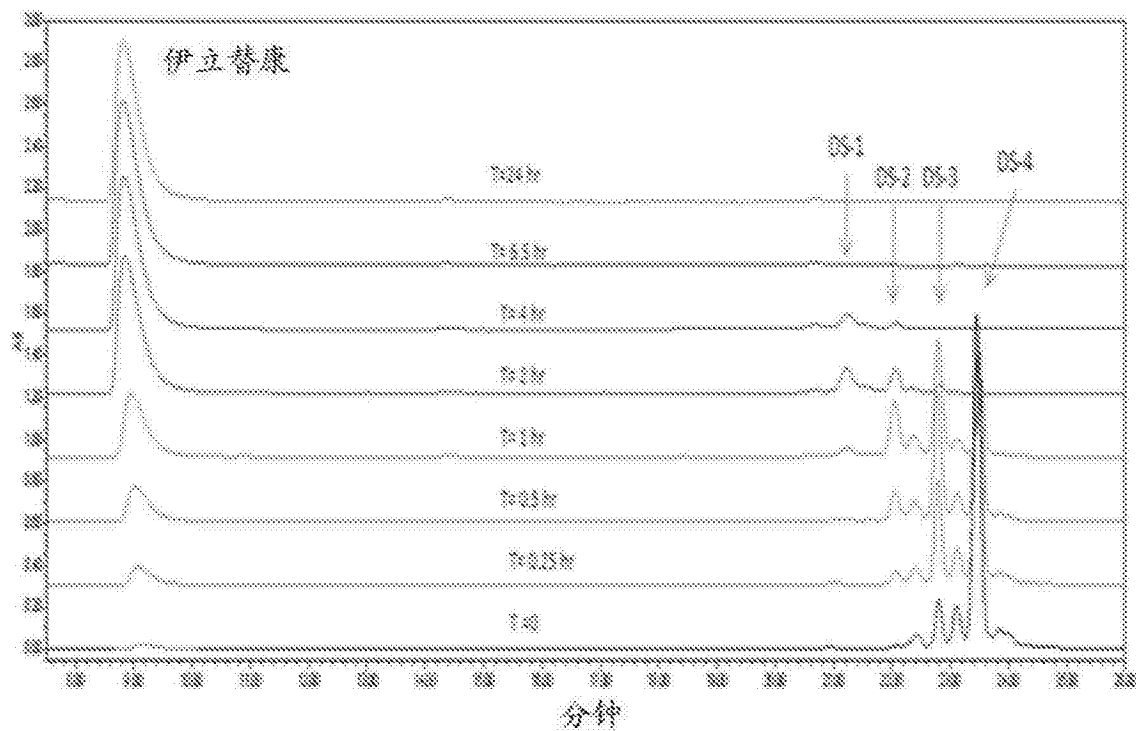


图4

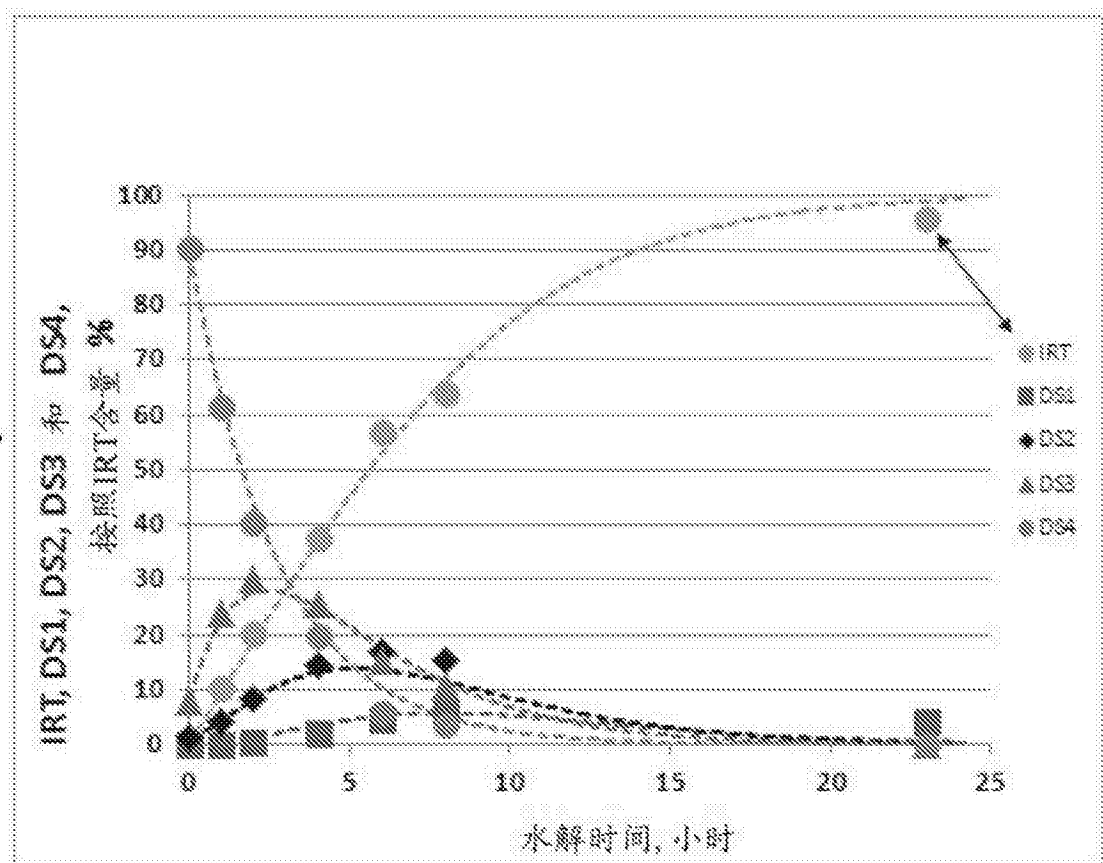


图5

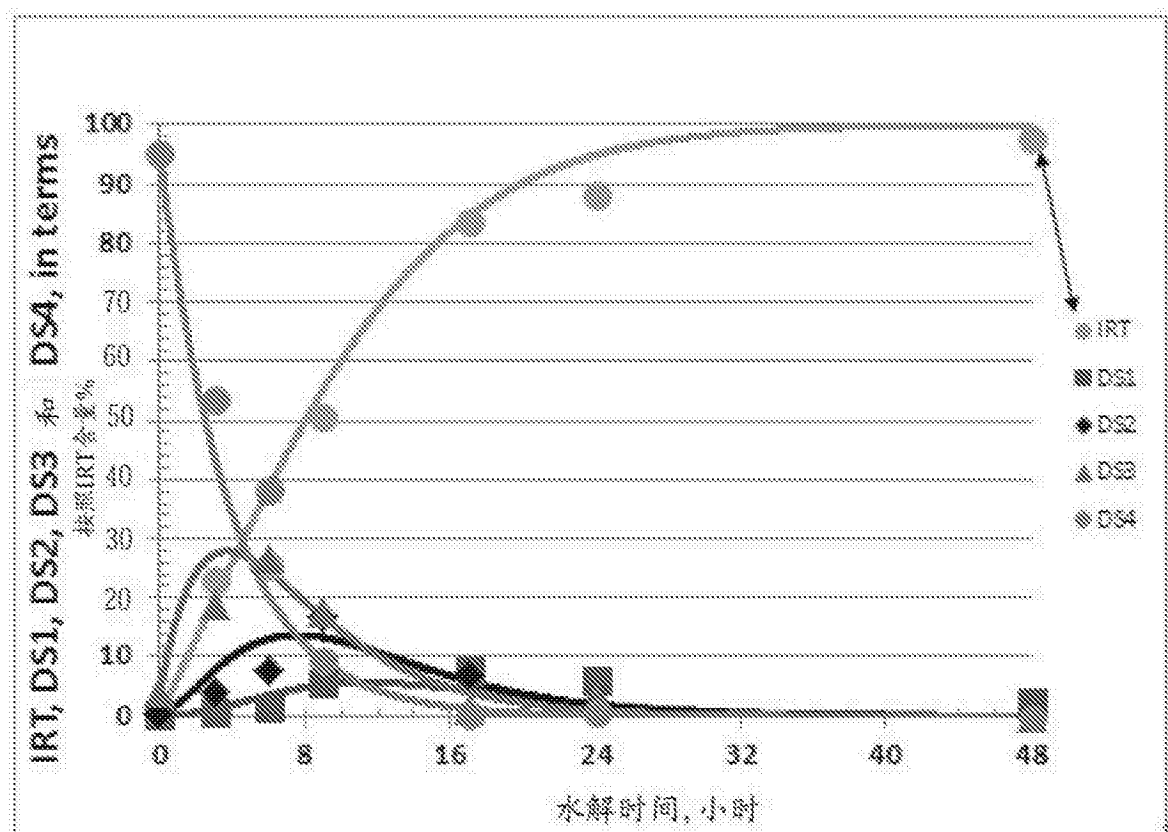
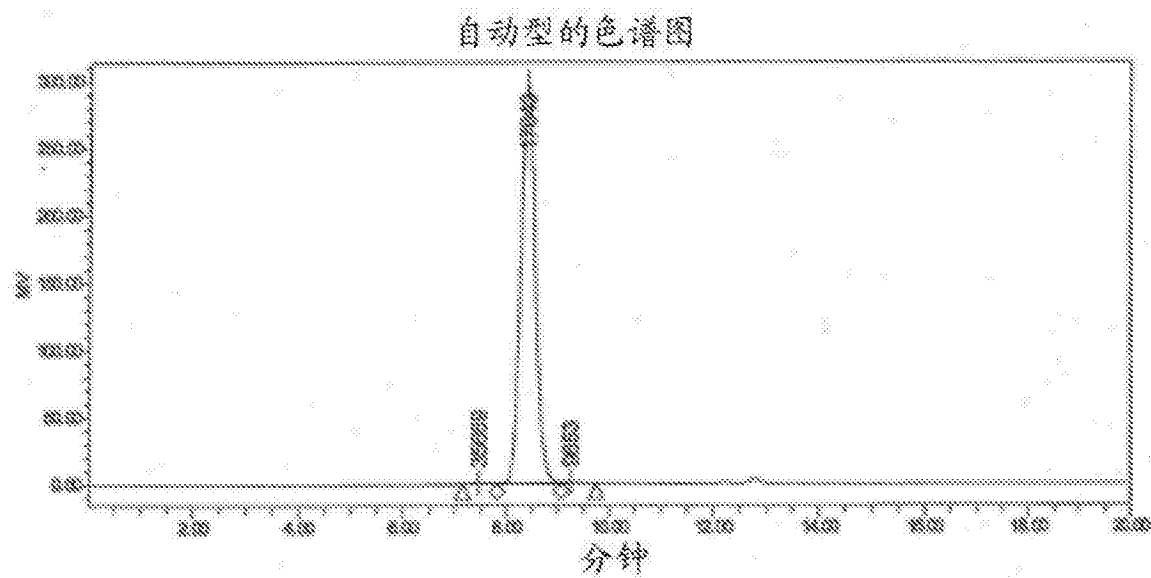
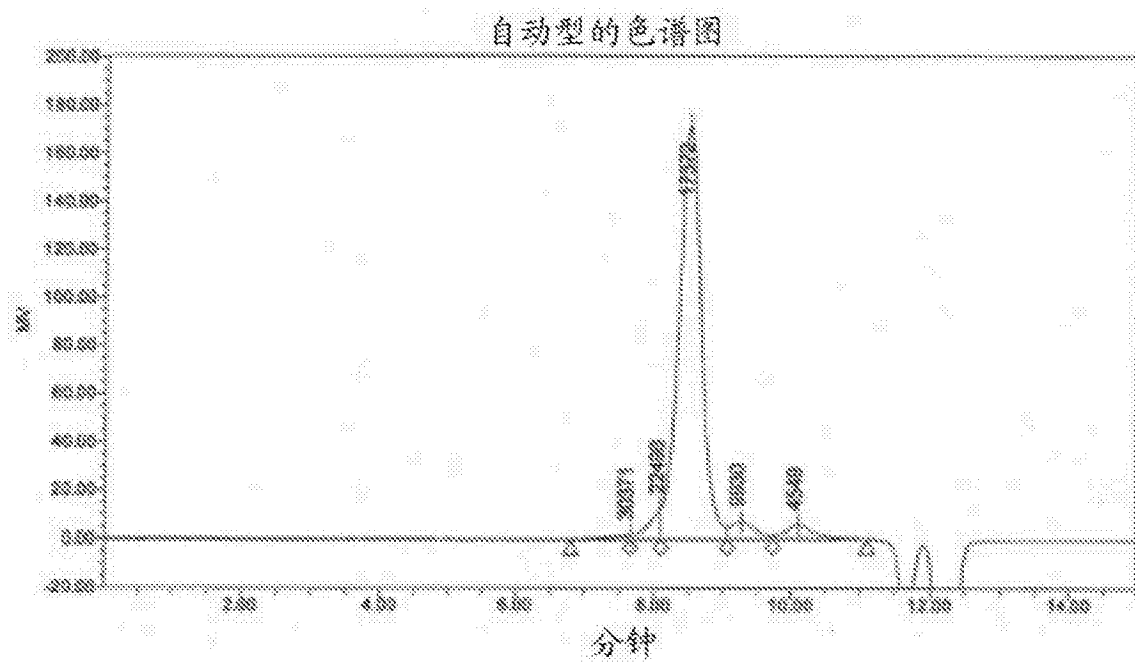


图6



	% 面积	保留时间	Mp	
1	0.42	7.465	35,669	高MW产物
3	99.14	8.404	17,643	4臂-PEG-20K
4	0.44	9.251	9,653	HO-PEG(10K)-OH

图7



	% 面积	保留时间	Mp	
1	0.60	7.650	30,371	高MW产物
2	3.33	8.100	22,498	高MW产物
3	88.56	8.495	17,372	4臂-PEG-20K
4	3.93	9.273	9,930	HO-PEG(10K)-OH
5	3.58	10.106	4,549	HO-PEG(5K)-OH

图8