

發明專利說明書 200426155

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：93103934

※ 申請日期：93.2.18

※IPC 分類：C07K14/47, C08G 63/91

壹、發明名稱：(中文/英文)

經活化之聚乙二醇酯類

ACTIVATED POLYETHYLENE GLYCOL ESTERS

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商法瑪西亞公司

PHARMACIA CORPORATION

代表人：(中文/英文)

J 崔佛 盧

LUMB, J. TREVOR

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國密蘇里州崔斯特菲爾德市西崔斯特菲爾德公路700號

700 CHESTERFIELD PARKWAY WEST, CHESTERFIELD, MISSOURI

63017-1732, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

參、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

菲 索 堤瓊

TJOENG, FOE SIONG

住居所地址：(中文/英文)

美國密蘇里州崔斯特菲爾德市西崔斯特菲爾德公路700號

700 CHESTERFIELD PARKWAY WEST, CHESTERFIELD, MISSOURI

63017-1732, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

肆、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003年02月19日；60/448,354

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於可用於將生物活性及醫藥用胜肽和蛋白質PEG化之聚乙二醇碳酸鹽活化酯類之製備。本發明涉及使用經活化之碳酸和草酸酯類以組成聚乙二醇混合性碳酸鹽活化酯類，其可再與一種連接子或直接與標的胜肽或蛋白質反應。

【先前技術】

許多胜肽類和蛋白質類已廣泛藉由基因工程技術開發成有用之藥物。然而，其醫療潛力通常因其為胜肽或蛋白質之本質特性而嚴重受限。此等分子可快速被蛋白酶代謝並快速經腎臟過濾而排出。再者，即使其序列只是類似人類蛋白質亦有可能誘發免疫反應。因此頃需藉由化學修飾開發生物安定性較高且長效之胜肽-或蛋白質基底性藥物。

聚乙二醇(PEG)係一種親水性、生物相容性且無毒之水溶性聚合物，其通式為 $\text{H}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ ，其中 $n>4$ 。其分子量為300至40,000道耳頓。

將PEG結合至蛋白質及/或胜肽上經證實可顯著提高其生物活性期限。PEG提供一種較安定之構形並增加分子大小，因此減少其代謝性降解及腎臟清除。再者，PEG化可降低免疫原性並改善胜肽或蛋白質之安定性。

已知多種PEG-蛋白質共軛物可避免蛋白質分解及/或具有降低之免疫原性[Monfardini等人，Biocon. Chem., 6, 62-69 (1995)；和Yamsuki等人，Agric. Biol. Chem., 52, 2185-2196

(1988)]。

PEG 結合為一種已藉由 Davis 和 Abuchowski 之研究 [Abuchowski, A. 等人, J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977) 和 J. Biol. Chem., 252, 3582 (1977)] 為先驅而建立之用以修飾胜肽和蛋白質之方法。將 PEG 結合至胜肽或蛋白質通常涉及 PEG 之活化並將活化之 PEG-中間產物直接與標的蛋白質/胜肽或偶合，或與一種連接子偶合，再隨後將之活化並偶合於標的蛋白質/胜肽。該結合之一關鍵課題係為用以活化 PEG 和 PEG-連接子之化學藥品，其可因而決定偶合效率和經活化 PEG 或 PEG-連接子對其標的物之專一性。

舉例言之，已知經三氯三嗪活化之 PEG 具毒性並無專一性，其後來被各種可與標的胜肽或蛋白質之胺基 [Benham C.O. 等人, Anal. Biochem., 131, 25 (1983); Veronese, F.M. 等人, Appl. Biochem., 11, 141 (1985); Zalipsky, S. 等人, Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. 等人, Europ. Polym. J., 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C. 等人, Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 119-128 (1990)]，硫氫基 [Sartore, L. 等人, Appl. Biochem. Biotechnol., 27, 45 (1991); 和 Morpurgo 等人, Biocon. Chem., 7, 363-368 (1996)] 或胍基 [Pande, C.S. 等人, Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 895-899 (1980)] 專一性反應之經活化 PEG 所取代。蛋白質 PEG 化之另一技術難題係因一種蛋白質或胜肽通常不僅含有不同之官能基，例如：胺基、胍基、羥基或硫氫基，且其數量亦為一個以上。結果，產物中會

含有具不同PEG-蛋白質化學計量之共軛物混合物。將PEG結合於生長荷爾蒙(GH)代表此等問題之一種典型實例[Clark, R.等人, J. Biol. Chem., 36, 21969-21977 (1996)]。經證實GH之Lys殘基於隨機位置被PEG化。蛋白質之定位PEG化仍為一種化學上之挑戰。

要提高PEG對蛋白質或胜肽之偶合專一性而不顯著降低其偶合效率, 常使用PEG之碳酸酯類以生成PEG-胜肽或PEG-蛋白質共軛物。N,N'-二琥珀醯亞胺基碳酸酯(DSC)可用以與PEG反應以生成活化之混合性PEG-琥珀醯亞胺基碳酸酯, 隨後使之與連接子之親核性基團或標的蛋白質/胜肽之胺基反應(美國專利第5,281,698號和美國專利第5,932,462號)。以類似型式之反應, 可將1,1'-(二苯并三唑基)碳酸酯和二-(2-吡啶基)碳酸酯與PEG反應以分別生成PEG-苯并三唑基和PEG-吡啶基混合性碳酸酯(美國專利第5,382,657號)。

然而, 碳酸酯類並不易製備。一般而言, 欲達良好之產率, 常於製備中使用光氣。此試劑於大規模合成中可能難以處理且危險。因此, 使用其他類似之活化酯類, 例如製備自草醯氯之N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯和1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并-三唑基]草酸酯可能較佳且於PEG混合性活化碳酸酯類之製備中較安全。再者, 草酸活化酯類之製備可能較碳酸活化酯類更為經濟。

【發明內容】

本發明說明一種用以製備一種活化聚合物酯類之方法,

該酯類係用以連接至有或無連接子之生物活性親核物。更特定言之，本發明係關於一種用以製造一種經活化之聚乙二醇(PEG)酯之方法，其包含使至少具有一個游離羥基之聚乙二醇(PEG)於適當之反應條件下與草酸酯反應以生成一種PEG活化酯類。使用於本發明之草酸酯類係為N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯和1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯。

經證實，產生之PEG活化酯可於適當條件下以特定方式與生物活性親核物反應(美國專利第5,281,698號，美國專利第5,650,234號和美國專利第5,932,462號)。更特定言之，其可與胜肽或蛋白質之胺基而生成聚合物和胜肽或蛋白質之間之胺基甲酸酯鍵。

本發明之另一具體實施例係為藉由說明於本發明中之方法所製備之PEG混合性碳酸活化酯類。較佳者，該PEG混合性碳酸活化酯類包括例如：PEG-琥珀醯亞胺基和PEG-6-(三氟甲基)苯并三唑基混合性碳酸酯類。

本發明之另一具體實施例係為藉由說明於本發明中之方法所製備之具或不具連接子之PEG-生物活性親核物共軛物。較佳者，該PEG-生物活性親核物共軛物包括具或不具連接子之PEG-胜肽和PEG-蛋白質共軛物。

本發明之另一具體實施例中，該PEG-生物活性親核物較佳為一種胜肽或一種蛋白質。本發明涵括之較佳蛋白質為揭示於美國專利第4,658,021號和美國專利第5,633,352號之人類GH與抗體或其片段，例如：抗TNF α 抗體、抗人類GH

受體抗體、抗C-Met抗體和抗IGF-1受體抗體。

較佳之 TNF_α 抗體係為CDR-接枝性、hTNF40-基底性經修飾Fab，如先前揭示於美國專利申請案2002/151682 A1者。

於本發明之另一具體實施例中，PEG活化酯係先與一種連接子反應，再偶合至一種生物活性親核物。更特定者，舉例言之，該PEG活化酯係與過量之1,3-二氨基丙烷反應。再將產生之 $(\text{PEG})-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 共軛物與N-羧甲基蘋果醯亞胺偶合。再將此等PEG-連接子共軛物與一種生物活性親核物，更特定者，與一種抗體或抗體片段之Cys殘基，例如：與一種抗- TNF_α 之經修飾 F_{ab} 偶合以生成CDP 870。CDP 870，一種經PEG化、抗- TNF_α 之經修飾 F_{ab} ，係為一種有效之抗風濕性關節炎抗體。

另一具體實施例係為一種治療需要之患者之方法，其藉由投予醫療有效量之以揭示於本發明之方法製備之PEG-胜肽或PEG-蛋白質共軛物。

本發明之草酸酯類可為市售或可簡易且低成本製備者。其製備涉及使用草醯氯取代光氣。於大規模合成中，草醯氯較光氣容易操作且較安全。由於起始原料之較低成本和較高之總產率，故草酸酯類之製備會比對應之碳酸酯類更為經濟。此外，草酸酯類通常較碳酸酯類更安定且可於室溫下維持一段長時期。再者，如上述討論，PEG活化酯類具有專一性提高之優點。

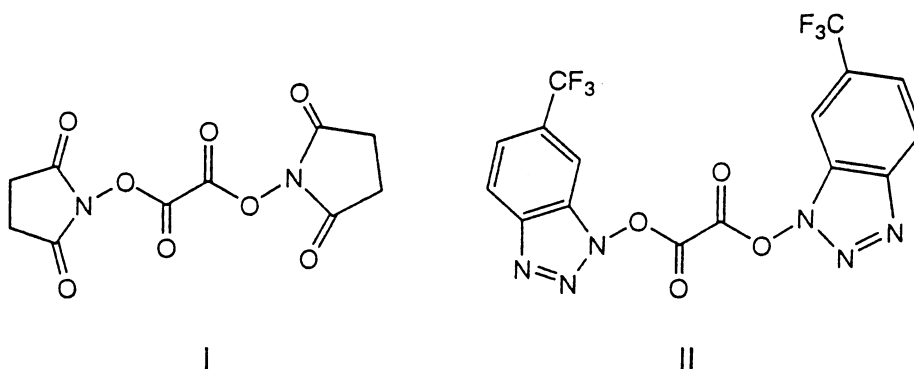
因此，此等試劑應可對於日漸重要之用於各種疾病之治療之PEG化胜肽和蛋白質之製備提供額外之改善。此等PEG

化方法可改善胜肽或蛋白質之溶解度，降低其免疫原性和提高其代謝安定性。

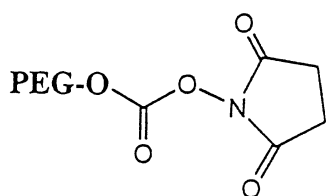
發明之詳細說明

化學

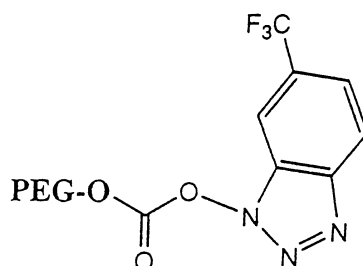
類似於碳酸酯類[Takeda, K.等人，Tetrahed. Lett., 24, 4569- 4572 (1983)]，草酸酯類，例如：N,N'-二琥珀鹽亞胺基草酸酯(I, DSO)和1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯(II)已被成功地應用於胺基甲酸酯衍生物之製備和胜肽之合成[Takeda, K.等人，Tetrahed lett., 24, 4451-4454 (1983)；J. Org. Chem., 50, 273-275 (1985)；Ghosh, A.K., Tetrahed. Lett., 33, 2781-2784 (1992)]。然而，將此等試劑與PEG反應以生成碳酸活化酯類尚未被發表。



本發明係關於使用此等試劑於經活化之PEG碳酸酯(III和IV)之製備中，該酯類可用以合成PEG化生物活性親核物，更特定言之，為PEG化胜肽或蛋白質。此等方法可改善胜肽或蛋白質之溶解度，降低其免疫原性和提高其代謝安定性。



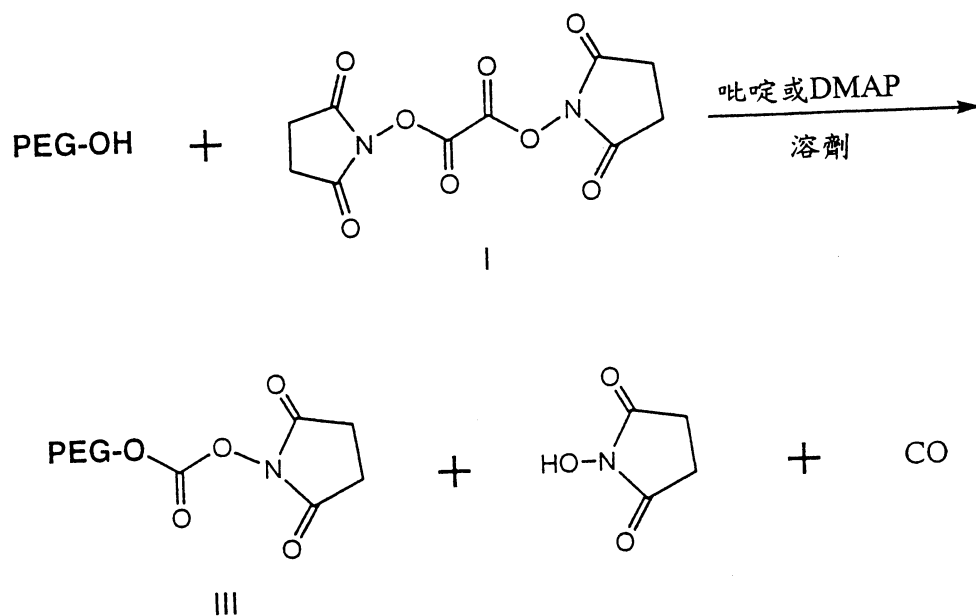
III



IV

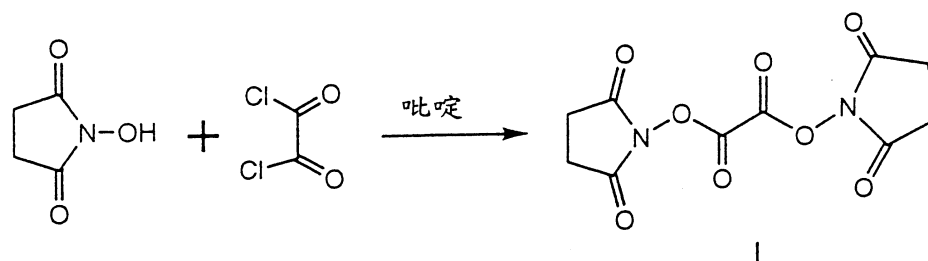
於本發明之一具體實施例中，該方法係由一種 PEG 與 N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯 (I) 於一種鹼性觸媒存在下生成化合物 III 之反應所構成，如流程圖 I 之說明。適用於此且均與草酸或碳酸活化酯類一同進行反應之鹼性觸媒包括：有機鹼類，例如：吡啶和 N,N'-4-二甲基胺基吡啶 (DMAP)。

流程 I



N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯(I)可根據K. Takeda所說明之程序[Tetrahed. Lett., 24, 4451-4454 (1983)]於吡啶存在之下自N-羥基琥珀醯亞胺和草醯氯製備，如流程圖II。

流程 II



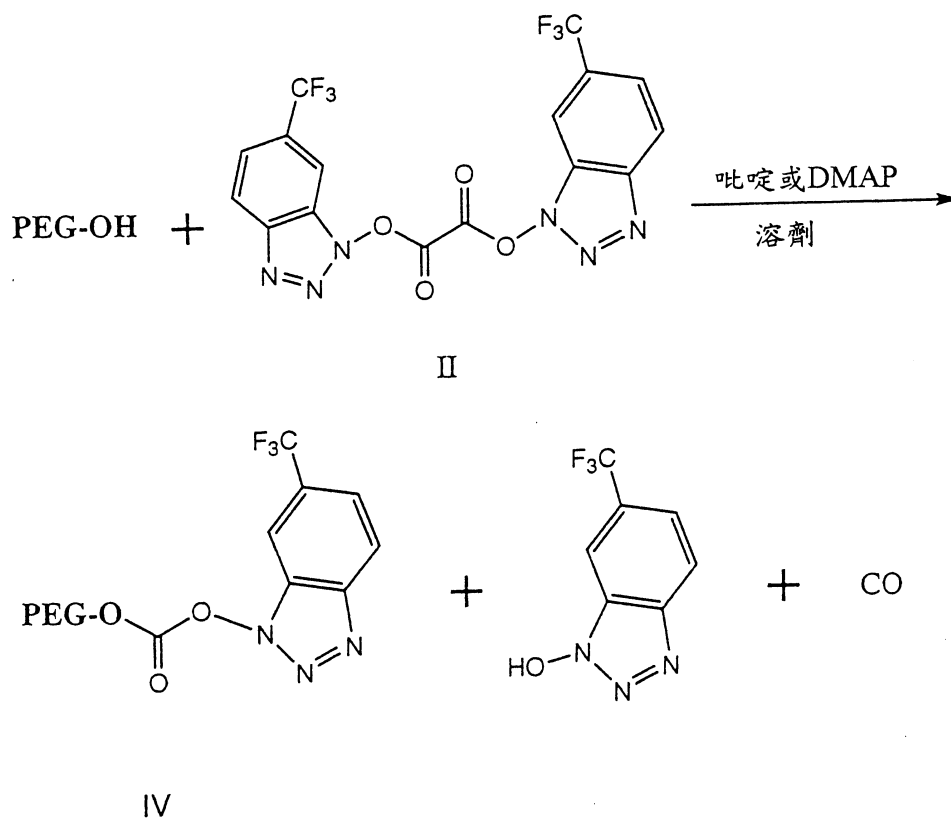
咸知吾人縱然僅提及聚乙二醇(PEG)，但其他所有列舉於本發明中之PEG均可使用。一般而言，PEG之聚合物各端點均具有一個游離羥基基團。較佳者，使用於本發明之PEG至少具有一個端點羥基基團。此羥基經活化可與蛋白質或連接子之一個游離胺基基團反應。於此例中，於N,N'-4-二甲基胺基吡啶或吡啶存在之下，使PEG與N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯反應以生成一種相對安定且活化之N-琥珀醯亞胺基碳酸酯。此等PEG活化酯可再專一性與胜肽或蛋白質之胺基基團反應以生成安定之胺基甲酸酯鍵。

或者，PEG活化酯可與一種連接子，例如： ω,ω -胺基烷或胺基烷醯酸之胺基反應。隨後，將PEG-連接子共軛物活化或與另一經活化部分反應，並再與胜肽或蛋白質之胺基基團偶合。

於本發明之另一具體實施例中，將PEG於一種鹼存在之

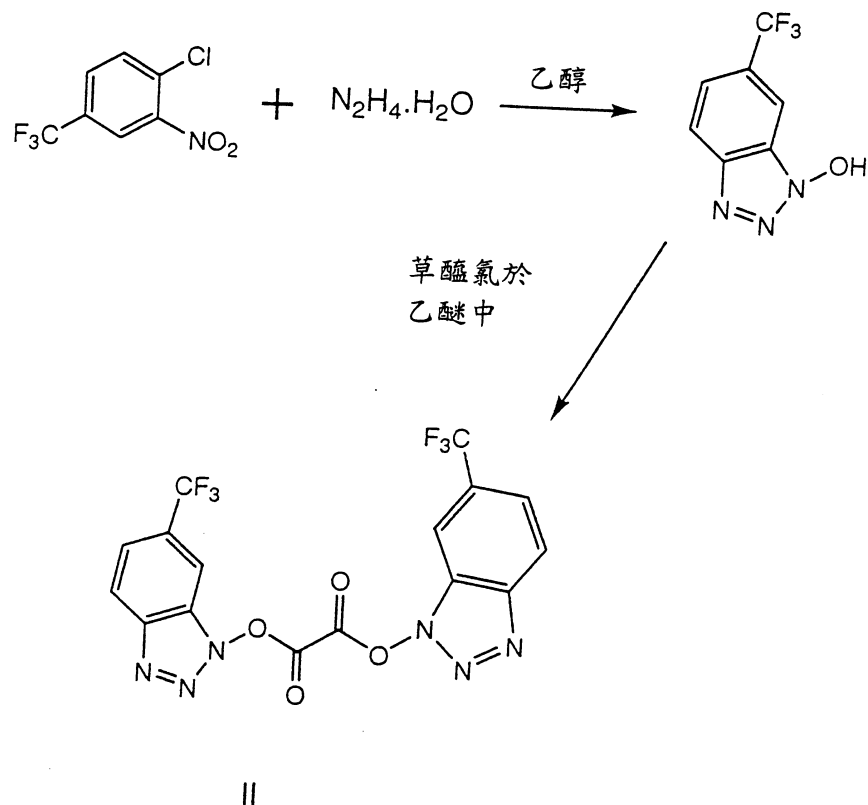
下與 1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯(II)反應以生成化合物IV，如流程圖III之說明。

流程 III



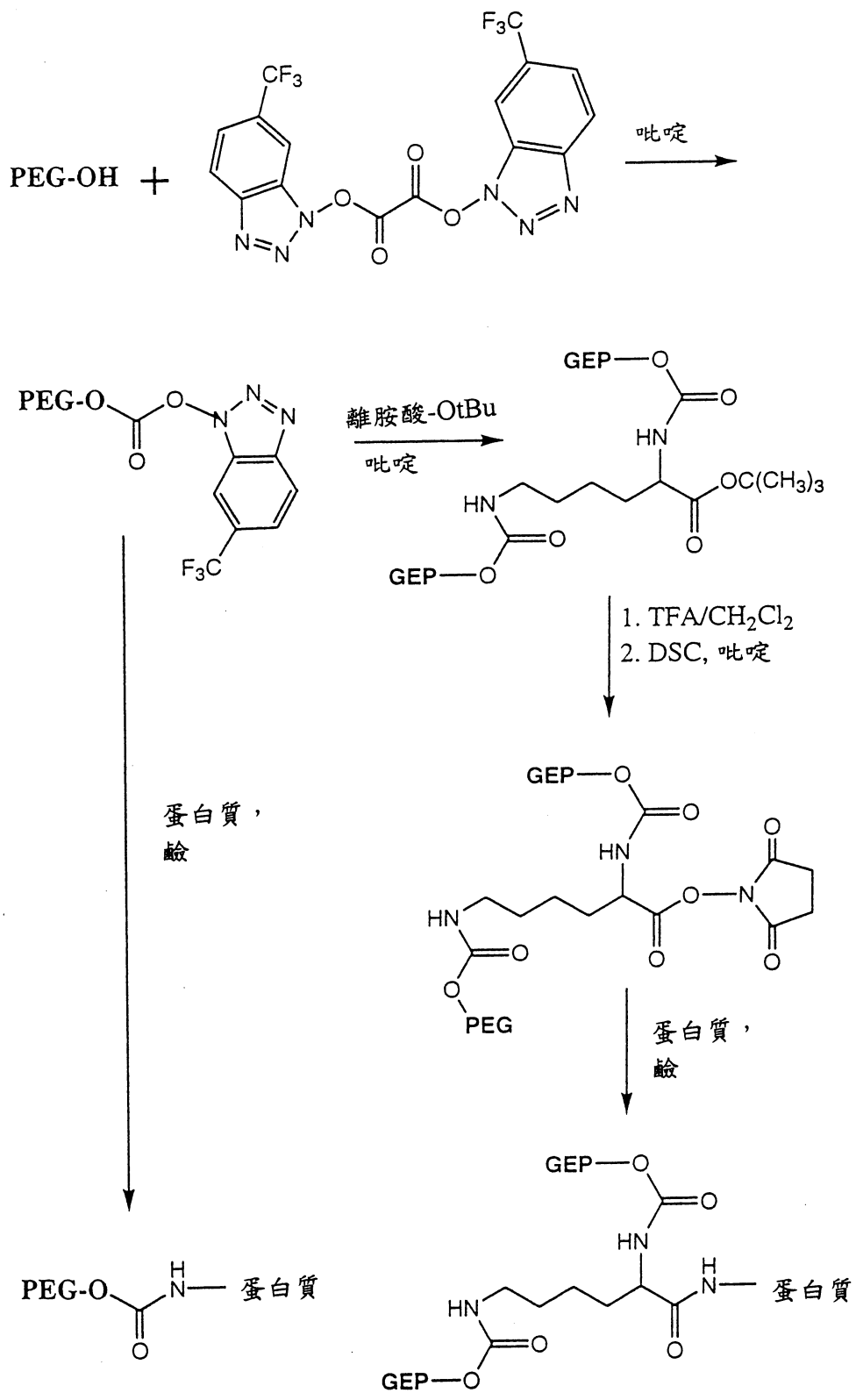
類似於PEG與N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯(I)之反應，此反應係由一種有機鹼催化，例如：吡啶或DMAP。起始原料：1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯之可藉由K. Takeda所說明之兩步驟程序[J. Org. Chem., 50, 273-275 (1985)]自4-氯-3-硝基- α,α,α -三氟甲苯製備，如流程圖IV顯示。

流程 IV

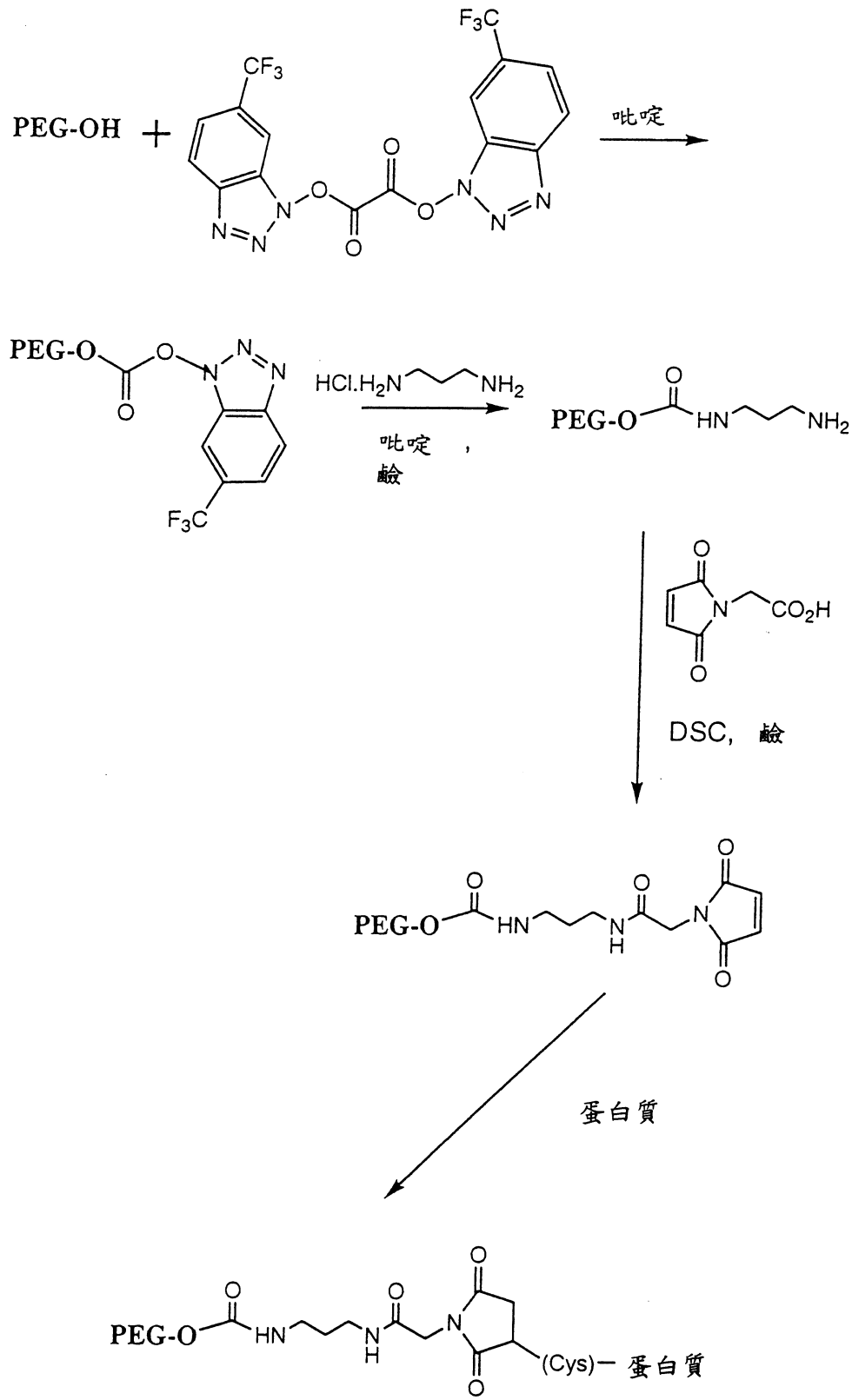


隨後，將此等PEG活化酯中間物經由胺基甲酸酯鍵共價性偶合至標的胜肽或蛋白質之胺基基團。或者，將此等中間物先偶合至一或多種連接子，例如： ω,ω -胺基烷、N-羧基烷基蘋果醯亞胺或胺基烷醯酸，並再經或不經進一步活化，偶合至一種胜肽或一種蛋白質之胺基或硫醇基團，如下列流程圖V、VI和VII之說明。

流程 VI



流程 VII



蛋白質合成和純化

用於結合之胜肽和蛋白質之製備可利用此項技藝中已完整建立之技術，包括合成技術(例如：重組技術和胜肽合成或此等技術之組合)或可分離自胜肽或蛋白質之內生性來源。使用之胜肽合成法包括固相胜肽合成和典型之溶液胜肽合成技術。於本發明之某些具體實施例中，選用之蛋白質係為一種抗體。用以生產抗體之技術如下：

多株抗體：多株抗體一般係藉由多重皮下(sc)或腹膜內(ip)注射相關抗原和一種輔劑於動物體內生產。可利用一種雙官能基連接子，例如：磺酸琥珀鹽亞胺蘋果鹽亞胺苄基酯、戊二醛或丁二酸酐將相關抗原結合於一種對於欲免疫之物種具免疫原性之載體蛋白質，例如：鑰孔蟲血藍蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、牛甲狀腺素球蛋白、血清白蛋白或大豆胰蛋白質酶抑制劑上。

單株抗體：單株抗體可自一種實質相同之抗體族群取得，即：該族群包含之個別抗體均相同，除了可能存在之少量自然發生性突變之外。舉例言之，單株抗體之製備可利用由Koehler等人首度說明於Nature 256, 495 (1975)之融合瘤技術，或可藉由重組DNA法(美國專利第4,816,567號)製造。

於融合瘤法中，將老鼠或其他適合之動物，例如：倉鼠予以免疫以誘發生產或可生產會專一性結合於免疫用蛋白質之抗體之淋巴細胞。或者，可於活體外將淋巴細胞免疫。再使用適當之融合劑，例如：聚乙二醇，將淋巴細胞與骨

髓瘤細胞融合以生成融合瘤細胞 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)。

將製得之融合瘤細胞接種並生長於適當之培養基中，其較佳為含一或多種可抑制未融合之母骨髓瘤細胞之生長或存活之物質。分析融合瘤細胞生長之培養基中生產之抗該抗原之單株抗體。於確認融合瘤細胞可生產具所欲專一性、親和力，及/或活性之抗體之後，將藉由限制性稀釋步驟該選植株次選殖並以標準方法使之生長 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)。將次選植株分泌之單株抗體自培養基、腹水液或血清中適當分離出來，其可藉由慣用之免疫球純化技術，例如：蛋白質 A-Sepharose、羥磷灰石色層分析、膠體電泳、透析或親和性層析。

人類化和人類抗體：用以將非人類抗體人類化之方法係為此項技藝中已被熟知者。一般而言，人類化之抗體具有一或多個由其來源導入之非人類胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基常被稱為"外來"殘基，其典型係來自"外來"變異功能區域。人類化之進行必需依循下列 Winter 和其伙伴之方法 [Jones 等人, *Nature*, 321, 522-525 (1986); Riechmann 等人, *Nature*, 332, 323-327 (1988); Verhoeyen 等人, *Science*, 239, 1534-1536 (1988)]，藉由將齧齒動物之 CDRs 或 CDR 序列取代為人類抗體之相對應序列。據此，此等"人類化"抗體為嵌合抗體(美國專利第 4,816,567 號)，其中實質上少於

一個完整的人類變異功能區域被來自非人類物種之相對應序列所取代。

或者，現今可生產轉基因動物(例如：小鼠)，其可經免疫而生產全套人類抗體而不生產其內生性免疫球蛋白。參見例如：Jakobovits等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2551 (1993)；Jakobovits等人，*Nature*, 362, 255-258 (1993)；Brueggermann等人，*Year in Immuno*, 7, 33 (1993)。人類抗體亦可自噬菌體展示庫取得[Hoogeboom等人，*J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991)；Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222, 581-597 (1991)]。

調配物

如上述說明製備出所欲胜肽或蛋白質之後，製備一種預凍乾調配物。存在於預凍乾調配物中之蛋白質量取決於其所欲之最終劑量體劑，投予之模式等。蛋白質通常呈溶液型式。

於預凍乾調配物中加入冷凍保護劑。於較佳之具體實施例中，預凍乾調配物中之冷凍保護劑含量一般為可使其於復水時，所得之調配物呈等張狀態。然而，高張性復水調配物亦適用。當冷凍保護劑為一種糖且蛋白質為一種抗體時，預凍乾調配物中之冷凍保護劑示例性濃度為約5 mM至約500 mM，且較佳為約20 mM至約300 mM，且最佳為約40 mM至約100 mM。

蛋白質與冷凍保護劑之比例係依各種蛋白質和冷凍保護劑加以選定。於以一種抗體為蛋白質且以一種糖為冷凍保

護劑以產生一種具有高蛋白質濃度之等張性復水調配物之例中，冷凍保護劑與抗體之莫耳濃度比可為約50至約1500莫耳對1莫耳抗體，且較佳為約200至約1000莫耳對1莫耳抗體。

於本發明之另一具體實施例中，發現較佳於預凍乾調配物中加入一種界面活性劑。或者，或此外，界面活性劑可加至經凍乾之調配物及/或經復水之調配物中。界面活性劑之示例包括：等張性界面活性劑，例如：聚山梨醇酯、屈同(triton)、泊洛沙姆(Poloxamer)、硫酸十二酯鈉、硫酸月桂酯鈉、聚乙二醇、聚丙二醇等。界面活性劑之添加量係可減少經復水蛋白質之聚集且使復水後之調配物粒狀物減至最少。

於本發明之另一具體實施例中，使用冷凍保護劑(例如：葡萄糖、果糖、蔗糖、麥芽糖或海藻糖)和一種膨化劑(例如：甘露醇或甘油)之混合物於預凍乾調配物之製備中。

其他醫藥上可接受之載體、賦形劑或安定劑，例如彼等說明於Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)中者，可包含於預凍乾調配物中，倘若其對於所欲之調配物特性無不良影響。

本文中之調配物亦可視需要含有一種以上之蛋白質以治療特定之病徵，其較佳為具有對其他蛋白質無不良影響之互補活性。用於活體內之調配物需經滅菌。其可於凍乾和復水之前或之後通過無菌膜過濾來達成。或者，混合物整體之滅菌亦可藉由殺菌釜將蛋白質以外之成份於約120°C

之下滅菌約30分鐘。

將蛋白質、冷凍保護劑和其他視需要之成份混合之後，將調配物凍乾。市售許多不同之冷凍乾燥器可達此目的。一般而言，以團塊型式將蛋白質調配物凍乾。於一些實例中，可將蛋白質調配物於容器中凍乾，再直接於該容器中進行蛋白質之復水以免除轉移步驟。

凍乾調配物之復水

於適當時機，典型係於將蛋白質投予患者時，可以稀釋劑將凍乾調配物復水，使復水調配物之蛋白質濃度至少為30毫克/毫升，例如：為約30毫克/毫升至約500毫克/毫升。

復水通常於約25℃之溫度下進行以確保完全水合，雖然其他溫度亦可能適用。復水所需之時間取決於例如：稀釋劑之型式、賦形劑和蛋白質之含量。示例性稀釋劑包括無菌水、注射用之靜菌水、一種經pH緩衝之溶液、無菌生理鹽水、Ringer's溶液或葡萄糖溶液。稀釋劑可視需要含有一種防腐劑，例如：苧醇或酚。防腐劑之用量係藉由蛋白質對於不同防腐劑濃度之相容性評估和防腐效力測試來決定。

復水調配物之投予

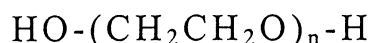
根據已知之方法，例如：散裝靜脈內投予或藉由於一段時期內連續注射，藉由腹膜內、肌內、腦脊髓內、皮下、關節腔內、滑膜內、椎管內、經口局部或吸入途徑將復水調配物投予需要胜肽或蛋白質治療之哺乳動物，較佳為人類。

於一較佳之具體實施例中，復水調配物係藉由皮下投予哺乳動物。針對此目的，可利用注射筒注射該調配物。然而，亦可使用其他用以投予調配物之裝置，例如：注射裝置、注射筆、不打針裝置，和皮下貼片傳送系統。

蛋白質之適當劑量係取決於，例如：欲治療之病症、病症嚴重度和時程、蛋白質之投予是否有預防或治療目的、先前之治療、患者之臨床病史和對蛋白質之反應、使用之蛋白質型式，和主治醫師之判斷。蛋白質可一次或於一系列治療期間適度投予患者並可於經診斷後之任意時間投予患者。蛋白質可單獨投予或連同其他可用以治療待治病症之藥物或療法一起施予。若選用之蛋白質為一種抗體，其投予患者之初始劑量較佳為約0.1-25毫克/公斤，無論為例如下：一或多次分開投予。然而，其他劑量亦可使用。此治療之進展可藉由慣用之技術簡易地追蹤。

以下列出本文中使用的各種辭彙之定義。

本文所使用之"PEG"係指任意之數種乙二醇之縮合聚合物，其具有由下列構造所代表之通式



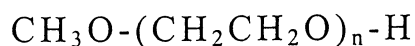
其中n可為約5至約1100。PEG之平均分子量介於300至60,000道耳頓之間。使用於本發明中之PEG之平均分子量較佳為介於2,000至40,000道耳頓之間。更佳為介於5,000至20,000道耳頓之間。

"PEG"亦稱為聚氧乙烯、聚乙二醇和聚乙二醇醚。該聚合物可為同質聚合物或嵌段共聚物(block co-polymer)、直鏈

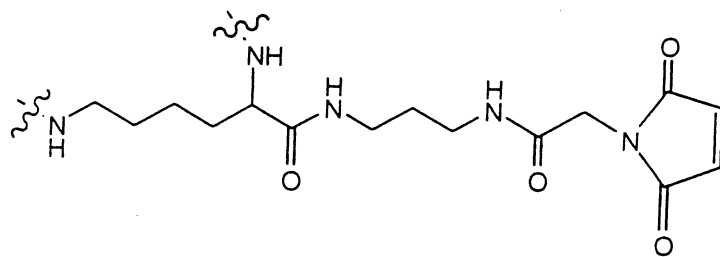
或具支鏈者、未經取代或經取代，較佳為具低碳數烷基、低碳數羥烷基和低碳數烷氧基基團。

"PEG"亦指包括水溶性聚氧乙烯化聚乙二醇類，例如：聚氧乙烯化山梨醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化甘油等。

本文所使用之"mPEG"係指一種PEG，其一端具有甲基基團。mPEG之代表性構造為



本文所使用之"連接子"一辭係指將PEG連接至生物活性親核物之分子片段。該片段典型具有兩個官能基團，其可偶合至或經活化而與另一連接子或直接與生物活性親核物反應。舉例言之， ω -胺基烷醯酸，例如：離胺酸係普遍使用者。於本發明中，亦使用多重連接子將PEG連接於標的胜肽或蛋白質，即：



本文所使用之"胺基烷醯酸"一辭係指於分子骨架中具有一或多個胺基之羧酸。該胺基可位於端點或位於內部或二者，例如：離胺酸。

本文所使用之"生物活性親核物"係指一種化合物，其至少含有一個親核性部分，更特定者，係指生物活性胜肽類和蛋白質類。

本文所使用之"胜肽"一辭係指一種約2至約50個天然胺基酸短鏈之短分子。該胺基酸亦可包括非天然胺基酸，例如： β -胺基酸或D-胺基酸。

本文所使用之"蛋白質"一辭係指長鏈之胺基酸基底性聚合物(聚胜肽)，其足以產生較高級層次之三級和四級構造。蛋白質可由單一或多條聚胜肽鏈所組成，可為線狀或環狀，並可進一步經取代，例如：磷酸酯化或糖苷化。蛋白質之大小涵蓋相當廣泛之範圍，其自約50至1000個以上之胺基酸。

涵括於本文之定義中之胜肽和蛋白質包括：哺乳動物之胜肽和蛋白質，例如：胰島素、昇糖素、血管加壓素、降鈣素、血管活性腸肽(VIP)、 α -黑素細胞刺激素(α -MSH)、分泌素、膽囊收縮素(CCK)、內皮素、生長抑制素、P物質(substance P)、副甲狀腺激素(PTH)、催產素、強啡肽、促腎上腺皮質激素(ACTH)、抗體、生長荷爾蒙(GH)，包括：人類和牛生長荷爾蒙、生長荷爾蒙受體拮抗劑、生長荷爾蒙釋放因子(GRF)、上皮生長因子(EGF)、轉形生長因子(TGF) α 和 β 、類胰島素生長因子(IGF) I和II、間白素、干擾素 α 、 β 和 γ 、腫瘤壞死因子(TNF) α 及 β 、血小板衍化生長因子、粒細胞集落刺激因數、粒細胞巨噬細胞集落刺激因數、紅血球生成素、血小板生長刺激素、FLT-3、超氧歧化酶(SOD)、免疫毒素、調節性蛋白質、運送蛋白質和生物活性片段或上列聚胜肽之任意變體。

本文所使用之"抗體"一辭係採其最廣義並指多株抗體、

單株抗體、人類化抗體，和其片段，例如： F_{ab} 、 $F_{(ab)2}$ 、 F_v ，和任何具有抗原結合功能之片段或母抗體。

本文所使用之"單株抗體"一辭係指一種具有同質抗體群之抗體組合物。該名辭涵括免疫球蛋白整體和其片段，例如： F_{ab} 、 $F_{(ab)2}$ 、 F_v ，和任何具有抗原結合功能之片段或母抗體。再者，該名辭亦包括"嵌合"抗體，其中一部分之重鏈及/或輕鏈係與衍生自特定物種或屬於特定種或亞種之抗體之相對應序列相同或同質，然而鏈之其他部分則與衍生自另一物種或屬於另一種或亞種之抗體之相對應序列相同或同質，和此等抗體之片段，只要其具有所欲之生物活性。

本文所使用之"人類化抗體"一辭係指一免疫球蛋白中之至少一部分框架區衍生自人類免疫球蛋白序列。

本文所使用之"PEG化"或"經PEG化"胜肽/蛋白質係指一種將一或多個PEG分子共價性連接至一種胜肽或蛋白質以生成PEG化胜肽/蛋白質之方法。

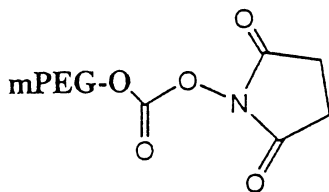
本文中列舉之所有專利和參考文獻均整體併列為本文之參考。

本發明提供利用N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯或1,1'-雙[6-(三氟甲基)-苯并三唑基]草酸酯來製備PEG活化碳酸酯類之方法。產生之PEG活化酯類再用以製備PEG-胜肽或PEG-蛋白質共軛物。N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯可由市售購得且1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]-草酸酯可根據已公開之步驟製備之。

描述於流程圖 I-VII 之一般合成順序僅用以說明本發明，且不能用以限制其範圍或精神。熟習此項技藝者明白其可將描述於流程圖和實例中之條件和方法之已知變化應用於本發明中。

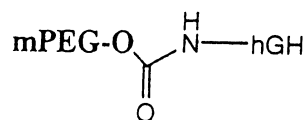
【實施方式】

實例 1



室溫下，將 N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯 (5.7 公克，20 毫莫耳) 和單甲基聚乙二醇 (mPEG，分子量 6,000；6 公克，1 毫莫耳) 於吡啶 (2 毫升) 存在之下，於二氯甲烷 (50 毫升) 中攪拌過夜。將固體過濾並以乙醚 (600 毫升) 處理濾液。將白色沉澱物濾出並以乙醚徹底洗滌。將該沉澱再溶於二氯甲烷 (40 毫升) 並以乙醚 (500 毫升) 處理。將此程序重複一次以得到呈白色固態物質之標題化合物 (5.85 公克)。

實例 2

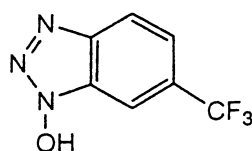


於 pH 8.5 之 0.2 M 硼酸緩衝液中製備濃度為 2 毫克/毫升之人類生長荷爾蒙 (hGH) 溶液。將實例 1 之化合物以小量加入該蛋白質溶液中使其蛋白質：mPEG 活化酯之莫耳濃度比約為 5:1。將該反應混合物攪拌約 2 至 3 小時。mPEG-hGH 共軛

物之純化係藉由在 Amicon 系統中以 PM 10 濾膜(分子量截止值為 10,000)超濃縮並過濾去除反應產生之 N-羥基琥珀醯亞胺。於 Pharmacia Superose 12 管柱中進行膠體過濾以進一步將共軛物從過量之未反應 mPEG 中純化出來。將濾液凍乾可得白色固態產物。

實例 3

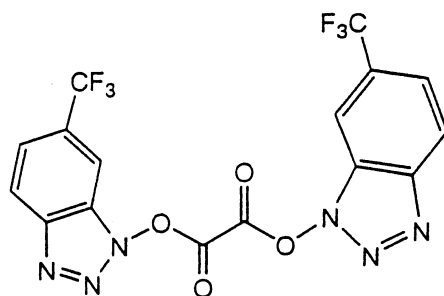
1-羥基-6-(三氟甲基)苯并三唑



根據 K. Takeda [J. Org. Chem., 50, 273, (1985)] 描述之步驟製備標題化合物。將溶於無水酒精(75 毫升)之 4-氯-3-硝基- α,α,α -三氟甲苯(50.0 公克, 0.22 莫耳)和聯胺水合物(33.0 公克, 0.33 莫耳)迴流 24 小時。於減壓下去除溶劑之後, 將殘留物溶於 10% 碳酸鈉水溶液中。以乙醚洗滌該溶液以去除起始物質並以濃 HCl 酸化以使產物沉澱, 再以水加以洗滌並乾燥得到 40.0 公克之標題化合物。將此產物從乙醚中再結晶。

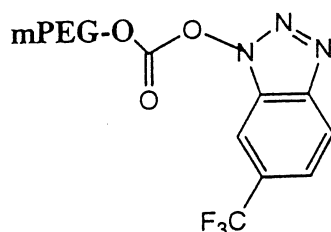
實例 4

1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯(BTBO)



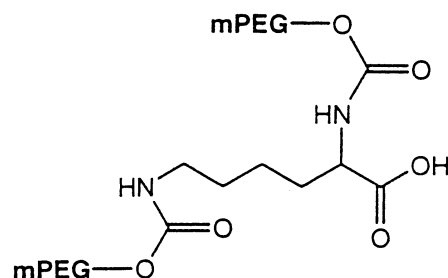
根據 K. Takeda [J. Org. Chem., 50, 273, (1985)] 描述之步驟製備標題化合物。將溶於無水乙醚(600毫升)之實例3(40.6公克, 0.2莫耳)之溶液以機械頭攪拌器劇烈攪拌, 此時於室溫下慢慢加入草醯氯(50.0公克, 0.4莫耳)。攪拌3小時之後, 將白色沉澱物濾出並以無水乙醚及少量無水丙酮洗滌之。不需進一步再結晶即可得到標題化合物(35.0公克)。

實例 5



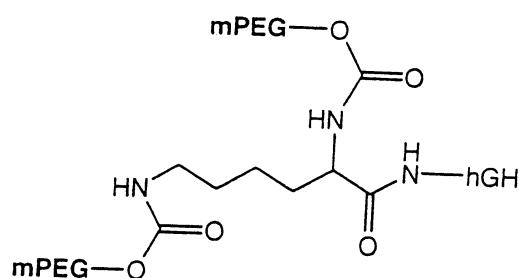
室溫下, 將 1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯(9.2公克, 20毫莫耳)和單甲基聚乙二醇(mPEG, 分子量6,000; 6.0公克, 1.0毫莫耳)於吡啶(5毫升)存在之下, 於二氯甲烷(70毫升)中攪拌過夜。將固體過濾並以700毫升乙醚處理濾液。將白色沉澱物濾出並以乙醚徹底洗滌。將該沉澱再溶於二氯甲烷(60毫升)並以乙醚(600毫升)處理。將此程序重複一次以得到呈白色固態物質之標題化合物(5.9公克)。

實例 6



於室溫下，將實例5之標題化合物(5.9公克，1.0毫莫耳)、離胺酸第三丁基酯HCl(0.53公克，2.0毫莫耳)和二異丙基乙胺(0.26公克，2毫莫耳)於DMF/吡啶(1:1；50毫升)中攪拌過夜。於反應混合物中加入乙醚(600毫升)並將沉澱過濾。將沉澱於真空乾燥器中乾燥並以溶於二氯甲烷之三氟醋酸(200毫升)處理30分鐘。於溶液中加入乙醚(500毫升)並將沉澱過濾。將該固體再溶於二氯甲烷(75毫升)並加入乙醚(500毫升)。將沉澱過濾並以乙醚徹底洗滌。乾燥之沉澱物不需任何進一步純化即可使用。

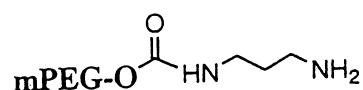
實例 7



將實例6之標題化合物(3公克)和N,N'-二琥珀醯亞胺基碳酸酯(DSC；2.5公克，10毫莫耳)溶於DMF(30毫升)中。加入吡啶(5毫升)之後，將反應混合物於室溫下攪拌過夜。將固體過濾並以乙醚(400毫升)處理濾液。濾出白色沉澱物並以無水乙醚徹底洗滌。將該沉澱物再溶解於二氯甲烷(40毫升)中並以乙醚(400毫升)處理。此程序重複兩次以得到呈白色物質之標題化合物(2.9公克)。另外，於pH 8.5之0.2 M硼酸緩衝液中製備濃度為2毫克/毫升之人類生長荷爾蒙(hGH)溶液。再將經DSC活化之實例6化合物以小量加入該蛋白質

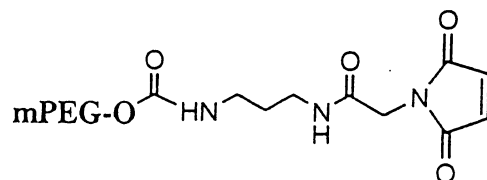
溶液中使其蛋白質：mPEG活化酯之莫耳濃度比約為5:1。將該反應混合物攪拌約2至3小時。mPEG-hGH共軛物之純化係藉由在Amicon系統中以PM 10濾膜(分子量截止值為10,000)超濃縮並過濾去除反應產生之N-羥基琥珀醯亞胺。於Pharmacia Superose 12管柱中進行膠體過濾以進一步將共軛物從過量之未反應mPEG中純化出來。將濾液凍乾並將產物置於冷房中。

實例 8



將實例5之標題化合物(5.9公克，1.0毫莫耳)和1,3-二氨基丙烷(0.74公克，10毫莫耳)於通氮氣之下，於吡啶(50毫升)中攪拌過夜。將乙醚(500毫升)加至反應混合物中並過濾沉澱物。將該固體再溶解於二氯甲烷(50毫升)中並加入乙醚(500毫升)。過濾生集固體並於真空中乾燥以得到5.8公克之白色物質。

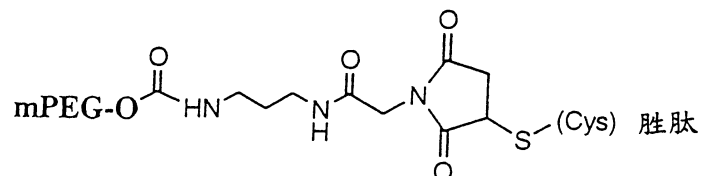
實例 9



將實例8之標題化合物(5.8公克，0.095毫莫耳)加至溶於DMF/吡啶(1:1；50毫升)之N-(2-羧乙基)蘋果醯亞胺(0.31公克，2.0毫莫耳)和N,N'-二琥珀醯亞胺基碳酸酯(0.52公克，2毫莫耳)之混合物中。將該反應混合物於室溫下攪拌過夜。

於混合物中加入乙醚(600毫升)並再過濾沉澱物。將此程序重複一次並將固體濾出。將產物於真空中乾燥並不經任何進純化而直接使用。

實例 10



於室溫下，將實例9之標題化合物(5.7公克，0.9毫莫耳)與弱化之CDP 870 Fab'(0.6毫莫耳)於pH 4.5之醋酸鈉(20 mM, 60毫升)中攪拌2小時。將反應混合物靜置過夜並使用10 Kda之膜，以pH 5.5之醋酸鈉(50 mM)和NaCl(125 mM)透析。將最終產物貯存於-70°C之下。

伍、中文發明摘要：

本發明係關於可用於將生物活性及醫藥用胜肽和蛋白質 PEG 化之聚乙二醇碳酸鹽活化酯類之製備。本發明涉及使用經活化之碳酸和草酸酯類以組成聚乙二醇混合性碳酸鹽活化酯類，其可再與一種連接子或直接與標的胜肽或蛋白質反應。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to the preparation of polyethylene glycol carbonate active esters useful for the PEGylation of biological active and pharmaceutically useful peptides and proteins. The invention involves the use of activated carbonate and oxalate esters in the formation of polyethylene glycol mixed carbonate active esters that then react with a linker or directly with a target peptide or protein.

拾、申請專利範圍：

1. 一種生產經活化之聚乙二醇(PEG)酯之方法，其包含在適當之條件之下，以N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯或1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯將PEG活化之步驟。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯或1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯與PEG之比例為30:1或更低。
3. 如申請專利範圍第2項之生產經活化聚乙二醇(PEG)酯之方法，其中使用一種有機鹼作為觸媒。
4. 如申請專利範圍第3項之生產經活化聚乙二醇(PEG)酯之方法，其中該鹼性觸媒係選自由吡啶和N,N'-4-二甲基胺基吡啶所組成之群組。
5. 一種生產PEG-親核物共軛物之方法，其包含使如申請專利範圍第2項之PEG活化酯在適當條件之下與一種生物活性親核物反應以生成一種PEG-親核物共軛物。
6. 一種生產PEG-連接子-親核物共軛物之方法，其包含步驟：
 - (a) 使如申請專利範圍第2項之PEG活化酯與一種連接子反應；和
 - (b) 使產生之PEG-連接子在適當條件之下與一種生物活性親核物反應以生成一種PEG-連接子-親核物共軛物。
7. 如申請專利範圍第5或6項之方法，其中該生物活性親核物係為一種胜肽或一種蛋白質。

8. 如申請專利範圍第7項之方法，其中該PEG活化酯係以介於1至30莫耳活化酯比1莫耳蛋白質之莫耳比與該胜肽或蛋白質反應或以1莫耳活化酯比1至10莫耳連接子莫耳比與連接子反應。
9. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該PEG-連接子共軛物係以N,N'-二琥珀醯亞胺基草酸酯或1,1'-雙[6-(三氟甲基)苯并三唑基]草酸酯活化，並隨後以介於1至30莫耳活化酯比1莫耳胜肽或蛋白質之莫耳比與一種胜肽或蛋白質反應以生成PEG-連接子胜肽或蛋白質共軛物。
10. 一種經如申請專利範圍第5，6，7，8或9項所製備之PEG-親核物或PEG-連接子親核物共軛物，其中該親核物係為一種hGH拮抗劑或一種TNF α 抗體。
11. 如申請專利範圍第10項之共軛物，其中該TNF α 抗體係一種CDR-接枝性，hTNF40-基底性之經改質Fab。
12. 一種組合物，其含有一種有或無連接子之PEG-親核物共軛物，其製備係如申請專利範圍第9，10或11項。
13. 一種如申請專利範圍第9，10或11項之PEG共軛物於製造一種供治療生長疾病或炎症相關性疾病之藥物之用途。

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)