



發明專利說明書

(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： 92119827

※ 申請日期： 92-07-24

※IPC 分類： C08G 65/329
C07C 47/198

壹、發明名稱：(中文/英文)

聚乙二醇醛類衍生物

POLYETHYLENE GLYCOL ALDEHYDE DERIVATIVES

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

1. 菲杜林 克勞士納

FRIDOLIN KLAUSNER

2. 丹尼斯 史崔柏

DENISE STREBEL

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街 124 號

GRENZACHERSTRASSE 124, CH-4070 BASEL, SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

參、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

王棲佑

CHEE-YOUB WON

住居所地址：(中文/英文)

美國紐澤西州黎賓司登市貝羅盟街 91 號

91 BELMONT DRIVE, LIVINGSTON, NEW JERSEY 07039, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

南韓 KOREA

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

☒ 本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1. 美國；2002 年 07 月 24 日；60/398,196
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

☒ 主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國；2002 年 07 月 24 日；60/398,196
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關聚乙二醇醛類，以及有關此種衍生物之製造方法及使用方法，例如用於多肽及其它生物分子之聚乙二醇化。

【先前技術】

聚乙二醇("PEG")為一種線性或分支中性聚醚，其可以多種分子量取得。PEG結構式為 $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ ，此處 n 表示環氧乙烷單位於PEG之重複數。

PEG及PEG衍生物用來修改多種生物分子。當PEG附著於此等分子時，PEG提高生物分子溶解度以及增加其大小，但極少對期望性質造成影響。較佳PEG軛合生物分子於體內具有較佳存留性，以及代謝延遲。

已經發展出多種PEG衍生物供利用。此等PEG衍生物例如述於美國專利5,252,714；美國專利5,672,662；美國專利5,959,265；美國專利5,990,237；及美國專利6,340,742。

曾經使用兩種概略辦法來官能化PEG：(1)透過一系列反應改變末端羥基成為活性較高的官能基及/或(2)PEG於經過控制之條件下與雙官能化合物反應，讓該雙官能化合物之官能基之一與PEG聚合物反應，而另一官能基仍維持具有活性。大部分情況下，須進行數個步驟才能獲得所需PEG衍生物。所需PEG衍生物之生產產率常為低產率，且需複雜的純化處理來分離。此外，PEG衍生物對感興趣之生物分子顯示非特異性結合，結果導致多個PEGs附接至單一生物分子。

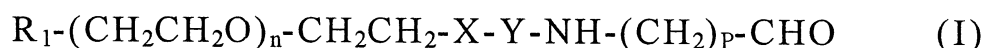
物分子及/或PEG附接於活性位置。多層PEG附接，造成PEG化生物分子之純化困難。多重PEG附著及/或活性位置之PEG化也導致生物分子活性下降。

因此較佳提供適合輓合多種其它分子使用之改良PEG衍生物，該等分子包括多肽及其它含有 α 胺基之分子。仍然需要提供PEG衍生物其可以高產率及高純度生產，且可輓合而提供具有改良效能特性之生物分子。

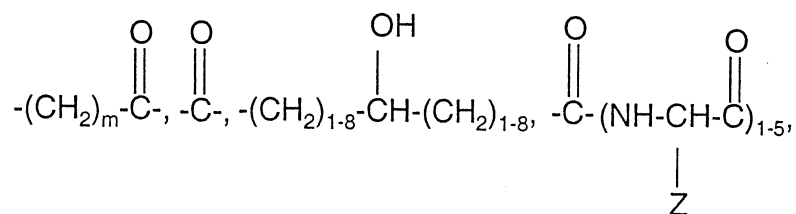
此等及其它本發明之目的說明如後。

【發明內容】

本發明化合物為具有通式(I)之聚乙二醇醛衍生物：

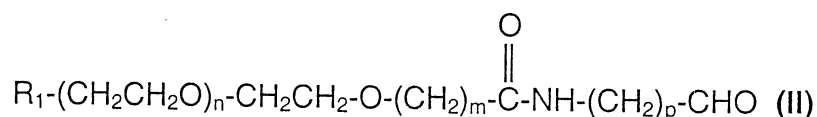


其中 R_1 為端基，X為O或NH，Y係選自下列組成的組群



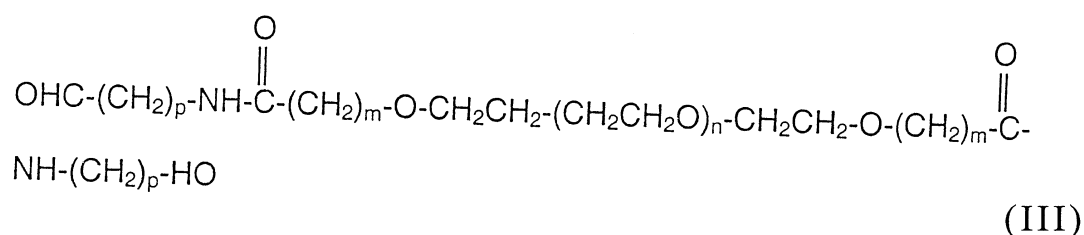
Z為胺基酸分支鏈，m為1至17，n為10至10,000以及p為1至3。

本發明也提供一種式(II)化合物：



其中 R_1 、m、n及p定義如前。

本發明之另一較佳具體實施例提供一種式(VIII)雙官能聚乙二醇醛化合物：



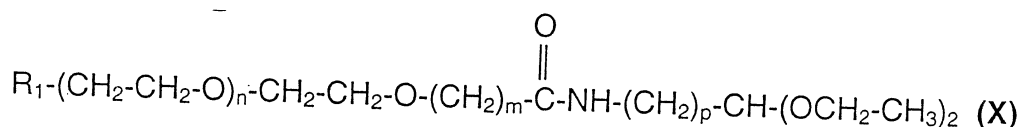
其中 m 、 n 及 p 定義如前。

本發明也提供式 (IX) 中間化合物：



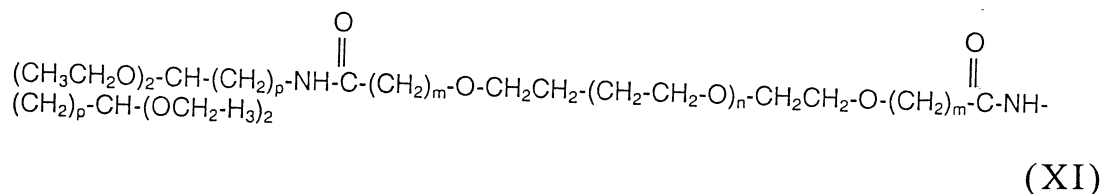
其中 R_1 、 X 、 Y 、 Z 、 m 、 n 及 p 定義如前。

本發明進一步提供式 (X) 中間化合物：



其中 R_1 、 m 、 n 及 p 定義如前。

也提供一種式 (XI) 中間化合物：

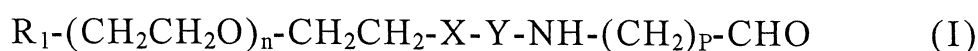


其中 m 、 n 及 p 各自為相同或相異且定義如前。

本發明進一步提供一種製造聚乙二醇醛之方法，包含水解式 (IX) 化合物：



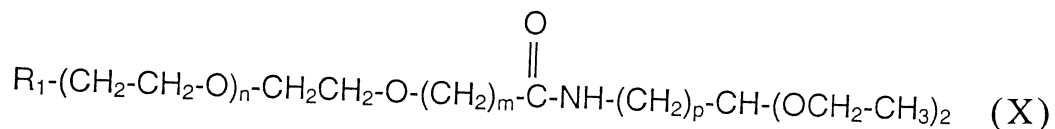
而生成式 (I) 聚乙二醇醛衍生物：



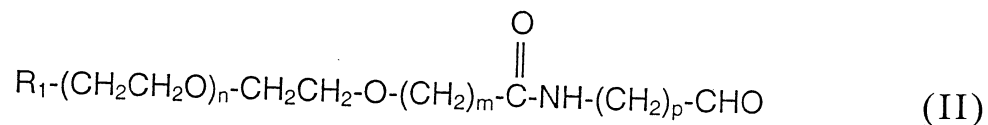
其中 R_1 、 X 、 Y 、 Z 、 m 、 n 及 p 各定義如前。

當本發明係有關一種「製造方法」時，表示一種「製程」。

本發明也提供一種製造聚乙二醇醛之方法，包含水解式(X)化合物：

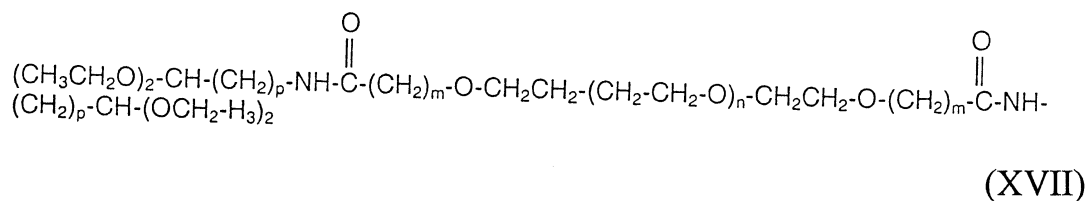


而生成式(II)聚乙二醇醛：

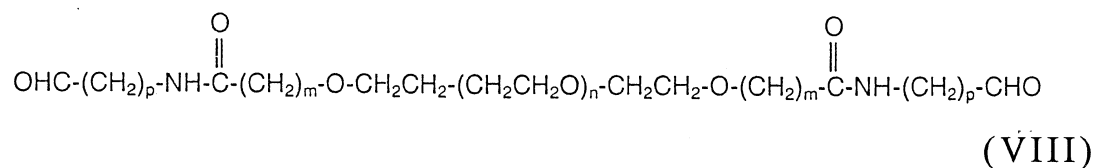


其中 R_1 、 m 、 n 及 p 定義如前。

本發明提供一種製造聚乙二醇醛之方法，包含水解式(XVII)化合物：



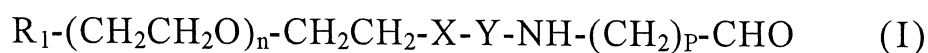
而生成式(VIII)聚乙二醇醛：



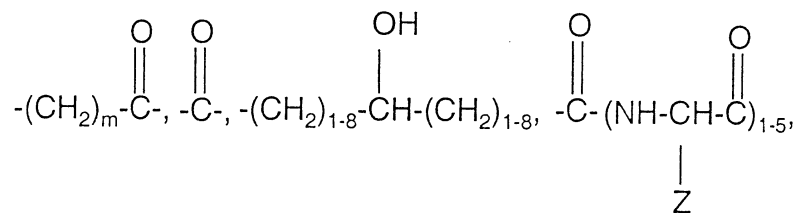
其中 m 、 n 及 p 定義如前。

本發明提供多種化合物及化學中間物，及此等化合物用於多肽及其它生物分子PEG化之方法。本發明提供一種新穎聚乙二醇醛之化學結構式。

本發明化合物為具有通式(I)之聚乙二醇醛衍生物：



其中 R_1 為端基， X 為 O 或 NH ， Y 係選自下列組成的組群



Z 為胺基酸分支鏈， m 為 1 至 17， n 為 10 至 10,000 以及 p 為 1 至 3。

【實施方式】

用於此處， R_1 「端基」為任一種適當化學基， R_1 依較佳情況而定通常為無反應性或通常與其它化學部分具有反應性。上式末端醛基允許方便地附著感興趣之化學部分，例如附著至多肽之 α 胺基酸。 R_1 端基經選擇可允許雙官能基或避免雙官能基，例如共價附接至感興趣之第二化學部分。

當端基概略與其它化學部分不具反應性時， R_1 為相對惰性。若 R_1 為相對惰性，則所得聚乙二醇醛結構式為單官能基，因此只與一個感興趣之化學部分共價鍵結。適當概略非反應性 R_1 端基包括：氫、羥基、低碳烷基、低碳烷氧基、低碳環烷基、低碳烯基、一碳環烯基、芳基及雜芳基。

用於此處「低碳烷基」一詞表示含 1 至 7 個且較佳 1 至 4 個碳原子之經取代或未經取代之直鏈或分支鏈烷基，例如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、正己基、正庚基等。

「低碳烷氧基」一詞表示如前文定義之低碳烷基其透過一個氧原子鍵結，低碳烷氧基例如為甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、第二丁氧基、第三丁氧基、

正戊氧基等。

「低碳環烷基」一詞表示含3至7個且較佳4至6個碳原子之經取代或未經取代之環烷基，亦即環丙基、環丁基、環戊基、環己基或環庚基。

用於此處「低碳烯基」一詞表示含2至7個且較佳2至5個碳原子之經取代或未經取代之直鏈或分支鏈烯基，例如乙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基等。

「低碳環烯基」一詞表示含4至7個碳原子之經取代或未經取代之環烯基，例如環丁烯基、環戊烯基、環己烯等。

「芳基」一詞表示未經取代或選擇性經以下列基團單一取代或多重取代之苯基或萘基：鹵素、低碳烷基、低碳烷氧基、三氟甲基、羥基、羧酸、羧酸酯、硝基、胺基或苯基；特別係經以鹵素、低碳烷基、低碳烷氧基、三氟甲基、羥基、硝基、胺基及苯基取代。

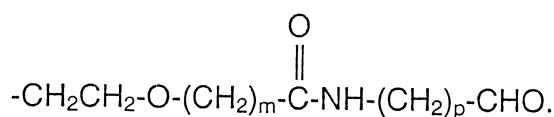
「雜芳基」一詞表示含一或多個選自N、S及O之雜原子之5員或6員雜芳香族基。

較佳概略非反應性 R_1 端基包括甲氧基、羥基或苄氧基。特佳 R_1 端子為甲氧基。當 R_1 為甲氧基時，醛類及相關化合物偶爾於此處稱作為"mPEG"化合物，其中"m"表示甲氧基。

若 R_1 端基概略與其它化學部分具有反應性，則 R_1 為可與其它官能基，例如胜肽及/或基蛋白質之胺及/或巰基反應之官能基。此種情況下， R_1 為方便與其它分子上之親電子基團或親核基團反應之官能基，而與需要強力催化劑或高度不實用之反應條件來反應之該等基團成對比。若 R_1 相對具

有反應性，則聚乙二醇醛為雙官能，因此可與兩個化學部分共價鍵結。

適當之概略反應性 R_1 端基例如包括：鹵素、環氧基、順丁烯二醯亞胺、鄰吡啶基二硫化物、甲苯磺酸根、異氰酸根、胼水合物、氰尿酸鹵、N-丁二醯亞胺基氧基、硫基-N-丁二醯亞胺基氧基、1-苯并三唑基氧基、1-咪唑基氧基、對硝基苯氧基，以及

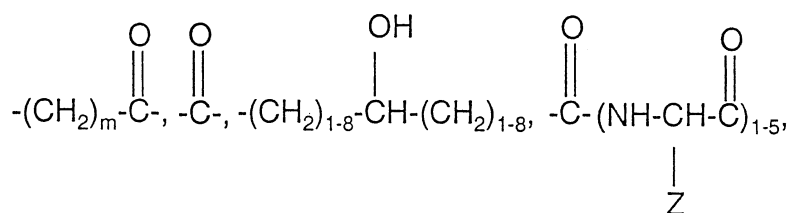


「鹵素」一詞表示氟、氯、溴或碘。

一般較佳之反應性 R_1 端基為

$-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{CHO}$ 。使用此種 R_1 基，結果獲得一種聚乙二醇醛其具有醛基於聚乙二醇醛之兩端。如此所得聚乙二醇醛於兩端皆具有結合性質。但須瞭解此等雙官能化合物無須為完美地對稱，以及第一個 m 、 n 及/或 p 可與式中之第二個 m 、 n 及/或 p 相同或相異。但較佳化合物為對稱性，表示所示兩個 m 之值相同，兩個 n 之值相同，以及兩個 p 之值相同。

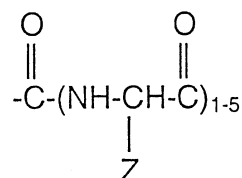
本發明化合物中， X 為 O 或 NH 。較佳 X 為 O 。此外， Y 係選自下列組成的組群



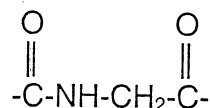
其中Z為胺基酸分支鏈。

本發明中，m為1至17。較佳具體實施例中m為1至14。更佳m為1至7及又更佳m為1至4。最佳m為1。

當Y基具有結構式：

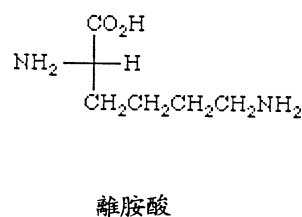
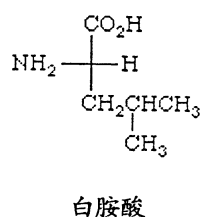
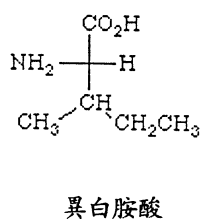
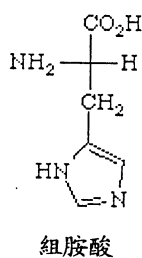
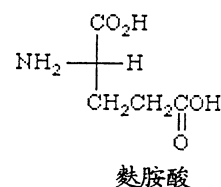
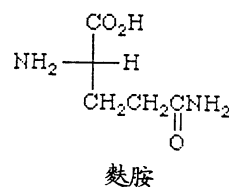
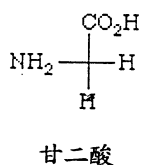
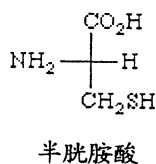
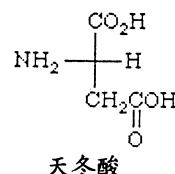
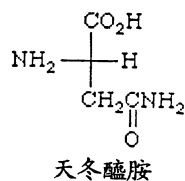
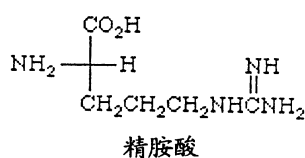
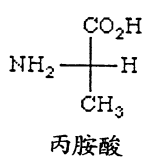


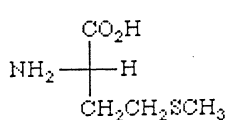
時，Y基具有透過胜肽鍵而鍵聯至胺基酸。如此此種通式結構式於使用單一甘胺酸作為胺基酸時，導致特定結構式簡化為：



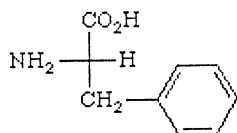
。當Z為CH₃時，胺基酸為丙胺酸。如Z為CH₂OH，則胺基酸為絲胺酸。

顯然當使用較多個不同的胺基酸時，獲得較複雜的結構，經由檢視下式各個胺基酸結構可知。但較佳只使用一個胺基酸。

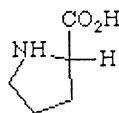




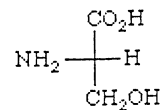
蛋胺酸



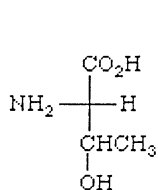
苯基丙胺酸



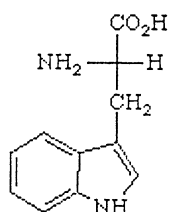
脯胺酸



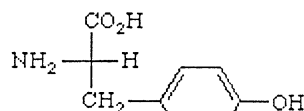
絲胺酸



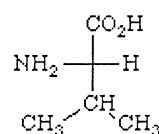
蘇胺酸



色胺酸



酪胺酸



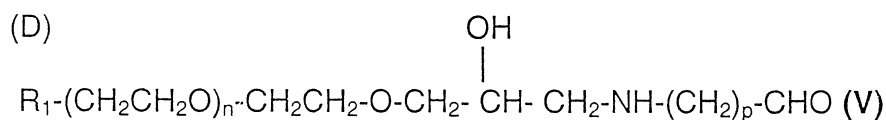
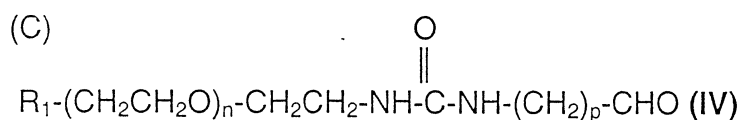
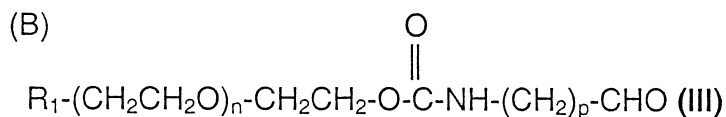
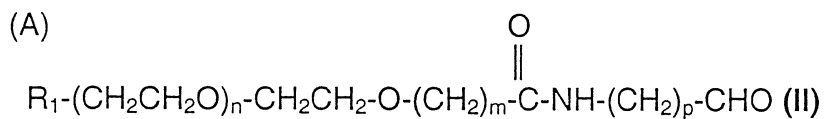
纈胺酸

本發明中，n為10至10,000。本發明之較佳具體實施例中，n為20至5,000。較佳n為50至2,500，又更佳n為75至1,000。最佳n為100至750。

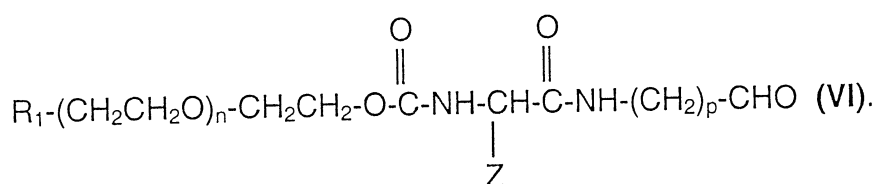
本發明中，p為1至3。較佳p為3。

較佳具體實施例中，p為3，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為2，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為1，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750。

本發明包括(但非限制性)式I化合物且為式II-VI化合物如後：

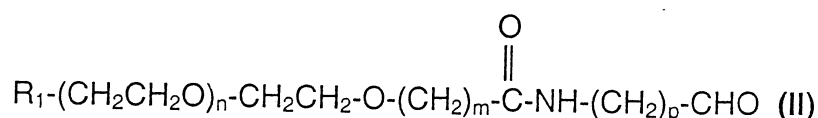


(E)



較佳 R_1 端基相對不具反應性，以甲氧基、羥基及苄氧基為佳。

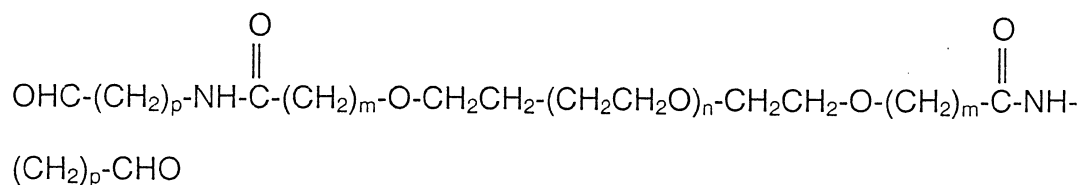
較佳本發明化合物屬於如上 A 組。如此本發明提供式 (II) 化合物：



其中 R_1 、 m 、 n 及 p 定義如前。

較佳具體實施例中， R_1 為甲氧基， m 為 1 以及 n 為 100 至 750。更佳 p 為 3， R_1 為甲氧基， m 為 1 以及 n 為 100 至 750。

本發明之另一較佳具體實施例提供一種式 (VIII) 雙官能聚乙二醇醛化合物：



其中 m 、 n 及 p 定義如前。 (VIII)

較佳具體實施例中， R_1 為甲氧基， m 為 1 以及 n 為 100 至 750。更佳 p 為 3， R_1 為甲氧基， m 為 1 以及 n 為 100 至 750。

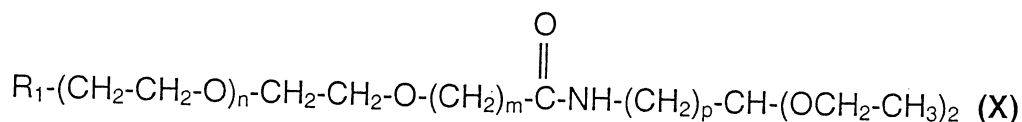
本發明也提供多種化學中間物，其可被轉成前述本發明之聚乙二醇醛化合物。此等中間物包括式 (IX) 化合物：



其中 R_1 、 X 、 Y 、 Z 、 m 、 n 及 p 定義如前。

較佳具體實施例中，p為3，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為2，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為1，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750。

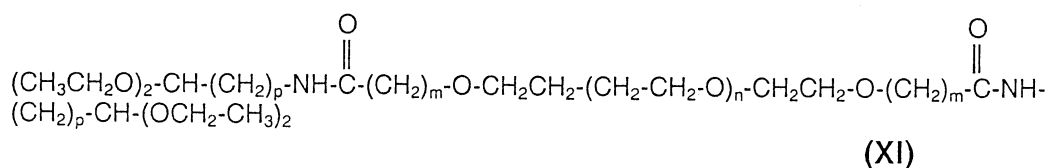
本發明進一步提供式(X)中間化合物：



其中R₁、m、n及p定義如前。

較佳具體實施例中，p為3，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為2，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為1，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750。

也提供式(XI)中間化合物：



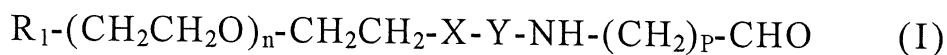
其中各個m、n及p為相同或相異且係定義如前。

較佳具體實施例中，p為3，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為2，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為1，R₁為甲氧基，m為1以及n為100至750。

本發明化合物可使用已知反應劑及方法，藉任一種適當方法製造。但本發明提供一種製造聚乙二醇醛之特定方法，包含水解式(IX)化合物：



而製造式(I)聚乙二醇醛：



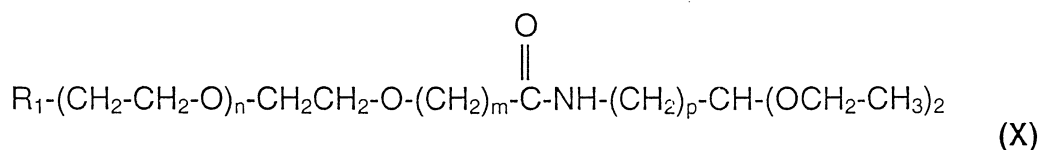
其中 R_1 、 m 、 n 及 p 定義如前。較佳水解係藉酸催化。適當催化酸包括：三氟乙酸、鹽酸、磷酸、硫酸及硝酸。較佳酸為三氟乙酸。

較佳具體實施例中， p 為 3， R_1 為甲氧基， m 為 1 以及 n 為 100 至 750；或 p 為 2， R_1 為甲氧基， m 為 1 以及 n 為 100 至 750；或 p 為 1， R_1 為甲氧基， m 為 1 以及 n 為 100 至 750。

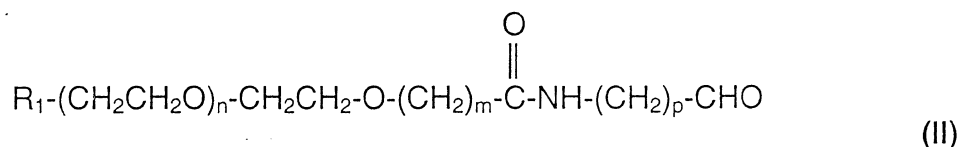
式(II)聚乙二醇醛化合物也可經由任一種適當方法製造。但舉例言之，式(II)聚乙二醇醛之製法如後：首先聚乙二醇經脫水。其次，聚乙二醇與乙酸之鹵化衍生物反應。水解所得反應混合物而獲得 PEG 羧酸。另外，產物 PEG 羧酸也可於脫水步驟後衍生自直接氧化 PEG 獲得。其次，PEG 羧酸與二乙基縮醛之胺衍生物反應而製造 PEG 縮醛胺，其與鹵化羧酸反應而製造聚乙二醇醛。聚乙二醇醛產物隨後經收集及純化。

聚乙二醇醛產物可以任一種適當方式收集及純化。舉例言之，聚乙二醇醛產物可使用二氯甲烷萃取。有機層以硫酸鈉脫水，過濾，濃縮及以乙醚沉澱。產物 PEG 醛係藉過濾收集及真空脫水。

如此本發明提供一種製造聚乙二醇醛之方法，包含水解式(X)化合物：

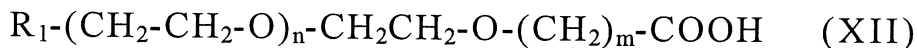


而製造式(II)聚乙二醇醛：



其中 R_1 、 m 、 n 及 p 定義如前。

式(X)化合物之製造方法係經由式(XII)化合物：

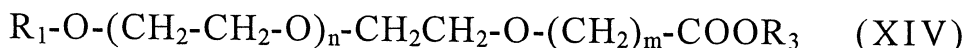


與式(XIII)化合物反應：



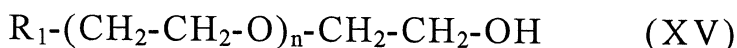
另一種製造PEG酸或PEG羧酸之方法係直接氧化。此種情況下可使用例如 CrO_3 或 $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4$ 、硝酸於鈳酸銨共存或鍾氏試劑(Jone's reagent)(CrO_3 及 H_2SO_4)等氧化劑。

式(XII)化合物可經由水解式(XIV)化合物製造：



其中 R_3 為分支或未分支 C_1-C_4 烷基。

式(XIV)化合物之製法可經由式(XV)化合物：



與式(XVI)化合物反應：



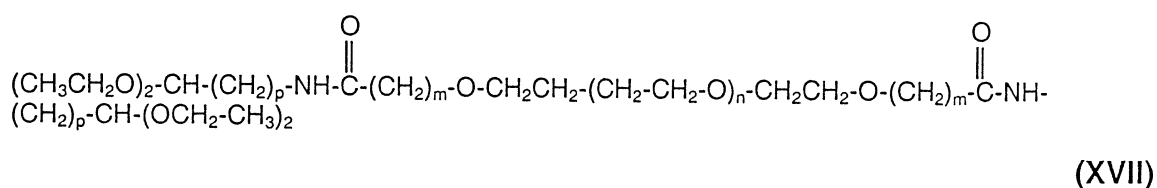
其中 R_2 為鹵素。較佳 R_2 為溴或氯。適當式(XVI)化合物包括溴乙酸第三丁酯、溴乙酸甲酯、溴乙酸乙酯、氯乙酸第三丁酯、氯乙酸甲酯及氯乙酸乙酯。其它可用於本反應步驟之反應劑，亦即替代式(XVI)之反應劑為例如溴乙酸第三丁酯、溴乙酸甲酯、溴乙酸乙酯、氯乙酸第三丁酯、氯乙酸甲酯或氯乙酸乙酯於第三丁氧化鉀、鹼金屬氫化物如氫化鈉或萆化鉀存在下。較佳式(XVI)化合物為溴乙酸第三丁

酯。

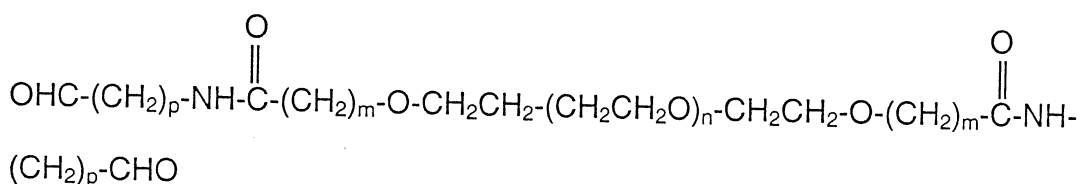
較佳具體實施例中， p 為3， R_1 為甲氧基， m 為1以及 n 為100至750；或 p 為2， R_1 為甲氧基， m 為1以及 n 為100至750；或 p 為1， R_1 為甲氧基， m 為1以及 n 為100至750。

式(III)-(VI)化合物(也分別標示為B-E組)，同樣可藉任何適當手段製造。舉例言之，如下反應圖可用於製造式(III)-(VI)化合物(B-E組)。

如同前文討論之聚乙二醇醛，雙官能聚乙二醇醛可藉任一適當手段製造。本發明提供一種製造聚乙二醇醛之方法。包含水解式(XVII)化合物：

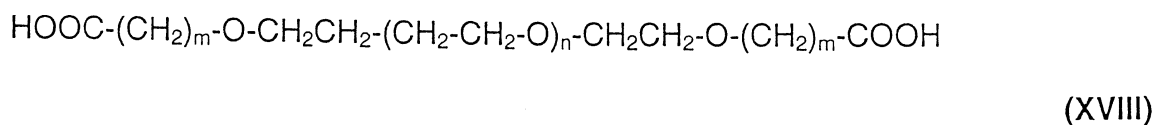


而製造式(VIII)聚乙二醇醛：

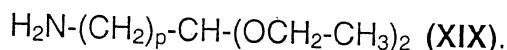


其中 m 、 n 及 p 定義如前。

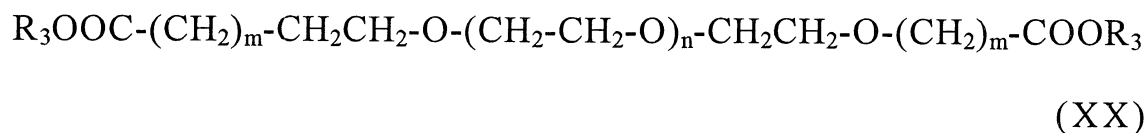
式(VI)化合物之製法可經由式(XVIII)化合物：



與式(XIX)化合物反應：

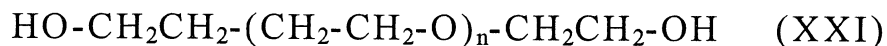


式(XVIII)化合物之製法可經由水解式(XX)化合物：



其中 R_3 為分支或未分支 C_1 - C_4 烷基。

式 (XX) 化合物可經由式 (XXI) 化合物：



與式 (XVI) 化合物反應而製造：



其中 R_2 為鹵素。

前文討論之本發明聚乙二醇醛組合物可用於使用任一種適當方法而衍生多種分子包括生物分子。

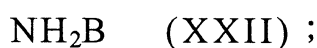
本發明之 PEG 醛化合物用於胜肽類及其它生物分子之 PEG 化具有 N 端位置特異性。本發明之 PEG 醛與生物分子或蛋白質之 N 端 α 胺基形成一個穩定第二級胺鍵聯介於 PEG 與生物分子或蛋白質間。

使用本發明之 PEG 醛 PEG 化之生物分子於 PEG 數目以及 PEG 附著位置顯示再現性，結果導致純化策略之複雜度降低。此種位置特異性 PEG 化，獲得一種軛合物，此處 PEG 位置係遠離生物分子或胜肽結合細胞受體位置，如此將允許 PEG 化後之生物分子、蛋白質、或胜肽保有大部分或全部其生物活性。本發明之 PEG 醛可與任一種含有 α 胺基之生物分子反應。

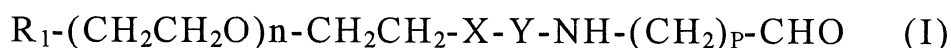
依據選用之聚乙二醇醛而定，聚乙二醇可於一端(單官能聚乙二醇醛)或於兩端(雙官能聚乙二醇醛)共價鍵結至生物分子。

如前文說明，本發明之聚乙二醇醛可用於N端位置特異性PEG化反應。位置特異性N-端鍵聯，結果獲得PEG化多肽其可避免單一多肽的交聯以及單一多肽的多重衍生。為了製造此種位置特異性共價鍵聯，可使用任一種適當反應條件。通常反應混合物之pH充分酸性，來活化欲備PEG化之多肽之 α 胺基酸。典型地pH約為5.5至約7.4且較佳約6.5。

如此一種附著聚乙二醇分子至多肽之方法包含至少一種式(XXII)多肽：



與式(I)聚乙二醇醛分子反應：



其中 R_1 、X、Y、Z、m、n及p定義如前；

而製造式(XXIII)化合物：



其中聚乙二醇醛分子係鍵結至多肽之N端胺基。

較佳具體實施例中，p為3， R_1 為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為2， R_1 為甲氧基，m為1以及n為100至750；或p為1， R_1 為甲氧基，m為1以及n為100至750。

式(XXII)化合物可為任一種多肽，包括干擾素 α 、干擾素 β 、同位干擾素、紅血球生成素(EPO)、粒狀細胞群落刺激因子(GCSF)、粒狀細胞/巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、介白質(包括IL-2、IL-10及IL-12)以及群落刺激因子。

式(XXII)化合物也可為免疫球蛋白例如IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及其亞類及其片段。「抗體」或「抗體片段」一

詞表示多株抗體及單株抗體、完整免疫球蛋白或抗體或免疫球蛋白分子結合至目標抗原之任何功能片段。此種抗體片段例如包括Fv(可變片段)、單鏈Fv、互補決定區(CDRs)、VL(輕鏈可變區)、VH(重鏈可變區)、Fab(抗體結合片段)、F(ab)₂'以及該等抗體片段或可結合至目標抗原之免疫球蛋白胜肽之任何其它官能基之組合。

如此處所述，PEG化化合物可以任一種期望方式製備。如pH等條件須經選擇而有利於 α 胺基之位置特異性PEG化。

通常多肽可經由添加式(XXII)化合物以及以1:1至1:100莫耳比添加PEG作用劑而使用本發明之聚乙二醇化合物PEG化。然後反應於硼酸鹽、磷酸鹽或tri緩衝液於室溫或4℃於5.5至9.0之pH範圍經歷約0.5至24小時時間縮合。PEG反應劑對胜肽/蛋白質之莫耳比通常為1:1至100:1。胜肽/蛋白質濃度通常為1至10毫克/毫升。緩衝液濃度通常為10至500 mM。

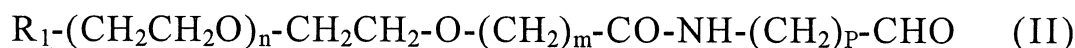
PEG化化合物可以任一種預定方式分離或純化。舉例言之，所得反應混合物可以平衡緩衝液(20 mM Tris, pH 7.5)稀釋，然後所得混合物施用至Q-西法羅斯(Q-Sepharose)管柱上。混合物施用於QA管柱後，以平衡緩衝液洗滌，以75 M氯化鈉洗提；以200 mM氯化鈉洗提；以1 M氯化鈉洗提；以及使用1 M乙酸+1 M氯化鈉及0.5氫氧化鈉再生。經由使用反相HPLC，可由混合物之其它副產物中分開及單離N端單一PEG化產物。然後收集之產物各別藉飛行質譜術之矩陣

輔助雷射解吸附/游離-時間(MALDI-TOF)證實。

本發明之PEG化方法之較佳具體實施例中，式(XXII)多肽：

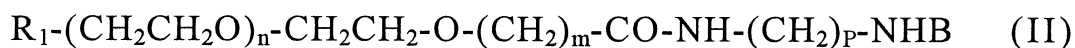


與式(II)之聚乙二醇醛分子反應：



其中 R_1 、 m 、 n 及 p 定義如前；

而製造式(XXIV)化合物：



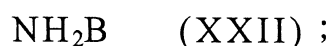
其中該聚乙二醇醛分子係鍵結至多肽之N-端胺基。

於較佳具體實施例中， p 為3， R_1 為甲氧基， m 為1以及 n 為100至750；或 p 為2， R_1 為甲氧基， m 為1以及 n 為100至750；或 p 為1， R_1 為甲氧基， m 為1以及 n 為100至750。

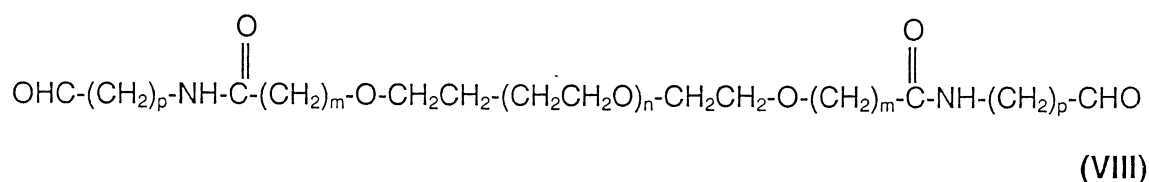
本發明化合物之用途之額外說明係揭示於共同提出申請之美國專利申請案，名稱「PEG化T20多肽」美國申請案第60/398,195號，申請日2002年7月24日；以及「PEG化T1249多肽」，美國申請案第60/398,190號，申請日2002年7月24日；以及美國申請案第60/439,213號，申請日2003年1月10日，各案以引用方式併入此處彷彿各案需完整引述版。

進一步提供一種附著聚乙二醇分子至多肽之方法，包含：

式(XXII)多肽：

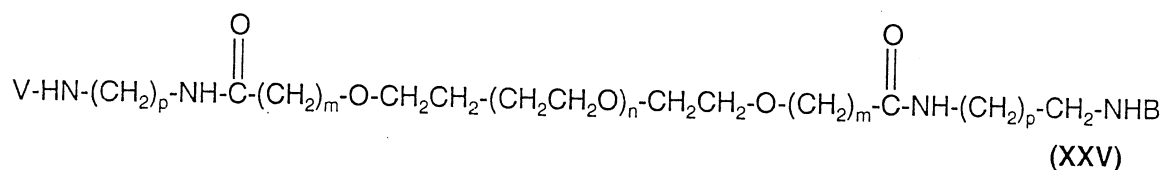


與式(VIII)聚乙二醇醛分子反應：



其中各個 m、n 及 p 為相同或相異且定義如前；

而製造式 (XXV) 化合物：



其中聚乙二醇分子係鍵結至多肽之 N-端胺基。

較佳具體實施例中，p 為 3，m 為 1 以及 n 為 100 至 750；或 p 為 2，m 為 1 以及 n 為 100 至 750；或 p 為 1，m 為 1 以及 n 為 100 至 750。

PEG 化多肽可以任一種預定方式使用。但其適合經由混合醫藥上可接受之賦形劑而製備醫藥組合物。此種醫藥組合物可呈單位劑型。可為注射溶液劑或懸浮液劑、經皮輸送裝置或任何其它預定劑型。

下列實例係供進一步舉例說明本發明。此等實施例僅供舉例說明之用，而絕非意圖囿限本發明之範圍。

實施例

實施例 1

PEG 醛化合物之製備

5 克 PEG (分子量 1,000 至 60,000 道耳吞) 於 50 至 100 毫升甲苯經由回流 1 至 3 小時而藉共沸蒸餾脫水，接著為去除 20 毫升至 30 毫升甲苯。所得溶液冷卻至室溫，然後第三丁氧化鉀 (1 至 10 莫耳過量) 於 20-50 毫升絕對第三丁醇及 20-50 毫升甲苯添加至 PEG 溶液。然後所得混合物於室溫於氬下攪拌 2 小時。

溴乙酸第三丁酯 (1 至 10 莫耳過量) 經注射器添加至反應，反應混合物於室溫於氬氣下攪拌隔夜。依據式 (XVI)

定義之"m"基之預定大小而定，溴乙酸第三丁酯可以其它乙酸鹵化衍生物替代，例如丙酸、丁酸等。

然後反應溶液藉旋轉蒸發濃縮，殘餘物藉加入乙醚沉澱。沉澱產物亦即PEG第三丁基羧基酯經過濾出及真空脫水。

然後PEG第三丁基羧基酯(4克)溶解於50至100毫升1 N氫化鈉，溶液於室溫攪拌隔夜。混合物之pH藉加入1 N至6 N鹽酸調整至2.5至3.0，混合物以二氯甲烷萃取。然後有機層以硫酸鈉脫水，過濾濃縮及沉澱入乙醚。產物PEG-羧酸藉過濾收集及真空脫水。

然後PEG-羧酸(3克)溶解於無水二氯甲烷(20-30毫升)，接著加入4-胺基丁醛二乙基縮醛(1-5莫耳過量)、1-羥基苯并三唑(1-5莫耳過量)及二環己基甲二醯亞胺(1-5莫耳過量)。依據式(XIII)定義之"p"基之預定大小而定，4-胺基丁醛二乙基縮醛可以二乙基縮醛之其它胺衍生物替代，例如3-胺基丙醛二乙基縮醛或2-胺基乙醛二乙基縮醛。

所得混合物於室溫於氫氣下攪拌隔夜。反應混合物經過濾，濃縮，以2-丙醇與乙醚(1:1)之混合物沉澱。PEG縮醛產物經真空脫水隔夜。

然PEG縮醛產物溶解於10-200毫升1-90%三氟乙酸，溶液於室溫攪拌隔夜。混合物pH藉加入1 N氫氧化鈉溶液調整至6.0，然後加入氯化鈉(10 wt%)，溶液pH藉加入1 N氫氧化鈉調整至7.0。然後混合物以二氯甲烷萃取。有機層以硫酸鈉脫水，過濾，濃縮及以乙醚沉澱。產物PEG醛係藉過濾收

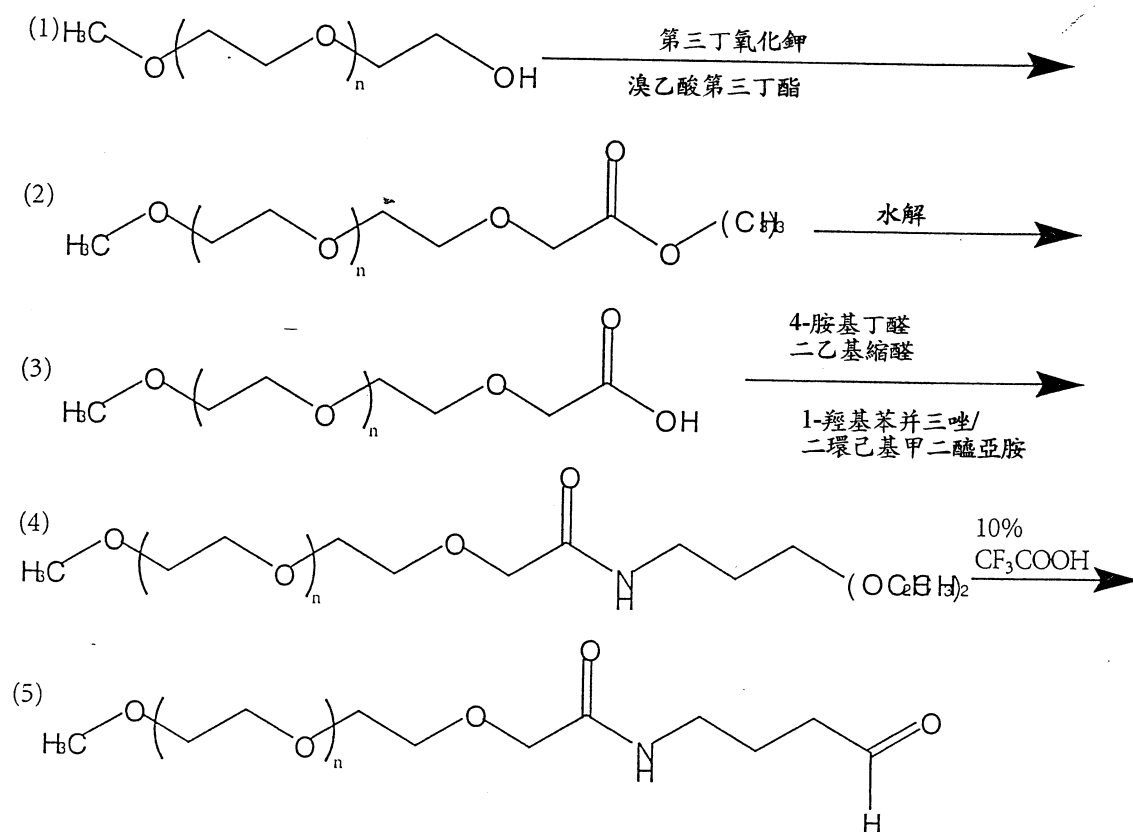
集及真空脫水。

實施例 2

mPEG_{10K}-丁縮醛之製備

下圖表示本發明之mPEG10K-丁縮醛製造之概略反應圖：

mPEG_{10K}-丁縮醛之反應圖



首先分子量10,000道耳吞之羧甲基PEG(mPEG)(30.0克，3毫莫耳)於300毫升甲苯回流2小時共沸蒸餾脫水，接著為去除100毫升甲苯。所得溶液冷卻至室溫，然後第三丁氧化鉀(0.68克，6毫莫耳)於20毫升絕對第三丁醇及20毫升甲苯添加至PEG溶液(1)。所得混合物於室溫於氬下攪拌2小時。

溴乙酸第三丁酯(1.00毫升，6.75毫莫耳)經注射器添加至反應，反應於室溫於氬下攪拌隔夜。然後反應溶液藉旋轉蒸

發濃縮。殘餘物藉加入乙醚沉澱。沉澱產物經過濾出及真空脫水。產率：28克。NMR (d_6 -DMSO): 1.40 ppm (t, 9H, $-CH_3$); 3.21 ppm (s, $-OCH_3$); 3.50 ppm (s, $-O-CH_2CH_2-O-$); 3.96 ppm (s, 2H, $-O-CH_2-COO-$)。

其次 mPEG_{10k}-第三丁基羧甲基酯(20克)溶解於200毫升1 N氫氧化鈉，溶液於室溫攪拌隔夜(2)。混合物之pH藉加入6 N鹽酸調整至2.5，混合物以二氯甲烷(50毫升、40毫升及30毫升)萃取。有機層以硫酸鈉脫水，過濾濃縮及以乙醚沉澱。產物 m-PEG_{10K}-羧甲基酸藉過濾收集及真空脫水。產率：18克。NMR (d_6 -DMSO): 3.21 ppm (s, $-OCH_3$); 3.5 ppm (s, $-O-CH_2CH_2-O-$); 3.99 ppm (s, 2H, $-O-CH_2-COOH$)。

mPEG_{10K}-羧甲基酸(3克，0.3毫莫耳)溶解於無水二氯甲烷(20毫升)，接著加入4-胺基丁醛二乙基縮醛(50毫克，0.3毫莫耳)，1-羥基苯并三唑(40毫克，0.3毫莫耳)及二環己基甲二醯亞胺(80毫克，0.39毫莫耳)(3)。混合物於室溫於氫下攪拌隔夜。反應混合物經過濾，濃縮及以2-丙醇與乙醚(1:1)之混合物沉澱。產物 mPEG_{10K}-丁縮醛經真空脫水隔夜。產率：2.7克。NMR (d_6 -DMSO): 1.07-1.12 ppm (t, 6H, $(-O-CH_2-CH_3)_2$); 1.46 ppm (m, 4H, $-NHCH_2CH_2CH_2-CH-$); 3.08-3.11 ppm (q, 2H, $-NHCH_2CH_2CH_2-CH-$); 3.21 ppm (s, $-OCH_3$); 3.5 ppm (s, $-O-CH_2CH_2-O-$); 3.85 ppm (s, 2H, $-O-CH_2-CO-NH-$); 4.44 ppm (t, 1H, $-NHCH_2CH_2CH_2-CH-$); 7.67 ppm ($-NH-$)。

最後 mPEG_{10k}-丁縮醛(5克，0.5毫莫耳)溶解於50毫升10%三氟乙酸，溶液於室溫攪拌隔夜(4)。混合物pH藉加入1 N

氫氧化鈉溶液調整至6.0，加入氯化鈉(10 wt%)，然後藉加入1 N氫氧化鈉將溶液pH調整至7.0。混合物以二氯甲烷萃取。有機層以硫酸鈉脫水，過濾濃縮及沉澱於乙醚。產物mPEG_{10K}-丁縮醛(5)係藉過濾收集及真空脫水。產率：4.1克(82%)。NMR (d₆-DMSO): 3.21 ppm (s, -OCH₃); 3.5 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 3.85 ppm (s, 2H, -O-CH₂-CO-NH-); 7.67 ppm (-NH-); 9.66 ppm (-CHO-)。

實施例3

mPEG_{10K}-乙縮醛之製備

mPEG_{10K}-乙縮醛係經由溶解mPEG_{10K}-二乙基縮醛(1克，分子量10,000)(其係根據實施例之程序製備)，溶解於10毫升80%三氟乙酸(亞力胥(Aldrich)，99+%)製備。反應溶液於室溫於氫氣下攪拌隔夜。然後逐滴添加1 N氫氧化鈉至反應溶液，直至獲得pH 6.0。其次添加氯化鈉(10 wt%)至前述溶液。然後藉加入0.1 N氫氧化鈉將pH調整至6.95±0.05。溶液隨後使用二氯甲烷萃取。然後有機層以硫酸鈉脫水，過濾，濃縮及以乙醚沉澱。產物mPEG_{10K}-乙縮醛係藉過濾收集及真空脫水。產率：0.85克(85%)。

實施例4

mPEG_{10K}-丙縮醛之製備

mPEG_{10K}-丙縮醛係經由溶解mPEG_{10K}-丙縮醛(2克，分子量10,000)(其係根據實施例之程序製備)，溶解於20毫升80%三氟乙酸(亞力胥，99+%)製備。反應溶液於室溫於氫氣下攪拌隔夜。然後逐滴添加1N氫氧化鈉溶液至反應溶液，直

至獲得 pH 6.0。其次添加氯化鈉 (10 wt%) 至前述溶液。然後藉加入 1 N 氫氧化鈉將 pH 調整至 6.95 ± 0.05 。溶液隨後使用二氯甲烷萃取。然後有機層以硫酸鈉脫水，過濾，濃縮及以乙醚沉澱。產物 mPEG_{10K}-丙縮醛係藉過濾收集及真空脫水。產率：1.8 克 (90%)。

實施例 5

mPEG_{20K}-二-丁縮醛之製備

mPEG_{20K}-二-丁縮醛係經由溶解 mPEG_{20K}-二-丁縮醛 (3.1 克，分子量 20,000) (其係根據實施例之程序製備)，溶解於 20 毫升 80% 三氟乙酸 (亞力胥，99+%) 製備。反應溶液於室溫於氬氣下攪拌隔夜。然後逐滴添加 1 N 氫氧化鈉溶液至反應溶液，直至獲得 pH 6.0。其次添加氯化鈉 (10 wt%) 至前述溶液。然後藉加入 0.1 N 氫氧化鈉將 pH 調整至 6.95 ± 0.05 。溶液隨後使用二氯甲烷萃取。然後有機層以硫酸鈉脫水，過濾，濃縮及以乙醚沉澱。產物 mPEG_{20K}-二-丁縮醛係藉過濾收集及真空脫水。產率：2.5 克 (81%)。

實施例 6

mPEG_{20K}-丁縮醛之製備

mPEG_{20K}-丁縮醛係經由溶解 mPEG_{20K}-丁縮醛 (3.0 克，分子量 20,000) (其係根據實施例之程序製備)，溶解於 30 毫升 80% 三氟乙酸 (亞力胥，99+%) 製備。反應溶液於室溫於氬氣下攪拌隔夜。然後逐滴添加 1 N 氫氧化鈉溶液至反應溶液，直至獲得 pH 6.0。其次添加氯化鈉 (10 wt%) 至前述溶液。然後藉加入 0.1 N 氫氧化鈉將 pH 調整至 6.95 ± 0.05 。溶液隨後使

用二氯甲烷萃取。然後有機層以硫酸鈉脫水，過濾，濃縮及以乙醚沉澱。產物 mPEG_{20K}-丁縮醛係藉過濾收集及真空脫水。產率：25克(83.3%)。

實施例 7

mPEG_{20K}-丁縮醛之製備

mPEG_{20K}-丁縮醛係經由溶解 mPEG_{20K}-丁縮醛(14.7克，分子量20,000)(其係根據實施例之程序製備)，溶解於200毫升10%三氟乙酸(亞力胥，99+%)製備。反應溶液於室溫於氫氣下攪拌隔夜。然後逐滴添加1 N氫氧化鈉溶液至反應溶液，直至獲得pH 6.0。其次添加氯化鈉(10 wt%)至前述溶液。然後藉加入0.1 N氫氧化鈉將pH調整至6.95±0.05。溶液隨後使用二氯甲烷萃取。然後有機層以硫酸鈉脫水，過濾，濃縮及以乙醚沉澱。產物 mPEG_{20K}-丁縮醛係藉過濾收集及真空脫水。產率：13.1克(89%)。

伍、中文發明摘要：

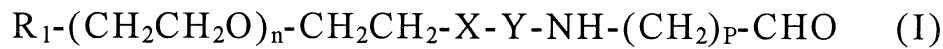
提供聚乙二醇醛類化合物。也提供此種化合物之製造方法及使用方法及其化學中間物。

陸、英文發明摘要：

Polyethylene glycol aldehyde compounds are provided. Processes of making and using such compounds, as well as chemical intermediates are also provided.

拾、申請專利範圍：

1. 一種式(I)化合物，

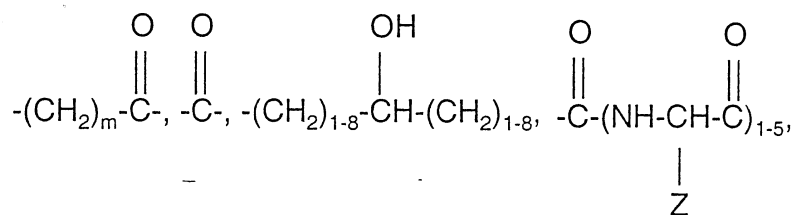


其中

 R_1 為端基，

X為O或NH，

Y係選自下列組成的組群



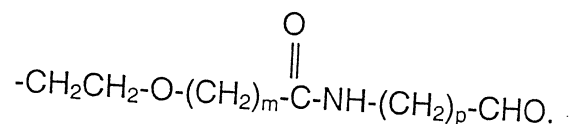
Z為胺基酸分支鏈，

m為1至17，

n為10至10,000以及

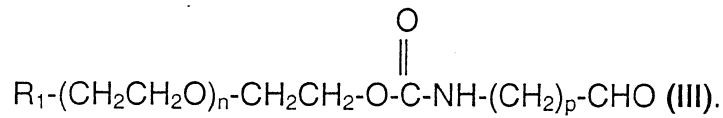
p為1至3。

2. 如申請專利範圍第1項之化合物，其中 R_1 係選自鹵素、環氧基、順丁烯二醯亞胺、鄰吡啶基二硫化物、甲苯磺酸根、異氰酸根、胍水合物、氰尿醯鹵、N-丁二醯亞胺基氧基、硫基-N-丁二醯亞胺基氧基、1-苯并三唑基氧基、1-咪唑基氧基、對硝基苯氧基以及

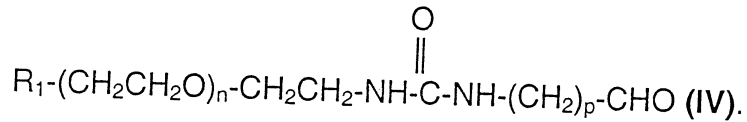


組成的組群。

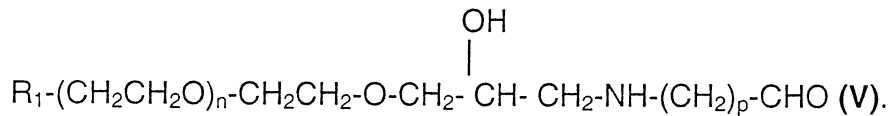
3. 如申請專利範圍第1項之化合物，具有式(III)：



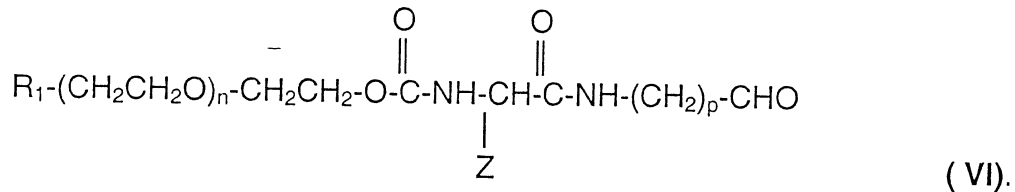
4. 如申請專利範圍第1項之化合物，具有式(IV)：



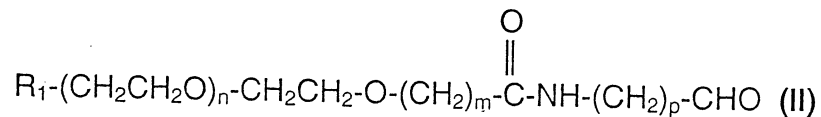
5. 如申請專利範圍第1項之化合物，具有式(V)：



6. 如申請專利範圍第1項之化合物，具有式(VI)：



7. 一種式(II)化合物，



其中

R_1 為端基，

m 為1至17，

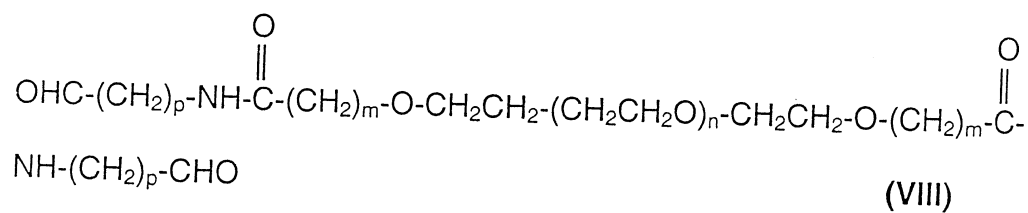
n 為10至10,000以及

p 為1至3。

8. 如申請專利範圍第7項之化合物，其中 p 為3。

9. 如申請專利範圍第7項之化合物，其中 p 為3， R_1 為甲氧基， m 為1以及 n 為100至750。

10. 一種式(VIII)化合物，



其中

m為1至17，

n為10至10,000以及

p為1至3。

11. 一種式(IX)化合物，

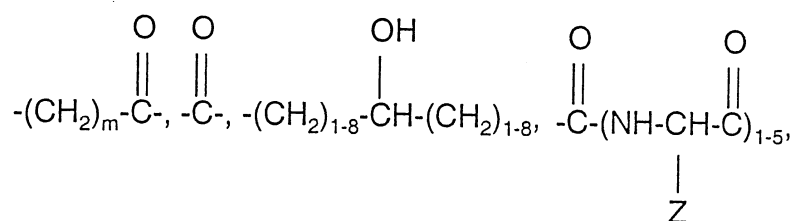


其中

R₁為端基，

X為O或NH，

Y係選自下列組成的組群



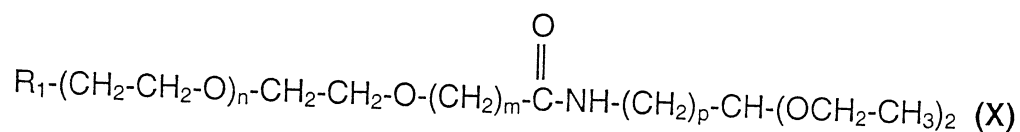
Z為胺基酸分支鏈，

m為1至17，

n為10至10,000以及

p為1至3。

12. 一種式(X)化合物，



其中

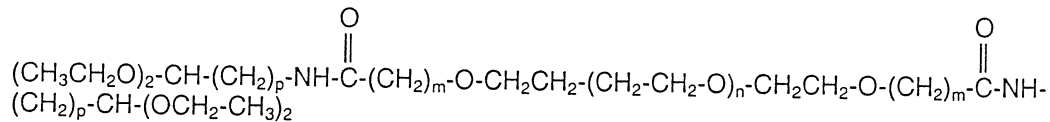
R_1 為端基，

m 為1至17，

n 為10至10,000以及

p 為1至3。

13. 一種式(XI)化合物，



其中

(XI)

m 為1至17，

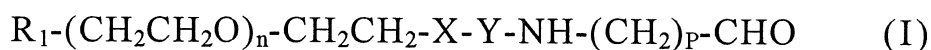
n 為10至10,000以及

p 為1至3。

14. 一種製造聚乙二醇醛之方法，包含水解一種式(IX)化合物：



而製造式(I)聚乙二醇醛：

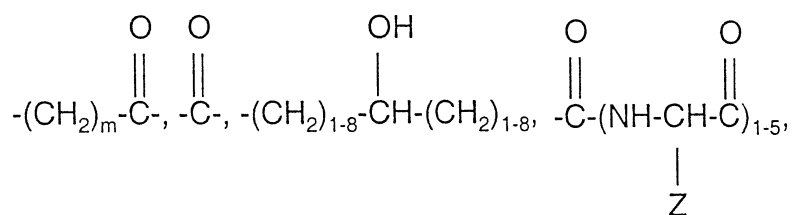


其中

R_1 為端基，

X 為O或NH，

Y 係選自下列組成的組群



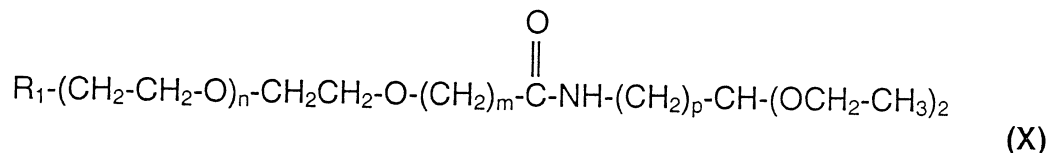
Z為胺基酸分支鏈，

m為1至17，

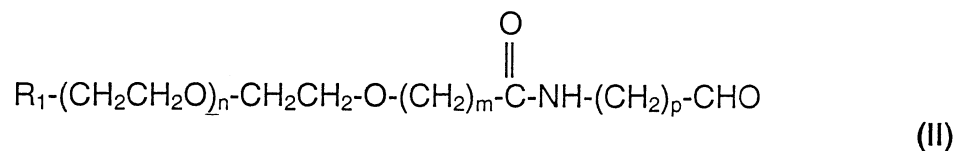
n為10至10,000以及

p為1至3。

15. 一種製造聚乙二醇醛之方法，包含水解一種式(X)化合物：



而製造一種式(II)聚乙二醇醛：



其中

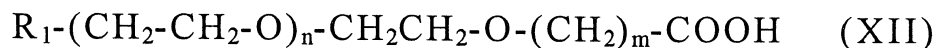
R₁為端基，

m為1至17，

n為10至10,000以及

p為1至3。

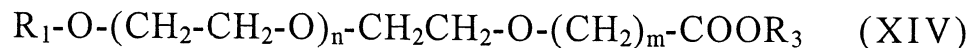
16. 如申請專利範圍第15項之方法，其中該式(X)化合物係經由式(XII)化合物：



與式(XIII)化合物反應而製造：

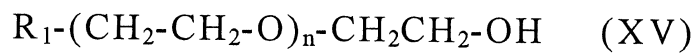


17. 如申請專利範圍第16項之方法，其中該式(XII)化合物係經由水解式(XIV)化合物而製造：

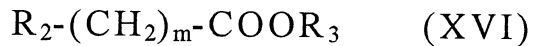


其中R₃為分支或未分支C₁-C₄烷基。

18. 如申請專利範圍第17項之方法，其中式(XIV)化合物係經由式(XV)化合物：

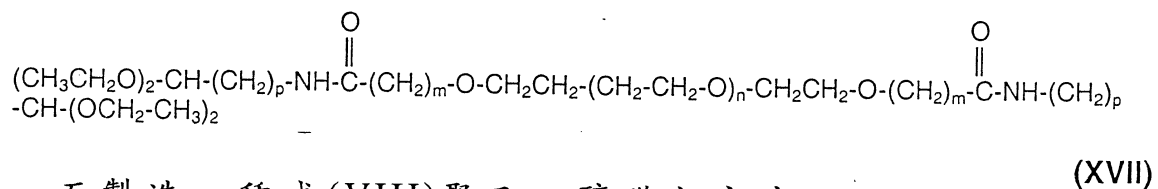


與式(XVI)化合物反應而製造：

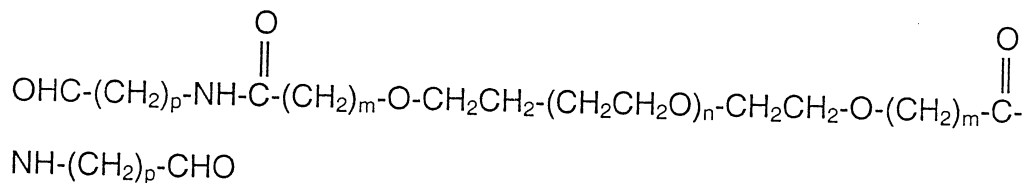


其中 R_2 為鹵素。

19. 一種製造聚乙二醇醛之方法，包含水解一種式(XVII)化合物：



而製造一種式(VIII)聚乙二醇醛之方法：



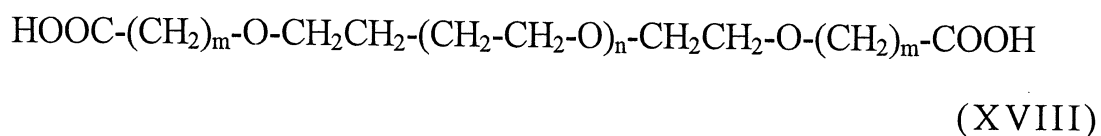
其中 (VIII)

m 為 1 至 17，

n 為 10 至 10,000 以及

p 為 1 至 3。

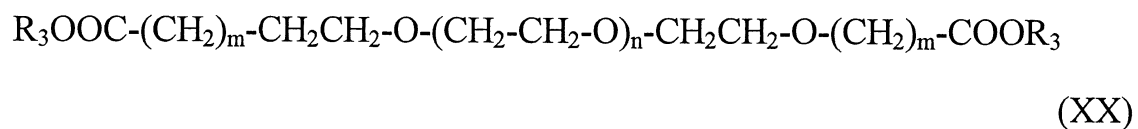
20. 如申請專利範圍第19項之方法，其中該式(XVIII)化合物係經由式(XVIII)化合物：



與式(XIX)化合物反應而製備：

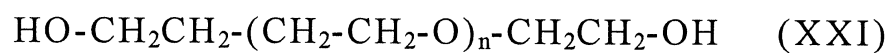


21. 如申請專利範圍第20項之方法，其中該式(XVIII)化合物係經由水解式(XX)化合物而製造：



其中 R_3 為分支或未分支 C_1 - C_4 烷基。

22. 如申請專利範圍第21項之方法，其中式(XX)化合物係經由式(XXI)化合物：



與式(XVI)化合物反應而製造：



其中 R_2 為鹵素。

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(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：

