



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101044188 B

(45) 授权公告日 2010.08.04

(21) 申请号 200580035799.7

代理人 黄革生 林柏楠

(22) 申请日 2005.10.27

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C08G 69/10 (2006.01)

60/623,346 2004.10.29 US

审查员 杜田

60/651,372 2005.02.09 US

60/651,535 2005.02.09 US

60/723,901 2005.10.05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.04.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/039003 2005.10.27

(87) PCT申请的公布数据

W02006/050122 EN 2006.05.11

(73) 专利权人 桑多斯股份公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 A·K·拉伊 H·K·V·帕特尔

J·卢德谢尔 M·安巴扎干

M·R·帕特尔 I·马赫尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

权利要求书 6 页 说明书 19 页

(54) 发明名称

制备格拉太咪尔的方法

(57) 摘要

本发明涉及制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法。该多肽或其可药用盐优选是乙酸格拉太咪尔。

1. 制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法，其中所述方法包括：

(i) 在极性非质子溶剂中，在引发剂存在下，聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N- 叔 - 丁氧基羰基 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物，以形成受保护的多肽，其中受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ - 对 - 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ - 苄酯和其混合物；以及

(ii) 将酸加入到在步骤 (i) 中形成的受保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐，其中所述酸将 γ - 对 - 甲氧基苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N- 叔 - 丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下。

2. 制备乙酸格拉太咪尔的方法，其包括：

(a) 在极性非质子溶剂中，在引发剂存在下，聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N- 叔 - 丁氧基羰基 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物，以形成受保护的格拉太咪尔，其中受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ - 对 - 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ - 苄酯和其混合物；以及

(b) 将酸加入到在步骤 (a) 中形成的受保护的格拉太咪尔中以形成格拉太咪尔，其中所述酸将 γ - 对 - 甲氧基苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N- 叔 - 丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下；以及

(c) 用乙酸处理在步骤 (b) 中形成的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中所述酸选自乙酸、盐酸、氢溴酸、氢氟酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、磷酸、三氟乙酸、硫酸和其混合物。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中所述酸是乙酸和盐酸的混合物。

5. 根据权利要求 3 的方法，其中所述酸是乙酸和氢溴酸的混合物。

6. 根据权利要求 3 的方法，其中所述酸是乙酸和硫酸的混合物。

7. 根据权利要求 3 的方法，其中所述酸是三氟乙酸。

8. 根据权利要求 2 的方法，其中乙酸格拉太咪尔具有 2kDa 到 30kDa 的重量平均分子量。

9. 根据权利要求 8 的方法，其中乙酸格拉太咪尔具有 4.7kDa 到 11kDa 的重量平均分子量。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中乙酸格拉太咪尔具有 7kDa 到 10kDa 的重量平均分子量。

11. 根据权利要求 1 的方法，其中所述多肽基本没有分子量大于 40kDa 的多肽片段。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中所述多肽基本上没有分子量小于 2kDa 的多肽片段。

13. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤 (ii) 在 10°C 到 40°C 的温度下进行。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中步骤 (ii) 在 15°C 到 30°C 的温度下进行。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中步骤 (ii) 在 22°C 到 25°C 的温度下进行。

16. 根据权利要求 1 的方法，其中引发剂是二乙胺。

17. 根据权利要求 1 的方法，其中极性非质子溶剂选自四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、1,4- 二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2- 二氯乙烯、二甲亚砜、二氯甲烷和其混合物。

18. 根据权利要求 17 的方法,其中极性非质子溶剂是 1,4- 二噁烷。
19. 根据权利要求 17 的方法,其中极性非质子溶剂是四氢呋喃。
20. 根据权利要求 1 的方法,其中所述酸以占多肽或其可药用盐总重量的 0.1 重量百分数 (wt. %) 到 100wt. % 的量存在。
21. 根据权利要求 20 的方法,其中所述酸以占多肽或其可药用盐总重量的 1wt. % 到 10wt. % 的量存在。
22. 根据权利要求 21 的方法,其中所述酸以占多肽或其可药用盐总重量的 2wt. % 到 6wt. % 的量存在。
23. 通过一种方法制备的多肽或其可药用盐,所述方法包括:
 - (i) 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N- 叔 - 丁氧基羰基 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽,其中受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ - 对 - 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ - 苄酯和其混合物;以及
 - (ii) 将酸加入到在步骤 (i) 中形成的受保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐,其中所述酸将 γ - 对 - 甲氧基苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N- 叔 - 丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下。
24. 通过一种方法制备的乙酸格拉太咪尔,所述方法包括:
 - (a) 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N- 叔 - 丁氧基羰基 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的格拉太咪尔,其中受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ - 对 - 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ - 苄酯和其混合物;以及
 - (b) 将酸加入到在步骤 (a) 中形成的受保护的格拉太咪尔中以形成格拉太咪尔,其中所述酸将 γ - 对 - 甲氧基苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N- 叔 - 丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下;以及
 - (c) 用乙酸处理在步骤 (b) 中形成的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。
25. 根据权利要求 24 的方法制备的乙酸格拉太咪尔,其中在步骤 (c) 之前移除重量平均分子量小于 2kDa 的格拉太咪尔。
26. 根据权利要求 25 的乙酸格拉太咪尔,其中通过选自透析和渗滤的方法移除重量平均分子量小于 2kDa 的格拉太咪尔。
27. 根据权利要求 26 的乙酸格拉太咪尔,其中透析最初在水中进行,随后在乙酸水溶液中透析。
28. 根据权利要求 24 的方法制备的乙酸格拉太咪尔,其中所述方法另外包括在用乙酸处理格拉太咪尔后的冻干步骤。
29. 根据权利要求 1 的方法制备的多肽或其可药用盐用于制备治疗患有炎性、非自身免疫中枢神经系统疾病的患者或减轻此类疾病症状的药物的用途。
30. 根据权利要求 2 的方法制备的乙酸格拉太咪尔用于制备治疗患有炎性、非自身免疫中枢神经系统疾病的患者或减轻此类疾病症状的药物的用途。
31. 根据权利要求 30 的用途,其中非自身免疫中枢神经系统疾病是多发性硬化。
32. 制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方

法,其中所述方法包括用碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液处理受保护的多肽以形成多肽或其可药用盐。

33. 制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法,其中所述方法包括:

(a)¹ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;以及

(b)¹ 将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到在步骤 (a)¹ 中形成的受保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐。

34. 制备乙酸格拉太咪尔的方法,其包括:

(a)¹ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、L- 谷氨酸 γ - 苄酯 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的格拉太咪尔;

(b)¹ 将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到在步骤 (a)¹ 中形成的受保护的格拉太咪尔中以形成格拉太咪尔;以及

(c)¹ 用乙酸处理格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

35. 根据权利要求 33 的方法,其中步骤 (b)¹ 在 -78℃ 到 40℃ 的温度下进行。

36. 根据权利要求 35 的方法,其中步骤 (b)¹ 在 -25℃ 到 30℃ 的温度下进行。

37. 根据权利要求 36 的方法,其中步骤 (b)¹ 在 -10℃ 到 10℃ 的温度下进行。

38. 根据权利要求 37 的方法,其中步骤 (b)¹ 在 0℃ 的温度下进行。

39. 根据权利要求 32 的方法,其中 pH 为 13 到 14。

40. 根据权利要求 32 的方法,其另外包含缓冲液。

41. 根据权利要求 40 的方法,其中缓冲液是乙酸盐缓冲液并且 pH 为 8 到 12。

42. 根据权利要求 32 的方法,其中碱金属或碱土金属氢氧化物选自氢氧化钙、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化钾、氢氧化钠和其混合物。

43. 根据权利要求 42 的方法,其中碱金属或碱土金属氢氧化物是氢氧化钠。

44. 根据权利要求 32 的方法,其中碱金属或碱土金属氢氧化物以占多肽或其可药用盐总重量的 0.1wt. % 到 400wt. % 的量存在。

45. 根据权利要求 44 的方法,其中碱金属或碱土金属氢氧化物以占多肽或其可药用盐总重量的 10wt. % 到 300wt. % 的量存在。

46. 根据权利要求 45 的方法,其中碱金属或碱土金属氢氧化物以占多肽或其可药用盐总重量的 140wt. % 到 260wt. % 的量存在。

47. 通过一种方法制备的多肽或其可药用盐,所述方法包括用碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液处理受保护的多肽以形成多肽或其可药用盐,其中所述的多肽包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸。

48. 通过一种方法制备的多肽或其可药用盐,所述方法包括:

(a)¹ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;以及

(b)¹ 将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到在步骤 (a)¹ 中形成的受保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐。

49. 通过一种方法制备的乙酸格拉太咪尔,所述方法包括:

(a)¹ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、L- 谷氨酸 γ - 苄酯 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的格拉太咪尔;

(b)¹ 将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到在步骤 (a)¹ 中形成的受保护的格拉太咪尔中以形成格拉太咪尔;以及

(c)¹ 用乙酸处理在步骤 (b)¹ 中形成的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

50. 制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法,其中所述方法包括:

(a)² 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;

(b)² 将酸与在步骤 (a)² 中形成的受保护的多肽和溶剂混合以形成产物;以及

(c)² 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与在步骤 (b)² 中形成的产物,以及水或溶剂和水的混合物混合,以形成去保护的多肽或其可药用盐。

51. 制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法,其中所述方法包括:

(a)² 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;

(b)² 将酸与包含在步骤 (a)² 中形成的受保护的多肽和溶剂的溶液或混悬液混合以形成产物;以及

(c)² 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与在步骤 (b)² 中形成的产物,以及水或溶剂和水的混合物混合,以形成去保护的多肽或其可药用盐。

52. 根据权利要求 50 的方法,其中受保护的 L- 赖氨酸是 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸。

53. 根据权利要求 50 的方法,其中受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ - 对 - 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ - 苄酯和其混合物。

54. 根据权利要求 53 的方法,其中受保护的 L- 谷氨酸是 L- 谷氨酸 γ - 苄酯。

55. 制备乙酸格拉太咪尔的方法,其包括:

(a)² 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的格拉太咪尔,其中所述受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ - 对 - 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ - 苄酯和其混合物;

(b)² 将酸与在步骤 (a)² 中形成的受保护的格拉太咪尔和溶剂混合以形成产物;

(c)² 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与在步骤 (b)² 中形成的产物,以及水或溶剂和水的混合物混合,以形成去保护的格拉太咪尔;以及

(d)² 用乙酸处理在步骤 (c)² 中形成的去保护的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

56. 根据权利要求 50 的方法,其中用于步骤 (b)² 中的溶剂选自极性质子溶剂、极性非质子溶剂和其混合物。

57. 根据权利要求 56 的方法,其中溶剂选自乙酸、四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、1,4- 二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2- 二氯乙烯、二甲亚砜和二氯甲烷。

58. 根据权利要求 57 的方法,其中溶剂是四氢呋喃。

59. 根据权利要求 57 的方法,其中溶剂是乙酸。

60. 根据权利要求 50 的方法,其中选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质以这样的量存在,所述量是在步骤 (c)² 中使用的步骤 (b)² 的产物的总重量的 1 倍 (wt.) 到 1,000 倍 (wt.)。

61. 根据权利要求 60 的方法,其中选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质以 10 倍 (wt.) 到 500 倍 (wt) 的量存在。

62. 根据权利要求 61 的方法,其中选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质以 50 倍 (wt.) 到 150 倍 (wt) 的量存在。

63. 制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法,其中所述方法包括:

(a)³ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;

(b)³ 将酸与在步骤 (a)³ 中形成的受保护的多肽和溶剂混合以形成产物;以及

(c)³ 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与在步骤 (b)³ 中形成的产物,以及溶剂或溶剂和水的混合物混合,以形成去保护的多肽或其可药用盐。

64. 制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法,其中所述方法包括:

(a)³ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;

(b)³ 将酸与包含在步骤 (a)³ 中形成的受保护的多肽和溶剂的混合物混合以形成产物;以及

(c)³ 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与在步骤 (b)³ 中形成的产物,以及溶剂或溶剂和水的混合物混合,以形成去保护的多肽或其可药用盐。

65. 根据权利要求 63 的方法,其中受保护的 L- 赖氨酸是 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸。

66. 根据权利要求 63 的方法,其中受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ- 对- 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ- 苄酯和其混合物。

67. 制备乙酸格拉太咪尔的方法,其包括:

(a)³ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的格拉太咪尔,其中所述受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ- 对- 甲氧

基苄酯、L-谷氨酸 γ -苄酯和其混合物；

(b)^{3'} 将酸与包含在步骤 (a)³ 中形成的受保护的格拉太咪尔和溶剂的混合物混合以形成产物；

(c)^{3'} 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与包含在步骤 (b)³ 中形成的产物，以及溶剂或溶剂和水的混合物的混合物混合，以形成去保护的格拉太咪尔；以及

(d)^{3'} 用乙酸处理在步骤 (c)^{3'} 中形成的去保护的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

68. 根据权利要求 63 的方法，其中用于步骤 (b)³ 中的溶剂选自极性质子溶剂、极性非质子溶剂和其混合物。

69. 根据权利要求 68 的方法，其中溶剂选自乙酸、四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、1,4-二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2-二氯乙烯、二甲亚砜和二氯甲烷。

70. 根据权利要求 69 的方法，其中溶剂是四氢呋喃。

71. 根据权利要求 69 的方法，其中溶剂是乙酸。

72. 根据权利要求 63 的方法，其中选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质以这样的量存在，所述量占在步骤 (c)³ 中使用的溶剂或溶剂和水的混合物总重量的 0.1wt. % 到 10wt. %。

73. 根据权利要求 72 的方法，其中选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质以这样的量存在，所述量占在步骤 (c)³ 中使用的溶剂或溶剂和水的混合物总重量的 0.1wt. % 到 5wt. %。

74. 根据权利要求 63 的方法，其中在步骤 (c)³ 中使用的溶剂或溶剂和水的混合物以这样的量存在，所述量是在步骤 (c)³ 中所使用的步骤 (b)³ 的产物的总重量的 1 倍 (wt.) 到 1000 倍 (wt.)。

75. 根据权利要求 74 的方法，其中在步骤 (c)³ 中使用的溶剂或溶剂和水的混合物以这样的量存在，所述量是在步骤 (c)³ 中所使用的步骤 (b)³ 的产物的总重量的 10 倍 (wt.) 到 500 倍 (wt.)。

76. 根据权利要求 63 的方法，其中选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质选自氢氧化钙、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化钾、氢氧化钡、氢氧化钠、碳酸钙、碳酸锂、碳酸镁、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钙、碳酸氢锂、碳酸氢镁、碳酸氢钾和碳酸氢钠。

77. 根据权利要求 76 的方法，其中所述物质选自氢氧化钠、氢氧化锂和氢氧化钾。

制备格拉太咪尔的方法

发明领域

[0001] 本发明提供了制备多肽或其可药用盐的方法。更具体地,本发明提供了制备乙酸格拉太咪尔的方法。

[0002] 发明背景

[0003] COPAXONE®是乙酸格拉太咪尔(FDA批准的用于治疗多发性硬化的药物)的商品名。COPAXONE®还已知为共聚物 1(Copolymer-1)。COPAXONE®商标公开了 COPAXONE®由合成多肽的乙酸盐组成,并且平均分子量为 4.7-11.0 千道尔顿(KDa),所述合成多肽包含四个天然存在的氨基酸:L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-酪氨酸和 L-赖氨酸,它们的平均摩尔分数分别是 0.141、0.427、0.095 和 0.338。COPAXONE®包含具有不同分子量和序列的多肽的混合物。COPAXONE®的结构式是: $(\text{Glu, Ala, Lys, Tyr})_x \cdot x\text{CH}_3\text{COOH}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3)_x \cdot x\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ COPAXONE®是包含 20mg 乙酸格拉太咪尔和 40mg 甘露糖醇的白色到灰白色、无菌、冻干的粉剂。它在单一用途的小瓶中提供以在用无菌水重构后用于皮下施用。

[0004] 制备共聚物 1 或乙酸格拉太咪尔的方法已经在美国专利号 3,849,550; 5,800,808; 5,981,589; 6,048,898; 6,054,430; 6,342,476; 和 6,362,161 中描述。合成乙酸格拉太咪尔的方法是基于下列聚合反应:在无水二噁烷中,在室温下使用二乙胺作为引发剂聚合酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸 γ -苄酯和 N^ε-三氟乙酰赖氨酸的 N-甲酸酐(N-carboxyanhydride)以形成受保护的多肽。 γ -苄基基团的解封闭(第一次去保护)是通过在室温下在溴化氢/乙酸中搅拌受保护的多肽来实现的。这些条件也促进了共聚物的切割。下一步是通过用 1M 哌啶处理来移除共聚物的 N^ε-三氟乙酰基基团(第二次去保护)。在最终步骤中,通过用透析纯化共聚物、随后用乙酸处理以形成乙酸盐并且通过对水的透析进行另一次纯化,得到乙酸格拉太咪尔。因此,这些现有技术方法包括四个 N-甲酸酐的聚合反应、两次去保护步骤、两次纯化步骤和一次乙酸盐形成步骤。

[0005] 美国专利号 6,620,847 描述了制备共聚物 1 的方法,其包括用哌啶水溶液处理三氟乙酰基共聚物 1 以形成共聚物 1 的溶液和纯化共聚物 1。

[0006] 美国专利申请公开号 2004/0091956 描述了制备乙酸格拉太咪尔的三步方法。方法包括聚合 L-丙氨酸、L-酪氨酸、受保护的 L-谷氨酸和受保护的 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物以得到受保护的多肽或其盐;以及通过在氢气压力下的钨催化的转移氢化或钨催化的氢化来将受保护的多肽或其盐去保护。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了制备包含 L-酪氨酸、L-丙氨酸、L-谷氨酸和 L-赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法,其中所述方法包括:

[0009] (i) 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L-酪氨酸的 N-甲酸酐(N-carboxyanhydride)、L-丙氨酸的 N-甲酸酐;受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐;和 N-叔-丁氧基羰基 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽,其中受保护的 L-谷氨酸选自 L-谷氨酸 γ -对-甲氧苄酯(γ -p-methoxybenzyl L-glutamate)、L-谷氨酸 γ -苄酯(γ -benzyl L-glutamate) 和其混合物;以及

[0010] (ii) 将酸加入到在步骤 (i) 中形成的受保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐, 其中所述酸将 γ -对-甲氧基苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N-叔-丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下。

[0011] 本发明提供了制备包含 L-酪氨酸、L-丙氨酸、L-谷氨酸和 L-赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法, 其中所述方法包括用碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物水溶液处理受保护的多肽以形成多肽或其可药用盐。

[0012] 本发明提供了制备包含 L-酪氨酸、L-丙氨酸、L-谷氨酸和 L-赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法, 其中所述方法包括:

[0013] (a)² 在极性非质子溶剂中, 在引发剂存在下, 聚合 L-酪氨酸的 N-甲酸酐、L-丙氨酸的 N-甲酸酐、受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐和受保护的 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物, 以形成受保护的多肽;

[0014] (b)² 将酸与在步骤 (a)² 中形成的受保护的多肽和溶剂混合以形成产物; 以及

[0015] (c)² 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与在步骤 (b)² 中形成的产物, 以及水或溶剂和水的混合物混合, 以形成去保护的多肽或其可药用盐。

[0016] 本发明提供了制备包含 L-酪氨酸、L-丙氨酸、L-谷氨酸和 L-赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法, 其中所述方法包括:

[0017] (a)³ 在极性非质子溶剂中, 在引发剂存在下, 聚合 L-酪氨酸的 N-甲酸酐、L-丙氨酸的 N-甲酸酐、受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐和受保护的 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物, 以形成受保护的多肽;

[0018] (b)³ 将酸与在步骤 (a)³ 中形成的受保护的多肽和溶剂混合以形成产物; 以及

[0019] (c)³ 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与在步骤 (b)³ 中形成的产物, 以及溶剂或溶剂和水的混合物混合, 以形成去保护的多肽或其可药用盐。

[0020] 发明描述

[0021] 本发明涉及制备包含 L-酪氨酸、L-丙氨酸、L-谷氨酸和 L-赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法。多肽或其可药用盐优选是乙酸格拉太咪尔。

[0022] I. 酸水解方法

[0023] 在本发明的一个实施方案中, 方法包括

[0024] (i) 在极性非质子溶剂中, 在引发剂存在下, 聚合 L-酪氨酸的 N-甲酸酐、L-丙氨酸的 N-甲酸酐、受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐和 N-叔-丁氧基羰基 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物, 以形成受保护的多肽, 其中受保护的 L-谷氨酸选自 L-谷氨酸 γ -对-甲氧基苄酯、L-谷氨酸 γ -苄酯和其混合物; 以及

[0025] (ii) 将酸加入到在步骤 (i) 中形成的受保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐, 其中所述酸将 γ -对-甲氧基苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N-叔-丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下。

[0026] 在本发明的一个实施方案中, 方法包括:

[0027] (a) 在极性非质子溶剂中, 在引发剂存在下, 聚合 L-酪氨酸的 N-甲酸酐、L-丙氨酸的 N-甲酸酐、受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐和 N-叔-丁氧基羰基 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物, 以形成受保护的格拉太咪尔, 其中受保护的 L-谷氨酸选自 L-谷氨酸

γ -对-甲氧基苄酯、L-谷氨酸 γ -苄酯和其混合物；以及

[0028] (b) 将酸加入到在步骤 (a) 中形成的保护的格拉太咪尔中以形成格拉太咪尔，其中所述酸将 γ -对-甲氧基苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N-叔-丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下；以及

[0029] (c) 用乙酸处理在步骤 (b) 中形成的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

[0030] 在本发明方法的聚合步骤步骤 (i)、步骤 (a)、步骤 (a)¹、步骤 (a)^{1'}、步骤 (a)²、步骤 (a)^{2'}、步骤 (a)³ 和步骤 (a)^{3'} 中，L-酪氨酸的 N-甲酸酐、L-丙氨酸的 N-甲酸酐、受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐和 N-叔-丁氧基羰基 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物优选在约 10℃ 到约 40℃ 的温度下聚合，更优选在约 20℃ 到约 30℃ 下聚合。聚合反应优选进行约 2 小时到约 80 小时的时间，更优选是约 20 小时到约 50 小时。最优选地，聚合反应在温度为 25℃ 下进行约 24 小时的时间。

[0031] 极性非质子溶剂优选选自四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2-二氯乙烯、二甲亚砜和二氯甲烷。最优选地，极性非质子溶剂是 1,4-二噁烷。还可以使用极性非质子溶剂的混合物。

[0032] 用在本发明方法的步骤 (i)、步骤 (a)、步骤 (a)¹、步骤 (a)^{1'}、步骤 (a)²、步骤 (a)^{2'}、步骤 (a)³ 和步骤 (a)^{3'} 中的引发剂可以是任何烷基胺引发剂，如二烷基胺或三烷基胺。每个烷基基团优选具有 1-6 个碳原子。优选的烷基胺引发剂是二乙胺。优选地，二乙胺以这样的量存在，所述量占 L-酪氨酸的 N-甲酸酐、L-丙氨酸的 N-甲酸酐、受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐和 N-叔-丁氧基羰基 L-赖氨酸的 N-甲酸酐混合物重量的约 0.001 重量百分数 (wt. %) 到约 2wt. %，更优选为从约 0.01wt. % 到约 0.02wt. %。

[0033] 在本发明的一个实施方案中，在聚合后向聚合混合物加入水。水的加入使得受保护的多肽沉淀。通过真空过滤优选地将水从包含水和受保护的多肽的混合物中移除，并且将回收的受保护的多肽干燥。干燥方法是本领域技术人员已知的，如真空干燥。

[0034] 在本发明方法的去保护步骤步骤 (ii) 中，将酸加入到在步骤 (i) 中形成的受保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐。酸将 γ -对-甲氧基苄基基团或 γ -苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N-叔-丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下。另外，酸裂解多肽或其可药用盐的酰胺键，形成异质性多肽片段。

[0035] 在本发明方法的去保护步骤步骤 (b) 中，将酸加入到在步骤 (a) 中形成的受保护的格拉太咪尔中以形成格拉太咪尔。酸将 γ -对-甲氧基苄基基团或 γ -苄基基团从谷氨酸部分切下并且将 N-叔-丁氧基羰基基团从赖氨酸部分切下。另外，酸裂解格拉太咪尔的酰胺键，形成异质性格拉太咪尔片段。

[0036] 适当的酸包括但不限于乙酸、盐酸、氢溴酸、氢氟酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、磷酸、三氟乙酸和硫酸。还可以使用酸的混合物。优选的酸选自三氟乙酸、乙酸和盐酸的混合物、乙酸和氢溴酸的混合物以及乙酸和硫酸的混合物。酸可以以水溶液的形式加入。

[0037] 酸优选地以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 0.1wt. % 到约 100wt. % 的量存在、更优选地以约 1wt. % 到约 10wt. % 的量存在。最优选地，酸以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 2wt. % 到约 6wt. % 的量存在。

[0038] 在酸加入过程中反应介质温度优选从约 10℃ 到约 40℃，更优选是从 15℃ 到约 30℃。酸优选伴随着搅拌在约 1 小时到约 30 小时的时间内加入。最优选地，在温度为约

25℃时伴随着搅拌在约 1 小时到约 8 小时的时间内将酸加入到受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔。

[0039] 通过用氮气清洗反应混合物、冻干或者通过在真空下的旋光式汽化器优选地将过量的酸从反应混合物中移除以得到固体形式的去保护的多肽。但是,还可以使用本领域技术人员已知的其它分离技术。

[0040] 将游离碱或酸加成盐形式的去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔优选地溶解在水或乙酸水溶液中。通过此类方法如透析或渗滤将不需要的低分子量的多肽或格拉太咪尔片段(即小于约 2kDa)和高分子量的多肽或格拉太咪尔片段(即大于约 40kDa)优选地移除。优选的膜包括Visking部分渗透的纤维素膜,如可以从Medicell International Ltd.获得的具有分子量截留为 12-14kDa 的Size6膜;和切向流过滤(TFF)膜,如可从Millipore获得的Pellicon XL PLCCC 10(50cm²)或PLCCC 5(50cm²)。在本发明优选的实施方案中,将去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔溶解在水中并且透析,随后在乙酸水溶液中透析。

[0041] 本发明已经确定了所需分子量的多肽或其可药用盐可以通过稀释、在步骤(ii)或步骤(b)中所加入酸的浓度,和/或时间来控制。

[0042] 在本发明的一个实施方案中,将水从去保护的多肽中移除。优选的移除方法是冻干。在冻干中,将溶液冷冻并且放到真空下,从而使水(冰)在未融化下在真空中蒸发(升华)并且将非水成分(去保护的多肽和剩余盐)以未被损害的状态(即没有化学分解)留下。冻干的干燥产物包含去保护的多肽和剩余的盐。

[0043] 在本发明的一个实施方案中,用冰乙酸处理去保护的多肽以形成格拉太咪尔乙酸盐。优选地通过冻干收集格拉太咪尔乙酸盐以提供格拉太咪尔乙酸盐产物。

[0044] II. 相转移方法

[0045] 在本发明的一个实施方案中,用于制备包含 L- 酪氨酸、L- 丙氨酸、L- 谷氨酸和 L- 赖氨酸的多肽或其可药用盐的方法包括用碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液处理受保护的多肽以形成多肽或其可药用盐。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,方法包括:

[0047] (a)¹ 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;以及

[0048] (b)¹ 将碱性或碱土金属氢氧化物水溶液加入到在步骤(a)¹中形成的保护的多肽中以形成多肽或其可药用盐。

[0049] 在本发明的一个实施方案中,方法包括:

[0050] (a)^{1'} 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、L- 谷氨酸 γ- 苄酯 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的格拉太咪尔;

[0051] (b)^{1'} 将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到在步骤(a)^{1'}中形成的受保护的格拉太咪尔中以形成格拉太咪尔;以及

[0052] (c)^{1'} 用乙酸处理格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

[0053] 在本发明方法的去保护步骤步骤(b)¹和步骤(b)^{1'}中,将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到在步骤(a)¹中形成的保护的受多肽中或加入到在步骤(a)^{1'}中形成受

保护的格拉太咪尔中。在步骤 (b)¹ 和步骤 (b)^{1'} 中,移除了在谷氨酸部分上的保护基(即 γ -苄基基团)和在赖氨酸部分上的保护基(即 N^{ϵ} -三氟乙酰基基团)。另外,碱金属或碱土金属氢氧化物裂解多肽或格拉太咪尔的酰胺键,形成异质性多肽或格拉太咪尔片段。

[0054] 尽管不希望被任何具体理论束缚,本发明人相信将保护基从受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔上移除使得去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔进行从有机相到水相的相转移。

[0055] 在步骤 (b)¹ 或步骤 (b)^{1'} 中没有缓冲液时,在加入碱金属或碱土金属氢氧化物的水溶液后,在步骤 (b)¹ 和步骤 (b)^{1'} 过程中 pH 一般是约 13 到约 14。在步骤 (b)¹ 或步骤 (b)^{1'} 中存在缓冲液时, pH 一般是约 8 到约 12。缓冲液可以是加入的或在原位形成的。优选的缓冲液是乙酸盐缓冲液如乙酸钠。

[0056] 碱金属或碱土金属氢氧化物优选选自氢氧化钙、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化钾和氢氧化钠。更优选地,碱金属或碱土金属氢氧化物是氢氧化钠。还可以使用碱金属或碱土金属氢氧化物的组合。

[0057] 碱金属或碱土金属氢氧化物优选地以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 0.1wt. % 到约 400wt. % 的量存在,更优选以占约 10wt. % 到约 300wt. % 的量存在。最优选地,碱金属或碱土金属氢氧化物以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 140wt. % 到约 260wt. % 的量存在。

[0058] 优选在从约 -78°C 到约 40°C,更优选从 -25°C 到约 30°C 的温度下,将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔中,优选进行约 1 小时到约 30 小时的时间。最优选地,在从约 -10°C 到约 10°C (例如 0°C) 的温度下,将碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液加入到受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔中,进行约 1 小时到约 8 小时的时间,伴随着搅拌。碱金属或碱土金属氢氧化物水溶液的加入导致了相的分离,其中形成了有机相和水相。

[0059] 有机相大体上包含极性非质子溶剂和受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔。水相大体上包含水、碱金属或碱土金属氢氧化物,以及游离碱形式的去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔。通过使用离心和离心有机相优选地将水相和有机相分离。

[0060] 本发明方法的另一优势是碱金属或碱土金属氢氧化物的加入引起了受保护的多肽去保护以形成去保护的多肽,或引起受保护的格拉太咪尔去保护以形成去保护的格拉太咪尔。另外,碱金属或碱土金属氢氧化物引起在去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔中酰胺键的断裂而形成多肽或格拉太咪尔片段。

[0061] 用有机酸或无机酸优选地处理水相以实现约 7 到约 8 的 pH。调节 pH 的此类有机酸或无机酸是本领域技术人员已知的并且包括但不限于,乙酸、甲酸、乙二酸和盐酸。稀释的盐酸是优选的。使用的有机酸或无机酸的量优选是基于在步骤 (b)¹ 或步骤 (b)^{1'} 过程中加入的碱金属或碱土金属氢氧化物的当量,它足够产生约 7 到约 8 的 pH。

[0062] 通过此类方法如透析或渗滤,优选地移除不需要的低分子量多肽或格拉太咪尔片段(即小于约 2kDa)和高分子量多肽或格拉太咪尔片段(即大于约 40kDa)。优选的膜包括 Visking 部分渗透的纤维素膜,如可以从 Medicell International Ltd. 获得的具有分子量截留为 12-14kDa 的 Size6 膜;和切向流过滤 (TFF) 膜,如可从 Millipore 获得的 Pellicon XL PLCCC 10 (50cm²) 或 PLCCC 5 (50cm²)。在本发明优选的实施方案中,将去保护的多肽或

去保护的格拉太咪尔在水中透析,随后在乙酸水溶液中透析。

[0063] III. 使用胺或氨的方法

[0064] 在本发明的一个实施方案中,方法包括:

[0065] (a)² 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的多肽;

[0066] (b)² 将酸与在步骤 (a)² 中形成的受保护的多肽和溶剂混合以形成产物,优选地,将酸与包含受保护的多肽和溶剂的溶液或混悬液混合;以及

[0067] (c)² 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与在步骤 (b)² 中形成的产物,以及水或溶剂和水的混合物混合,以形成去保护的多肽或其可药用盐。

[0068] 在本发明的一个实施方案中,方法包括:

[0069] (a)^{2'} 在极性非质子溶剂中,在引发剂存在下,聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和受保护的 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物,以形成受保护的格拉太咪尔,其中所述受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ -对-甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ -苄酯和其混合物;

[0070] (b)^{2'} 将酸与在步骤 (a)^{2'} 中形成的保护的格拉太咪尔和溶剂混合以形成产物;

[0071] (c)^{2'} 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与在步骤 (b)^{2'} 中形成的产物,以及水或溶剂和水的混合物混合,以形成去保护的格拉太咪尔;以及

[0072] (d)^{2'} 用乙酸处理在步骤 (c)^{2'} 中形成的去保护的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

[0073] 在本发明方法的第一个去保护步骤步骤 (b)² 和步骤 (b)^{2'} 中,将酸与在步骤 (a)² 中形成的受保护的多肽或在步骤 (a)^{2'} 中形成的受保护的格拉太咪尔,和溶剂混合以形成产物。优选地,将酸加入到混合物(即包含受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔和溶剂的溶液或混悬液)中。在 (b)² 和步骤 (b)^{2'} 中,移除了在谷氨酸部分上的保护基(即 γ -对-甲氧基苄基和/或 γ -苄基基团)。尽管不希望被任何具体理论束缚,本发明人相信酸还裂解了受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔的酰胺键,形成异质性多肽或格拉太咪尔片段。

[0074] 适当的酸包括但不限于乙酸、盐酸、氢溴酸、氢氟酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、磷酸、三氟乙酸和硫酸。还可以使用酸的混合物。优选的酸选自三氟乙酸、乙酸和盐酸的混合物、乙酸和氢溴酸的混合物以及乙酸和硫酸的混合物。酸可以以水溶液的形式加入。

[0075] 酸优选地以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 0.1wt. % 到约 100wt. % 的量存在、更优选地以约 1wt. % 到约 10wt. % 的量存在。最优选地,酸以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 2wt. % 到约 6wt. % 的量存在。

[0076] 在酸加入过程中反应介质温度优选从约 10°C 到约 40°C,更优选是从 15°C 到约 30°C。优选地,酸加入(伴随着搅拌)进行约 1 小时到约 30 小时的时间。最优选地,在温度为约 25°C 时将酸加入到受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔中(伴随着搅拌),进行约 1 小时到约 8 小时的时间。

[0077] 用在第一个去保护步骤步骤 (b)² 和步骤 (b)^{2'} 中的溶剂选自极性质子溶剂和极性非质子溶剂。优选地,用在步骤 (b)² 和步骤 (b)^{2'} 中的溶剂选自乙酸、四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、1,4- 二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2- 二氯乙烯、二甲亚砜和二

氯甲烷。还可以使用溶剂的混合物。最优选地,用在步骤 (b)² 和步骤 (b)^{2'} 中的溶剂是四氢呋喃或乙酸。

[0078] 在步骤 (b)² 和步骤 (b)^{2'} 中使用的溶剂的量优选地是在步骤 (b)² 或步骤 (b)^{2'} 中所使用受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔量的约 1 倍 (wt.) 到约 1,000 倍 (wt.), 更优选地, 是约 10 倍 (wt.) 到约 500 倍 (wt.)。

[0079] 在本发明方法的第二个去保护步骤步骤 (c)² 和步骤 (c)^{2'} 中, 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与在步骤 (b)² 或步骤 (b)^{2'} 中形成的产物, 以及水或溶剂和水的混合物混合以形成去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔。

[0080] 优选地, 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质加入到混合物 (即包含在步骤 (b)² 或步骤 (b)^{2'} 中形成的产物, 以及水或溶剂和水的混合物的溶液或混悬液) 中。氨是 NH₃ (含水的) 或 NH₃ (气体) 的形式。优选地, 使用具有 pH 为约 7 到约 14 的氨的水溶液。将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质加入到在步骤 (b)² 或步骤 (b)^{2'} 中形成的产物中优选地移除了保护基, 如赖氨酸部分的 N^ε-三氟乙酰基基团。优选地去保护的多肽是游离碱形式的去保护的格拉太咪尔。

[0081] 选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质优选地以这样的量存在, 即所述量是在步骤 (c)² 或步骤 (c)^{2'} 中使用的步骤 (b)² 或步骤 (b)^{2'} 的产物总重量的约 1 倍 (wt.) 到约 1,000 倍 (wt.), 更优选地是约 10 倍 (wt.) 到约 500 倍 (wt.)。最优选地, 选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质以约 50 倍 (wt.) 到约 150 倍 (wt.) 的量存在。

[0082] 在约 10°C 到约 60°C、更优选是约 15°C 到约 40°C 的温度下, 优选地将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与包含在步骤 (b)² 或步骤 (b)^{2'} 中所形成产物以及水或溶剂和水的混合物的溶液或混悬液混合, 优选进行从约 1 分钟到约 60 小时的时间, 以形成去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔。适当的溶剂包括但不限于四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、1,4-二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2-二氯乙烯、二甲亚砜和二氯甲烷。优选的溶剂是四氢呋喃。

[0083] 更优选地, 在约 20°C 到约 30°C 的温度下, 将选自二异丙胺、异丙胺、氨和其混合物的物质与包含在步骤 (b)² 或步骤 (b)^{2'} 中所形成产物, 以及水或溶剂和水的混合物的溶液或混悬液混合, 进行约 1 小时到约 30 小时的时间, 以形成去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔。优选地通过蒸发或真空蒸馏将未反应的二异丙胺或氨或任何溶剂或水移除。

[0084] 优选地通过如透析或渗滤的方法移除不需要的低分子量多肽或格拉太咪尔片段 (即小于约 2kDa) 和高分子量多肽或格拉太咪尔片段 (即大于约 40kDa)。优选的膜包括 Visking 部分渗透的纤维素膜, 如可以从 Medicell International Ltd. 获得的具有分子量截留为 12-14kDa 的 Size6 膜; 和 TFF 膜, 如可从 Millipore 获得的 Pellicon XL PLCCC 10 (50cm²) 或 PLCCC 5 (50cm²)。在本发明优选的实施方案中, 将去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔在水中透析, 随后在乙酸水溶液中透析。

[0085] IV. 使用碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐的方法

[0086] 在本发明的一个实施方案中, 方法包括:

[0087] (a)³ 在极性非质子溶剂中, 在引发剂存在下, 聚合 L-酪氨酸的 N-甲酸酐、L-丙氨酸的 N-甲酸酐、受保护的 L-谷氨酸的 N-甲酸酐和受保护的 L-赖氨酸的 N-甲酸酐的混合物, 以形成受保护的多肽;

[0088] (b)³ 将酸与在步骤 (a)³ 中形成的受保护的多肽和溶剂混合以形成产物, 优选地, 将酸与包含受保护的多肽和溶剂的溶液或混悬液混合; 以及

[0089] (c)³ 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与在步骤 (b)³ 中形成的产物, 以及溶剂或溶剂和水的混合物混合, 以形成去保护的多肽或其可药用盐。

[0090] 在本发明的一个实施方案中, 方法包括:

[0091] (a)^{3'} 在极性非质子溶剂中, 在引发剂存在下, 聚合 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐、受保护的 L- 谷氨酸的 N- 甲酸酐和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐的混合物, 以形成受保护的格拉太咪尔, 其中所述受保护的 L- 谷氨酸选自 L- 谷氨酸 γ- 对- 甲氧基苄酯、L- 谷氨酸 γ- 苄酯和其混合物;

[0092] (b)^{3'} 将酸与包含在步骤 (a)^{3'} 中形成的受保护的格拉太咪尔和溶剂的混合物混合以形成产物;

[0093] (c)^{3'} 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与包含在步骤 (b)^{3'} 中形成的产物, 以及溶剂或溶剂和水的混合物的混合物混合, 以形成去保护的格拉太咪尔; 以及

[0094] (d)^{3'} 用乙酸处理在步骤 (c)^{3'} 中形成的去保护的格拉太咪尔以形成乙酸格拉太咪尔。

[0095] 在本发明方法的第一个去保护步骤步骤 (b)³ 和步骤 (b)^{3'} 中, 将酸与在步骤 (a)³ 中形成的保护的受多肽或在步骤 (a)^{3'} 中形成的受保护的格拉太咪尔, 以及溶剂混合以形成产物。优选地, 将酸加入到混合物 (即包含受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔和溶剂的溶液或混悬液) 中。在 (b)³ 和步骤 (b)^{3'} 中, 移除了在谷氨酸部分的保护基 (即 γ- 对- 甲氧基苄基和 / 或 γ- 苄基基团)。尽管不希望被任何具体理论束缚, 本发明人相信酸还裂解受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔的酰胺键, 形成异质性多肽片段。

[0096] 适当的酸包括但不限于乙酸、盐酸、氢溴酸、氢氟酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、磷酸、三氟乙酸和硫酸。还可以使用酸的混合物。优选的酸选自三氟乙酸、乙酸和盐酸的混合物、乙酸和氢溴酸的混合物以及乙酸和硫酸的混合物。酸可以以水溶液的形式加入。

[0097] 酸优选地以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 0.1wt. % 到约 100wt. % 的量存在、更优选地以约 1wt. % 到约 10wt. % 的量存在。最优选地, 酸以占受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔重量的约 2wt. % 到约 6wt. % 的量存在。

[0098] 在酸加入过程中反应介质温度优选从约 10°C 到约 40°C, 更优选是从 15°C 到约 30°C。优选地, 酸加入 (伴随着搅拌) 进行约 1 小时到约 30 小时的时间。最优选地, 在温度为约 25°C 时将酸加入到受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔中 (伴随着搅拌), 进行约 1 小时到约 8 小时的时间。

[0099] 用在第一个去保护步骤步骤 (b)³ 和步骤 (b)^{3'} 中的溶剂选自极性质子溶剂和极性非质子溶剂。优选地, 用在步骤 (b)³ 和步骤 (b)^{3'} 中的溶剂选自乙酸、四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、1,4- 二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2- 二氯乙烯、二甲亚砜和二氯甲烷。还可以使用溶剂的混合物。最优选地, 用在步骤 (b)³ 和步骤 (b)^{3'} 中的溶剂是四氢呋喃或乙酸。

[0100] 在步骤 (b)³ 和步骤 (b)^{3'} 中使用的溶剂的量优选地是在步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 中

所使用受保护的多肽或受保护的格拉太咪尔量的约 1 倍 (wt.) 到约 1,000 倍 (wt.), 更优选地, 是约 10 倍 (wt.) 到约 500 倍 (wt.)。

[0101] 在本发明方法的第二个去保护步骤步骤 (c)³ 和步骤 (c)^{3'} 中, 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与在步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 中形成的产物, 以及水或溶剂和水的混合物混合以形成去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔。

[0102] 优选的, 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质加入到混合物 (即包含在步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 中形成的产物, 以及水或溶剂和水的混合物的溶液或混悬液) 中。将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质加入到在步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 中形成的产物中优选地移除了赖氨酸部分的 N^ε-三氟乙酰基基团。优选地去保护的多肽是游离碱形式的去保护的格拉太咪尔。

[0103] 物质选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐和碳酸氢盐, 并且包括氢氧化钙、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化钾、氢氧化钡、氢氧化钠、碳酸钙、碳酸锂、碳酸镁、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钙、碳酸氢锂、碳酸氢镁、碳酸氢钾和碳酸氢钠。更优选地, 在步骤 (c)³ 或 (c)^{3'} 中使用的物质选自氢氧化钠、氢氧化锂和氢氧化钾。

[0104] 选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质优选地以这样的量存在, 即所述量是在步骤 (c)³ 或步骤 (c)^{3'} 中使用的步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 的产物总重量的约 1 倍 (wt.) 到约 1,000 倍 (wt.), 更优选地是约 10 倍 (wt.) 到约 500 倍 (wt.)。最优选地, 选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质以约 50 倍 (wt.) 到约 150 倍 (wt.) 的量存在。

[0105] 在约 10°C 到约 60°C、更优选是约 15°C 到约 40°C 的温度下, 优选地将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与包含在步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 中所形成产物、以及水或溶剂和水的混合物的溶液或混悬液混合, 进行优选从约 1 分钟到约 60 小时的时间, 以形成去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔。适当的溶剂包括但不限于四氢呋喃、乙酸乙酯、二甲基呋喃、二甲基甲酰胺、1,4-二噁烷、二甲氧基乙烷、1,2-二氯乙烯、二甲亚砷和二氯甲烷。优选的溶剂是四氢呋喃。

[0106] 更优选地, 在约 20°C 到约 30°C 的温度下, 将选自碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐和其混合物的物质与包含在步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 中所形成产物, 以及水或溶剂和水的混合物的溶液或混悬液混合, 进行约 1 小时到约 30 小时的时间, 以形成去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔。优选地通过蒸发或真空蒸馏移除未反应的碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐或任何溶剂或水。

[0107] 在步骤 (c)³ 或步骤 (c)^{3'} 中使用的溶剂或溶剂和水的混合物的量优选地是在步骤 (c)³ 或步骤 (c)^{3'} 中所使用的步骤 (b)³ 或步骤 (b)^{3'} 产物总重量的约 1 倍 (wt.) 到约 1,000 倍 (wt.), 更优选地, 是约 10 倍 (wt.) 到约 500 倍 (wt.)。

[0108] 在第二个去保护步骤步骤 (c)³ 和步骤 (c)^{3'} 后, 优选在分液漏斗中分离任一层, 或优选地通过蒸发或真空蒸馏移除溶剂。去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔优选地作为水中的溶液得到。

[0109] 通过此类方法如透析或渗滤, 优选地移除不需要的低分子量多肽或格拉太咪尔片段 (即小于约 2kDa) 和高分子量多肽或格拉太咪尔片段 (即大于约 40kDa)。优选的膜包括 Visking 部分渗透的纤维素膜, 如可以从 Medicell International Ltd. 获得的具有分子

量截留为 12-14kDa 的 Size6 膜;和 TFF 膜,如可从 Millipore 获得的 Pellicon XL PLCCC 10 (50cm²) 或 PLCCC 5 (50cm²)。在本发明优选的实施方案中,将去保护的多肽或去保护的格拉太咪尔在水中透析,随后在乙酸水溶液中透析。

[0110] 根据本发明方法制备的多肽或其可药用盐的重量平均分子量优选从约 2kDa 到约 30kDa,更优选从约 4.7kDa 到约 11kDa,并且最优选是从约 7kDa 到约 10kDa,如通过气体透过滤谱 (GPC) 测定。优选地,多肽或其可药用盐基本上没有分子量大于约 40kDa 的多肽片段。优选地,多肽或其可药用盐基本上没有分子量小于约 2kDa 的多肽片段。如本文用到的,“基本没有”意思是少于根据本发明方法制备的多肽重量的约 5%、更优选是少于根据本发明方法制备的多肽重量的约 2.5%。

[0111] 根据本发明方法制备的多肽或其可药用盐(优选乙酸格拉太咪尔)可以通过本领域已知的常规方法配制。

[0112] 在本发明的一个实施方案中,将通过本发明方法制备的多肽或其可药用盐溶解或混悬在可药用的液体载体如水中,并且将溶液或混悬液注射到体内。

[0113] 在本发明的一个实施方案中,将格拉太咪尔乙酸盐溶解在包含水和甘露糖醇的混合物中,并且将溶液注射到体内。

[0114] 通常,将多肽或其可药用盐每天施用给患有多发性硬化的患者,例如以 20mg 乙酸格拉太咪尔的剂量。

[0115] 下列非限制性实施例阐明了本发明的其他方面。

[0116] 实施例 1-7 涉及制备乙酸格拉太咪尔的酸水解方法。

[0117] 实施例 1

[0118] 受保护的多肽的制备

[0119] 将 L-丙氨酸的 N-甲酸酐 (860mg, 7.5mmol)、L-谷氨酸 γ -苄酯的 N-甲酸酐 (600mg, 2.3mmol)、N-叔-丁氧基羰基 L-赖氨酸的 N-甲酸酐 (1410mg, 5.2mmol) 和 L-酪氨酸的 N-甲酸酐 (300mg, 1.4mmol) 放在三颈烧瓶中。加入经蒸馏的无水二噁烷 (57ml)。加入二乙胺 (3.4 μ l)。将得到的混合物在约 22-25°C 的温度下机械搅拌 24 小时。将混合物缓慢的倒入 100 毫升去离子水中并且在真空下过滤。将固体在真空下保持 12 小时。

[0120] 实施例 2

[0121] 受保护的多肽的制备

[0122] 将 L-丙氨酸的 N-甲酸酐 (430mg, 3.75mmol)、L-谷氨酸 γ -苄酯的 N-甲酸酐 (300mg, 1.15mmol)、N-叔-丁氧基羰基 L-赖氨酸的 N-甲酸酐 (705mg, 2.6mmol) 和 L-酪氨酸的 N-甲酸酐 (150mg, 0.7mmol) 放在三颈烧瓶中。加入经蒸馏的无水二噁烷 (28.5ml)。加入二乙胺 (1.7 μ l)。将得到的混合物在约 22-25°C 的温度下机械搅拌 24 小时。将混合物缓慢的倒入 100 毫升去离子水中并且在真空下过滤。将固体在真空下保持 12 小时。

[0123] 实施例 3

[0124] 用 HBr/乙酸去保护在实施例 1 中制备的受保护的多肽

[0125] 将在实施例 1 中制备的受保护的多肽 (200mg) 混悬在 7mL 33% 的溶于乙酸的氢溴酸中。原材料缓慢溶解形成红棕色溶液。在约 22°C 的温度下将混合物搅拌 17 小时。使用旋转式汽化器在降低的压力下将 HBr/乙酸溶液蒸发到干燥。向此剩余物中加入 100mL 的水来溶解固体。将溶液放在管形 (Size6) 的 Visking 部分渗透的纤维素膜中,该膜具有分

子量截留 12-14kDa。Size6 管直径为 27/32 英寸、21.5mm, 以及宽为 32-34mm。该管可以从 Medicell International Ltd 获得。将含有溶液的管在有水烧杯中搅动。通过渗透作用从透析管移除具有分子量小于约 2kDa 的多肽片段。将管从水中取出并且在含有 0.3% 的溶于水的乙酸的烧杯中搅动。将得到的产物从管中移除并且冻干以得到作为纯白色固体的乙酸格拉太咪尔。

[0126] 实施例 4

[0127] 用 HCl/ 乙酸去保护在实施例 1 中制备的受保护的多肽

[0128] 将在实施例 1 中制备的受保护的多肽 (200mg) 混悬在 20mL 混合物 (用冰乙酸将 9.4ml 浓盐酸调节到 20mL 来制备) 中。原材料缓慢溶解形成略微混浊的溶液。在约 22℃ 的温度下将混合物搅拌 17 小时。使用旋转式汽化器在降低的压力下将 HCl/ 乙酸溶液蒸发到干燥。向此剩余物中加入 100mL 的水来溶解固体。将溶液放在管形 (Size6) 的 Visking 部分渗透的纤维素膜中, 该膜具有分子量截留 12-14kDa。Size6 管具有直径 27/32 英寸、21.5mm, 以及宽为 32-34mm。该管可以从 Medicell International Ltd 获得。将含有溶液的管在有水烧杯中搅动。通过渗透作用从透析管移除分子量小于约 2kDa 的多肽片段。将管从水中取出并且在含有 0.3% 的溶于水的乙酸的烧杯中搅动。将得到的产物从管中移除并且冻干以得到作为纯白色固体的乙酸格拉太咪尔。

[0129] 实施例 5

[0130] 用 HCl/ 酸去保护在实施例 2 中制备的受保护的多肽

[0131] 将在实施例 2 中制备的受保护的多肽 (200mg) 混悬在 20mL 混合物 (用冰乙酸将 9.4ml 浓盐酸调节到 20mL 来制备) 中。原材料缓慢溶解形成略微混浊的溶液。在约 22℃ 的温度下将混合物搅拌 17 小时。使用旋转式汽化器在降低的压力下将 HCl/ 酸溶液蒸发到干燥。向此剩余物中加入 100mL 的水来溶解固体。将溶液放在管形 (Size6) 的 Visking 部分渗透的纤维素膜中, 该膜具有分子量截留 12-14kDa。Size6 管具有直径 27/32 英寸、21.5mm, 以及宽为 32-34mm。该管可以从 Medicell International Ltd 获得。将含有溶液的管在有水烧杯中搅动。通过渗透作用从透析管移除分子量小于约 2kDa 的多肽片段。将管从水中取出并且在含有 0.3% 的溶于水的乙酸的烧杯中搅动。将得到的产物从管中移除并且冻干以得到作为纯白色固体的乙酸格拉太咪尔。

[0132] 实施例 6

[0133] 使用 UV 检测器通过 GPC 确定相对分子量

[0134] GPC-UV 检测器条件:

[0135] 洗脱液: 磷酸盐缓冲液 0.05M, pH 7.4, 5.6g Na₂HPO₄, 116g

[0136] NaCl/4L 水

[0137] 柱: PSS Suprema, 10 μm, 100A, 8×300mm.

[0138] 温度: 23℃

[0139] 泵: TSPAS 3000 自动取样器

[0140] 注射体积: 50 μL

[0141] 浓度: 约 2.0mg/mL

[0142] 检测器: 在 276nm 下 TSP UV2000

[0143] GPC- 软件: PSS WinGPC 版本 7.2

- [0144] 样品 :COPAXONE® (Lot#5308036) 其中甘露糖醇已经通过透
 [0145] 析移除
 [0146] COPAXONE® (Lot#8040341) 其中甘露糖醇已经通过透
 [0147] 析移除
 [0148] 样品 A 是根据本发明方法在实施例 4 中制备的乙酸格拉太
 [0149] 咪尔
 [0150] 样品 B 是根据本发明方法在实施例 5 中制备的乙酸格拉太
 [0151] 咪尔
 [0152] 样品制备 :将称重的样品分散在洗脱液中并且允许在室温下进行完
 [0153] 全水合约 12 小时。将样品溶液穿过 1.0 过滤装置
 [0154] (Schleicher & Schuell) 过滤
 [0155] 将 GPC 的测试结果总结在表 I 中。
 [0156] 表 I
 [0157]

样品	M _w [kD]
COPAXONE® (Lot # 5308036)	7.923
COPAXONE® (Lot # 8040341)	9.524
样品 A	8.551
样品 B	7.689

- [0158] 在表 I 中的测试结果清楚说明用本发明方法制备的乙酸格拉太咪尔样品 A 和样品 B 的重量平均分子量分别是 8.551kDa 和 7.689kDa, 并且 COPAXONE® 的重量平均分子量是 7.923kDa 和 9.524kDa, 取决于批号。

- [0159] 实施例 7
 [0160] 使用折射率检测器通过凝胶渗透层析 (GPC) 确定相对分子量
 [0161] GPC-RI 检测器条件 :
 [0162] 洗脱液 :磷酸盐缓冲液 0.05M, pH 7.4, 5.6g Na₂HPO₄, 116gNaCl/4L 水
 [0163] 柱 :PSS Suprema, 10 μ m, 100Å, 8×300mm
 [0164] 温度 :23℃
 [0165] 泵 :TSP AS 3000 自动取样器
 [0166] 注射体积 :50 μ L
 [0167] 浓度 :约 2.0mg/mL
 [0168] 检测器 :Shodex RI 71
 [0169] GPC- 软件 :PSS WinGPC 版本 7.2
 [0170] 样品 :COPAXONE® (Lot#5308036) 其中甘露糖醇已经通过透
 [0171] 析移除
 [0172] COPAXONE® (Lot#8040341) 其中甘露糖醇已经通过透

- [0173] 析移除
- [0174] 样品 A 是根据本发明方法在实施例 4 中制备的乙酸格拉太
- [0175] 咪尔
- [0176] 样品 B 是根据本发明方法在实施例 5 中制备的乙酸格拉太
- [0177] 咪尔
- [0178] 样品制备 : 将称重的样品分散在洗脱液中并且允许在室温下进行完
- [0179] 全水合约 12 小时。将样品溶液穿过 1.0 过滤装置
- [0180] (Schleicher & Schuell) 过滤
- [0181] 使用 RI 检测器的 GPC 的测试结果总结在表 II 中。
- [0182] 表 II
- [0183]

样品	M _w [kD]
COPAXONE® (Lot # 5308036)	8.663
COPAXONE® (Lot # 8040341)	9.641

[0184]

样品 A	9.581
样品 B	8.224

[0185] 在表 II 中的测试结果清楚说明用本发明方法制备的乙酸格拉太咪尔样品 A 和样品 B 的重量平均分子量分别是 9.581kDa 和 8.224kDa, 并且 COPAXONE® 的重量平均分子量是 8.663kDa 和 9.641kDa, 取决于批号。

[0186] 实施例 8-17 涉及用于制备乙酸格拉太咪尔的相转移方法。

[0187] 本发明人已经建立了 1 (低) 到 5 (高) 的等级以量化碱性化合物 (氢氧化钠) 对格拉太咪尔形成的影响。测试结果总结在表 III 中。

[0188] 表 III.

[0189]

溶于 15mL THF 的 NaOH 浓度 +75mg 格 拉太咪尔游离碱	相分 离	从水相中对所 需分子量产物 的回收 SM = 75mg	低分子 量多肽 形成	具有所需分 子量截留的 产物
0.1N/5mL	No	1	1	1
0.25N/5mL	1	5	1	5
0.25N/10mL	1	5	1	5

溶于 15mL THF 的 NaOH 浓度 +75mg 格 拉太咪尔游离碱	相分 离	从水相中对所 需分子量产物 的回收 SM = 75mg	低分子 量多肽 形成	具有所需分 子量截留的 产物
0.5N/5mL	3	3	2	4
0.5N/10mL	4	3	3	3
0.5N/10mL+10mL 水	5	3	2	4
1.0N/5mL	5	3	5	1

[0190] 在表 III 中的结果清楚说明 0.1-1.0N 氢氧化钠溶液可以用来制备本发明的多肽或其可药用盐产物。在表 III 中的结果还说明优选使用浓度至少为 0.25N 的氢氧化钠来促进有机相和水相的相分离。

[0191] 实施例 8

[0192] 聚合步骤 (a)

[0193] 将酪氨酸的 N- 甲酸酐 (30mg, 0.010mm)、丙氨酸的 N- 甲酸酐 (62mg, 0.054mm)、谷氨酸 γ - 苄酯的 N- 甲酸酐 (42mg, 0.016mm) 和 E-N- 三氟乙酰赖氨酸的 N- 甲酸酐 (100mg, 0.037mm) 放在具有磁力搅拌器的单颈烧瓶中。向此混合物中加入 20mL 的无水四氢呋喃。得到澄清的溶液。加入二乙胺 (10 μ L)。将得到的混合物搅拌 48 小时。通过蒸发移除四氢呋喃。将水 (150mL) 加入到剩余物中并且持续搅拌。得到白色固体。将固体过滤并且在真空下干燥器中干燥。

[0194] 确定产量为 154mg。

[0195] 实施例 9

[0196] 去保护步骤 (b)

[0197] 将在实施例 8 中制备的受保护的乙酸格拉太咪尔 75mg 转移到提供了磁力搅拌器的单颈烧瓶中。将四氢呋喃 (15mL) 加入到烧瓶中并且搅拌。得到澄清的溶液。加入 0.5N 的氢氧化钠水溶液 (8mL)。氢氧化钠溶液的加入使混合物变得混浊。将混合物在 24-26°C 下搅拌 1 小时。观察到两相的形成。将底层分离并且用稀释的 1N HCl 水溶液酸化到 pH = 6.0 (伴随着搅拌)。使用尼龙滤器 (0.2 微米 Nylon Acrodisk) 过滤粗格拉太咪尔游离碱溶液。

[0198] 实施例 10

[0199] 将在实施例 8 中制备的受保护的乙酸格拉太咪尔 75mg 转移到提供了磁力搅拌器的单颈烧瓶中。将四氢呋喃 (15mL) 加入到烧瓶中并且搅拌。得到澄清的溶液。加入 0.25N 的氢氧化钠水溶液 (10mL)。氢氧化钠溶液的加入使混合物变得混浊。将混合物在 25-26°C 下搅拌 16 小时。将反应混合物离心 15 分钟。观察到两相的形成。将底层分离并且用稀释的 HCl 水溶液酸化到 pH = 7-7.5 (伴随着搅拌)。继续搅拌另外 30 分钟并且测定 pH 为 pH = 8.0。将粗格拉太咪尔游离碱溶液过滤。

[0200] 实施例 11

[0201] 聚合步骤。

[0202] 将酪氨酸的 N- 甲酸酐 (30mg, 0.010mm)、丙氨酸的 N- 甲酸酐 (62mg, 0.054mm)、谷氨酸 γ - 苄酯的 N- 甲酸酐 (42mg, 0.016mm) 和 E-N- 三氟乙酰赖氨酸的 N- 甲酸酐 (100mg, 0.037mm) 放在具有磁力搅拌器的单颈烧瓶中。向此混合物中加入 20mL 的无水二噁烷。得到澄清的溶液。加入二乙胺 (10 μ L)。将得到的混合物搅拌 48 小时。向其中缓慢加入水 (150mL), 伴随着搅拌。得到白色固体。将固体过滤并且在真空下干燥器中干燥。

[0203] 确定产量为 170mg。

[0204] 实施例 12

[0205] 去保护步骤

[0206] 将在实施例 11 中制备的受保护的乙酸格拉太咪尔 75mg 转移到提供了磁力搅拌器的单颈烧瓶中。将二噁烷 (15mL) 加入到烧瓶中并且搅拌。得到澄清的溶液。加入 0.5N 的氢氧化钠水溶液 (10mL)。氢氧化钠溶液的加入使混合物变得混浊。将混合物在 25-26°C 下搅拌 16 小时。将反应混合物离心 15 分钟。观察到两相的形成。将底层分离并且用稀释的 HCl 水溶液酸化到 pH = 7-7.5 (伴随着搅拌)。继续搅拌另外 30 分钟并且测定 pH 为 pH = 8.0。将粗格拉太咪尔游离碱溶液过滤。

[0207] 实施例 13

[0208] 在更低温度下进行去保护步骤

[0209] 将在实施例 12 中制备的受保护的乙酸格拉太咪尔 75mg 转移到提供了磁力搅拌器的单颈烧瓶中。将四氢呋喃 (15mL) 加入到烧瓶中并且将溶液温度降低到 0°C。将 0.5N 的氢氧化钠水溶液 (10mL) 加入到溶液中, 同时保持温度为 0°C。氢氧化钠的加入使溶液变得混浊。溶液在 0°C 下搅拌 3 小时。观察到两相的形成。在 0°C 下将底层分离并且用稀释的 HCl 水溶液酸化到 pH = 7-7.5 (伴随着搅拌)。继续搅拌另外 30 分钟并且测定 pH 为约 pH = 8.0。将粗格拉太咪尔游离碱溶液过滤。

[0210] 实施例 14

[0211] 用乙酸盐溶液的去保护步骤

[0212] 将在实施例 12 中制备的受保护的乙酸格拉太咪尔 75mg 转移到提供了磁力搅拌器的单颈烧瓶中。将四氢呋喃 (15mL) 加入到烧瓶中并且将溶液温度降低到 0°C。将 0.5N 的氢氧化钠水溶液 (10mL) 和乙酸 (2mL) 加入到溶液中, 同时保持温度为 0°C 并且 pH = 12。氢氧化钠和乙酸的加入使溶液变得混浊。溶液在 0°C 下搅拌 3 小时。观察到两相的形成。在 0°C 下将底层分离并且用稀释的 HCl 水溶液酸化到 pH = 7-7.5 (伴随着搅拌)。继续搅拌另外 30 分钟并且测定 pH 为约 pH = 8.0。将粗格拉太咪尔游离碱溶液过滤。

[0213] 实施例 15

[0214] 将在实施例 8 中制备的受保护的乙酸格拉太咪尔 75mg 转移到提供了磁力搅拌器的单颈烧瓶中。将二噁烷 (15mL) 加入到烧瓶中并且搅拌。得到澄清的溶液。加入 0.25N 的氢氧化钠水溶液 (10mL)。氢氧化钠溶液的加入使混合物变得混浊。将混合物在 25-26°C 下搅拌 16 小时。将反应混合物离心 15 分钟。观察到两相的形成。将底层分离并且用稀释的 HCl 水溶液酸化到 pH = 7-7.5 (伴随着搅拌)。继续搅拌另外 30 分钟并且测定 pH 为 pH = 8.0。将粗格拉太咪尔游离碱溶液过滤。

[0215] 实施例 16

[0216] 渗滤（切向流过滤）

[0217] 将在实施例 9 中制备的粗格拉太咪尔游离碱溶液用水稀释到 120。将稀释溶液首先过滤通过 10K 渗滤膜，即从 Millipore 可得的 Pellicon XL, PLCCC10 (50cm²)，并且之后过滤通过 10K 渗滤膜，即从 Millipore 可得的 Pellicon XL, PLCCC5 (50cm²)。将得到的浓缩液冻干。得到白色粉末。

[0218] 实施例 17

[0219] 乙酸格拉太咪尔纯化的层析方法

[0220] 使在实施例 9 中制备的粗格拉太咪尔游离碱溶液经过层析分离。根据制造商的说明，在 Superformance 26Merck 柱体中制备用于凝胶过滤的柱子 FRACTOGEL TSK HW55 (600×26mm)。将柱子用 0.2M 乙酸铵缓冲液 (pH = 5.0) 平衡，将 30mL 格拉太咪尔游离碱溶液样品 (20mg/mL，溶于 0.2M 乙酸铵 (pH 5.0)) 装填到柱子上并且每 10 分钟收集级分。分离具有平均分子量为 7-8KDa 的级分。

[0221] 实施例 18-25 涉及使用碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐制备乙酸格拉太咪尔的方法。

[0222] 实施例 18

[0223] 受保护的多肽的制备

[0224] 将 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐 (207.19mg, 1.0mM)、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐 (620mg, 5.4mM)、L- 谷氨酸 γ - 苄酯的 N- 甲酸酐 (430mg, 1.6mM) 和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐 (1.01g, 3.73mM) 放在具有磁力搅拌器的单颈烧瓶 (100mL) 中。向此混合物中加入 40mL 的四氢呋喃。加入二乙胺 (10 μ L)。将得到的混合物在约 25°C 的温度下搅拌 24 小时。将混合物缓慢倒入 100mL 水中，同时搅拌。将固体沉淀。在搅拌 2 小时后过滤固体并且用水洗涤。将固体重悬在 100mL 水中并且过滤。固体在真空下保持约 12 小时。

[0225] 实施例 19

[0226] 受保护的多肽的制备

[0227] 将 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐 (207.19mg, 1.0mM)、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐 (620mg, 5.4mM)、L- 谷氨酸 γ - 苄酯的 N- 甲酸酐 (430mg, 1.6mM) 和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐 (1.01g, 3.73mM) 放在具有磁力搅拌器的单颈烧瓶 (100mL) 中。向此混合物中加入 40mL 的二噁烷。加入二乙胺 (10 μ L)。将得到的混合物在约 25°C 的温度下搅拌 48 小时。将混合物缓慢倒入 100mL 水中，同时搅拌。将固体沉淀。过滤固体并且用水洗涤。将固体重悬在 100mL 水中并且过滤。将固体在真空下保持约 12 小时。

[0228] 实施例 20

[0229] 从在实施例 2 中制备的多肽上切割 γ - 苄基部分

[0230] 将在实施例 19 中制备的受保护的多肽 100mg 混悬在四氢呋喃 (20mL) 中并且在冰水浴中冷冻。加入 4mL 浓硫酸。将得到的澄清溶液在约 25°C 的温度下搅拌 20 小时。通过在 25°C 下蒸发移除溶剂四氢呋喃，以形成粘性液体。将 50mL 水加入到粘性液体中，伴随着搅拌。形成白色沉淀物，将其在真空下过滤并且在黑暗中以 25°C 真空下用五氧化二磷干燥约 12 小时。得到白色固体。将固体过滤并且在真空下在干燥器中干燥。确定产量为 75mg。

[0231] 实施例 21

[0232] 从在实施例 20 中制备的多肽上切割 N^ε- 三氟乙酰基部分。

[0233] 将在实施例 20 中制备的受保护的多肽 75mg 分散在 12mL 四氢呋喃中,加入 4mL 的 0.5M 氢氧化钠水溶液,伴随着搅拌。将混合物在环境温度(约 22℃)下搅拌 3 小时。将较低的水层分离并且用乙酸酸化到 pH = 6.0。

[0234] 实施例 22

[0235] 从在实施例 19 中制备的多肽上切割 γ -苄基部分。

[0236] 将在实施例 19 中制备的受保护的多肽 1g 混悬在 50mL 混合物(用冰乙酸将 47mL 浓缩的 HCl 调节到 100mL 来制备)中。原材料缓慢溶解形成略微混浊的溶液。将混合物在约 22℃ 的温度下搅拌 18 小时。将溶液倒入 1000mL 搅拌的水中。形成白色沉淀物。将混悬液搅拌另外 3 小时并且之后过滤。将产物用水洗涤并且在 50℃ 真空下干燥约 17 小时。

[0237] 实施例 23

[0238] 从在实施例 22 中制备的多肽上切割 N^ε-三氟乙酰基部分。

[0239] 将在实施例 22 中制备的受保护的多肽 300mg 分散在 45mL 四氢呋喃中,加入 25mL 的 0.5M 氢氧化钠水溶液,伴随着搅拌。将混合物在环境温度(约 22℃)下搅拌 3 小时。形成澄清的两相液体系统。将较低的水层分离并且用乙酸酸化到 pH = 6.0。将澄清无色的溶液装满透析袋并且在环境温度下对 0.3% 乙酸水溶液透析 1 次,并且之后对水透析,直到达到 pH5.5。将溶液过滤并且冻干以提供作为白色固体的乙酸格拉太咪尔。

[0240] 实施例 24

[0241] 渗滤(切向流过滤)

[0242] 将在实施例 21 中制备的乙酸格拉太咪尔溶液用水调节到 120mL,以提供 0.5-0.6mg/mL 浓度的乙酸格拉太咪尔。将稀释溶液首先过滤通过 30K 渗滤膜,即从 Millipore 可得的 Pellicon XL, PLCCC10 (50cm²),并且之后过滤通过 3K 渗滤膜,即从 Millipore 可得的 Pellicon XL, PLCCC5 (50cm²)。将得到的浓缩的溶液冻干以提供固体形式的乙酸格拉太咪尔。

[0243] 实施例 25

[0244] 乙酸格拉太咪尔纯化的层析方法

[0245] 使在实施例 23 中制备作为 pH = 6 的萃取物的格拉太咪尔在真空中浓缩至干燥并且进行层析分离。根据制造商的说明,在 Superformance 26Merck 柱体中制备用于凝胶过滤的柱子 FRACTOGEL TSK HW55 (600×26mm)。将柱子用 0.2M 乙酸铵缓冲液 (pH = 5.0) 平衡,将 30mL 格拉太咪尔游离碱溶液样品 (20mg/mL,溶于 0.2M 乙酸铵 (pH 5.0)) 装填到柱子上并且收集级分。分离平均分子量为 7-10kDa 的级分。

[0246] 实施例 26-33 涉及使用胺或氨制备乙酸格拉太咪尔的方法。

[0247] 实施例 26

[0248] 受保护的多肽的制备

[0249] 将 L-酪氨酸的 N-甲酸酐 (207.19mg, 1.0mM)、L-丙氨酸的 N-甲酸酐 (620mg, 5.4mM)、L-谷氨酸 γ -苄酯的 N-甲酸酐 (430mg, 1.6mM) 和 N^ε-三氟乙酰-L-赖氨酸的 N-甲酸酐 (1.01g, 3.73mM) 放在具有磁力搅拌器的单颈烧瓶 (100mL) 中。向此混合物中加入 40mL 的四氢呋喃。加入二乙胺 (10 μ L)。将得到的混合物在约 25℃ 的温度下搅拌 24 小时。将混合物缓慢倒入 100mL 水中,同时搅拌。将固体沉淀。在搅拌 2 小时后过滤固体并且用水洗涤。将固体重悬在 100mL 水中并且过滤。固体在真空下保持约 12 小时。

[0250] 实施例 27

[0251] 受保护的多肽的制备

[0252] 将 L- 酪氨酸的 N- 甲酸酐 (207.19mg, 1.0mM)、L- 丙氨酸的 N- 甲酸酐 (620mg, 5.4mM)、L- 谷氨酸 γ - 苄酯的 N- 甲酸酐 (430mg, 1.6mM) 和 N^ε- 三氟乙酰 L- 赖氨酸的 N- 甲酸酐 (1.01g, 3.73mM) 放在具有磁力搅拌器的单颈烧瓶 (100mL) 中。向此混合物中加入 40mL 的二噁烷。加入二乙胺 (10 μ L)。将得到的混合物在约 25℃ 的温度下搅拌 48 小时。将混合物缓慢倒入 100mL 水中, 同时搅拌。将固体沉淀。过滤固体并且用水洗涤。将固体重悬在 100mL 水中并且过滤。将固体在真空下保持约 12 小时。

[0253] 实施例 28

[0254] 从在实施例 27 中制备的多肽上切割 γ - 苄基部分

[0255] 将在实施例 27 中制备的受保护的多肽 100mg 混悬在四氢呋喃 (20mL) 中并且在冰水浴中冷冻。加 4mL 浓硫酸。将得到的澄清溶液在约 25℃ 的温度下搅拌 20 小时。通过在 25℃ 下蒸发移除溶剂四氢呋喃, 以形成粘性液体。将 50mL 水加入到粘性液体中, 伴随着搅拌。形成白色沉淀物, 将其在真空下过滤并且在黑暗中以 25℃ 真空下用五氧化二磷干燥约 12 小时。得到白色固体。将固体过滤并且在真空下在干燥器中干燥。确定产量为 75mg。

[0256] 实施例 29

[0257] 从在实施例 27 中制备的多肽切割 γ - 苄基部分

[0258] 将在实施例 27 中制备的受保护的多肽 1g 混悬在 50mL 的混合物 (用冰乙酸将 47mL 浓 HCl 调节到 100mL 来制备) 中。原材料缓慢溶解形成略微混浊的溶液。将混合物在约 22℃ 的温度下搅拌 18 小时。将溶液倒入 1000mL 搅拌的水中。形成白色沉淀物。将混悬液搅拌另外 3 小时并且之后过滤。将产物用水洗涤并且在 50℃ 真空下干燥约 17 小时。

[0259] 实施例 30

[0260] 对将用来从在实施例 28 中制备的多肽上切割 N^ε- 三氟乙酰基部分的胺的评估

[0261] 将在实施例 28 中制备的多肽 75mg 混悬在 15mL 水中。将 7mL 胺加入到混悬液中, 以提供 3M 浓度的胺。在表 IV 中提供了胺的列表。由于去保护的多肽在水中可溶, 反应通过溶液透明度来监控。在表 IV 中总结了每种胺的结果。

[0262] 表 IV

[0263] 胺	结果
[0264] 吗啉	48 小时后无澄清溶液。
[0265] N- 甲基 - 哌嗪	48 小时后无澄清溶液。
[0266] 二环己基胺	48 小时后无澄清溶液。
[0267] 二仲丁基胺	48 小时后无澄清溶液。
[0268] 吡咯烷	48 小时后无澄清溶液。
[0269] 二异丙胺	约 1 小时后有澄清溶液。
[0270] 二丙胺	48 小时后无澄清溶液。
[0271] 异丙胺	1.5 小时后有澄清溶液。
[0272] 甲胺 (含水)	48 小时后无澄清溶液。

[0273] 在表 IV 中的结果清楚表明在实施例 28 中制备的多肽的游离碱形式只有在加入二异丙胺或异丙胺时形成。在表 I 中的结果还表明二丙胺、吗啉、N- 甲基 - 哌嗪、二环己基胺、

二仲丁基胺、吡咯烷和甲胺不能产生多肽的游离碱形式。

[0274] 因此, 申请人出乎意料地确定在本发明方法的第二个去保护步骤步骤 (b) 中, 二异丙胺和异丙胺是仅有的能够成功移除赖氨酸部分的 N^{ϵ} -三氟乙酰基基团的胺。

[0275] 实施例 31

[0276] 从在实施例 28 中制备的多肽上切割 N^{ϵ} -三氟乙酰基部分

[0277] 将在实施例 28 中制备的多肽 75mg 混悬在 15mL 水中。将二异丙胺 7mL 加入到混悬液中以提供 3M 浓度的胺。在约 1 小时内乳白色溶液变澄清并且将澄清的溶液在 25°C 下搅拌 20 小时。将反应混合物在约 25°C 下蒸发以形成粘性液体形式的粗格拉太咪尔游离碱。将百分之五十 (50%) 的乙酸 (15mL) 加入到混合物中并且搅拌 30 分钟以形成乙酸格拉太咪尔溶液。

[0278] 实施例 32

[0279] 渗滤 (切向流过滤)

[0280] 将在实施例 31 中制备的乙酸格拉太咪尔溶液用水稀释到 120mL。将稀释溶液首先过滤通过 30K 渗滤膜, 即从 Millipore 可得的 Pellicon XL, PLCCC10 (50cm²), 并且之后过滤通过 3K 渗滤膜, 即从 Millipore 可得的 Pellicon XL, PLCCC5 (50cm²)。将得到的浓缩溶液冻干以提供固体形式的乙酸格拉太咪尔。

[0281] 实施例 33

[0282] 乙酸格拉太咪尔纯化的层析方法

[0283] 使在实施例 31 中制备的乙酸格拉太咪尔溶液在真空中浓缩以干燥并且进行层析分离。根据制造商的说明, 在 Superformance 26Merck 柱体中制备用于凝胶过滤的柱子 FRACTOGEL TSK HW55 (600×26mm)。将柱子用 0.2M 乙酸铵缓冲液 (pH = 5.0) 平衡, 将 30mL 格拉太咪尔游离碱溶液样品 (20mg/mL, 溶于 0.2M 乙酸铵 (pH 5.0)) 加到柱子上并且收集级分。分离平均分子量为 7-10kDa 的级分。

[0284] 尽管已经具体参考其某些实施方案来描述本发明, 但是要理解的是技术人员在下列权利要求的范围和精神内可以做出改变和修饰。