

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03817508.8

[51] Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

C08G 65/332 (2006.01)

C08G 65/337 (2006.01)

C08G 65/329 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100337689C

[22] 申请日 2003.7.16 [21] 申请号 03817508.8

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 24 [33] US [31] 60/398,137

[86] 国际申请 PCT/EP2003/007736 2003. 7. 16

[87] 国际公布 WO2004/012773 英 2004. 2. 12

[85] 进入国家阶段日期 2005. 1. 24

[73] 专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 P·S·拜隆 C-Y·王

[56] 参考文献

WO0146291A1 2001. 6. 28

WO9513090A1 1995. 5. 18

US4670417A 1987. 6. 2

WO0249673A2 2002. 6. 27

CN1211578A 1999. 3. 24

审查员 刘 梅

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 安佩东

权利要求书 6 页 说明书 28 页

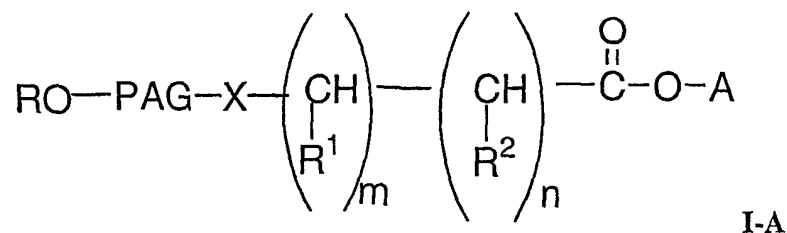
[54] 发明名称

聚亚烷基二醇酸加合物

[57] 摘要

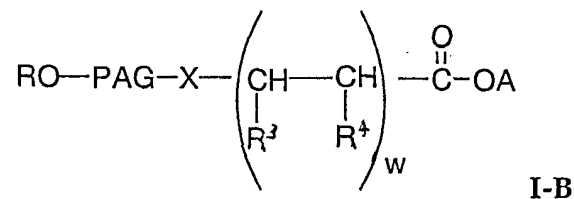
本发明涉及一类新的用于偶联生物药物例如多肽、糖、蛋白质和治疗活性小分子以得到这些药物的生物活性偶联物的活化聚亚烷基二醇酸及其活化酯试剂和制备这些偶联物的方法。

1. 下式化合物或当 A 是氢时其可水解的酯



其中 R 是 C₁₋₇ 烷基, R¹ 和 R² 独立地是氢; X 是 -O-, PAG 是 PEG, 即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基, 该残基具有 10,000-40,000 道尔顿的分子量; n 是 0; m 是 4; 并且 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团。

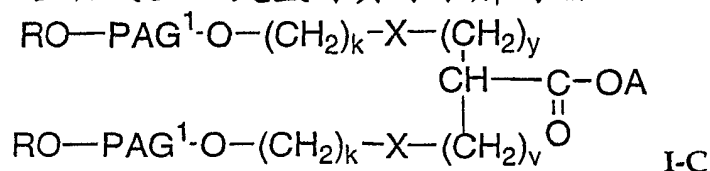
2. 下式的化合物或当 A 是氢时其可水解的酯



其中 R 是 C₁₋₇ 烷基；X 是 -O-，PAG 是 PEG，即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基，该残基具有 10,000-40,000 道尔顿的分子量；w 是 1；并且 R³ 为 C₁₋₇ 烷基且 R⁴ 为氢；并且 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团。

3. 权利要求 1 或 2 的化合物, 其中 PEG 的分子量为 20,000 至 35,000 道尔顿。

4. 下式的化合物或当 A 是氢时其可水解的酯



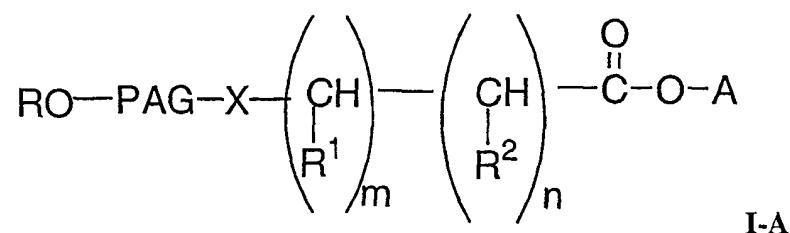
其中 R 是 C₁₋₇ 烷基; X 是 -NH-; A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团, PAG¹ 是 PEG¹, 即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基, 该残基具有约 500-25,000 道尔顿的分子量, v 是 1 且 v

是 1; k 是 2。

5. 权利要求 1、2 或 4 任一项的化合物, 其中 R 是甲基。

6. 权利要求 4 的化合物, 其中 PAG^1 是 PEG^1 , 即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基, 该残基具有 500-15,000 道尔顿的分子量。

7. 一种制备下式的活化酯的方法:



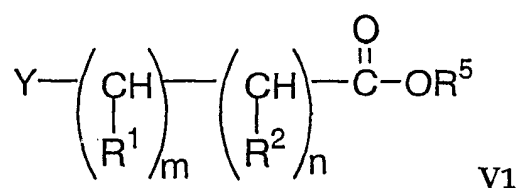
其中 R 是 C_{1-7} 烷基, R^1 和 R^2 独立地是氢; X 是 -O-, PAG 是 PEG, 即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基, 该残基具有 10,000-40,000 道尔顿的分子量; n 是 0; m 是 4; 并且 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团,

该方法包括, 将下式的化合物:



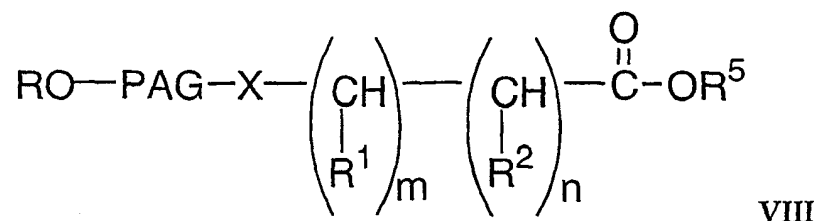
其中 R 和 PAG 定义如上, V 是 -OH 或 - NH_2 ,

与下式的化合物缩合,



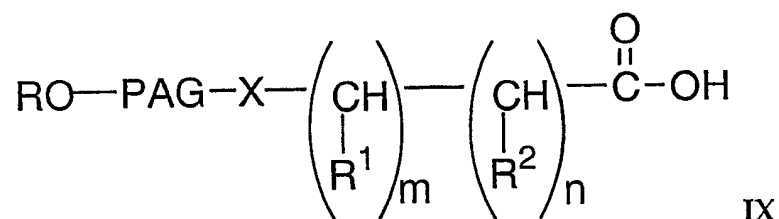
其中 R^5 形成可水解的酯保护基且 Y 是卤化物, 并且 R^1 、 R^2 、m 和 n 定义如上,

生成下式的酯,



其中 R、PAG、X、R¹、R²、R⁵、m 和 n 定义如上，

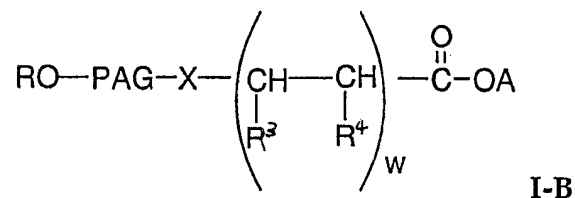
水解该酯生成下式的游离酸：



其中 R、PAG、X、R¹、R²、m 和 n 定义如上，

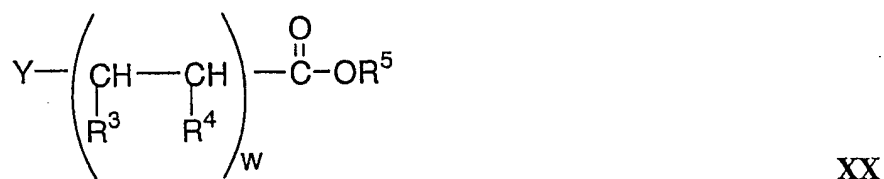
使所述游离酸与活化离去基团的卤化物在偶联剂的存在下反应生成所述的活化酯。

8. 一种制备下式的活化酯的方法：



其中 R 是 C₁₋₇ 烷基；X 是 -O，PAG 是 PEG，即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基，该残基具有 10,000-40,000 道尔顿的分子量；w 是 1；并且 R³ 为 C₁₋₇ 烷基且 R⁴ 为氢；并且 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团，

该方法包括，将下式化合物：

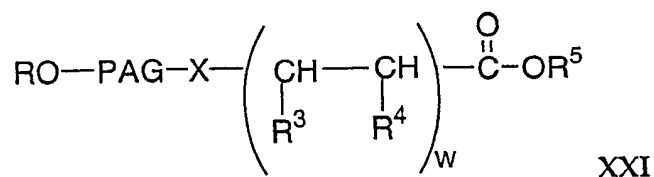


其中 w、R³、R⁴ 定义如上，Y 是卤化物且 R⁵ 形成可水解的酯保护基，与下式化合物缩合

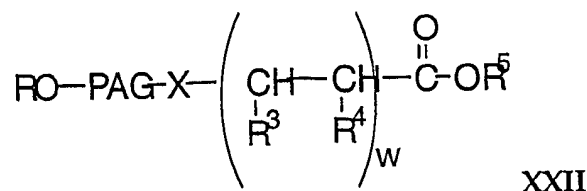


其中 R 和 PAG 定义如上，V 是 -OH 或 -NH₂，

生成下式的酯

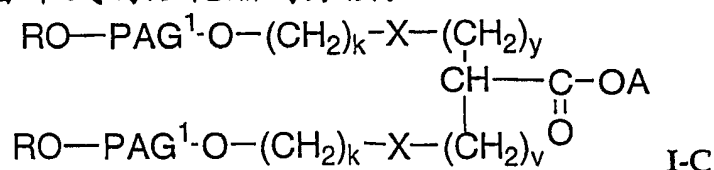


其中 w 、 R 、 PAG 、 X 、 R^3 、 R^4 和 R^5 定义如上，
水解该酯生成下式的游离酸：



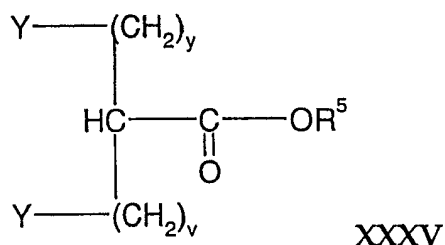
其中 w 、 R 、 PAG 、 X 、 R^3 、 R^4 和 R^5 定义如上，
使所述游离酸与活化离去基团的卤化物在偶联剂的存在下反应生成所述的活化酯。

9. 一种制备下式的活化酯的方法：

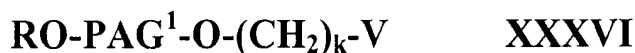


其中 R 是 C_{1-7} 烷基， X 是 $-\text{NH}-$ ， A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团， PAG^1 是 PEG^1 ，即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基，该残基的分子量为约 500-约 25,000 道尔顿， y 是 1 且 v 是 1； k 是 2，

该方法包括，将下式化合物：

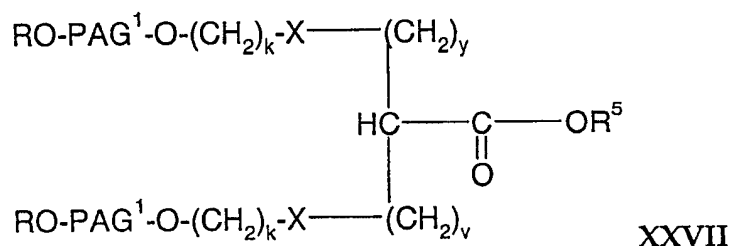


其中 y 和 v 定义如上， Y 是卤化物且 R^5 形成可水解的酯保护基，
与下式化合物缩合



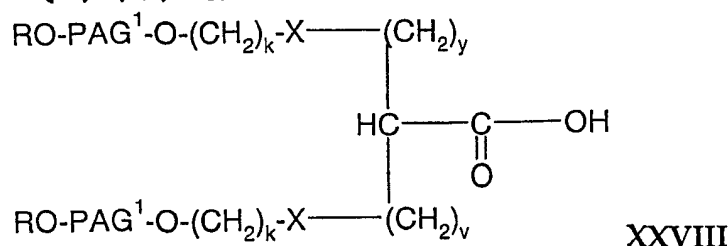
其中 R 、 PAG^1 和 k 定义如上， V 是 $-\text{OH}$ 或 $-\text{NH}_2$ ，

生成下式的酯



其中 R、PAG¹、X、R⁵、k、v 和 y 定义如上，

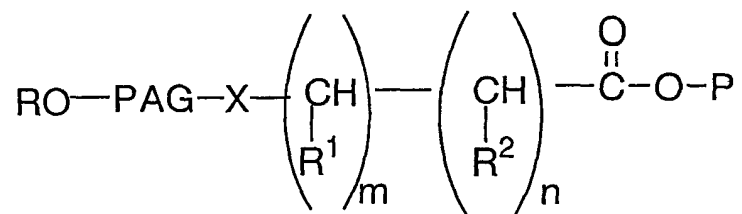
水解该酯生成下式的游离酸：



其中 R、PAG¹、X、k、v 和 y 定义如上，

使所述游离酸与活化离去基团的卤化物在偶联剂的存在下反应生成所述的活化酯。

10. 下式的偶联物

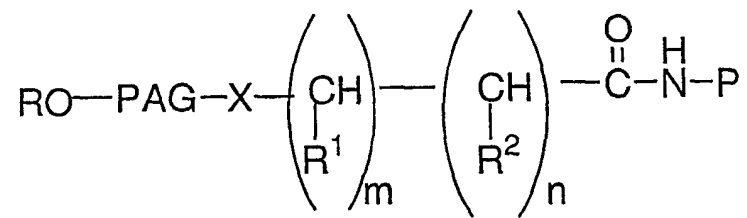


其中，P 是其中的末端羟基被脱除了的具有末端羟基的生物药物的残基，R 是 C₁₋₇ 烷基，R¹ 和 R² 独立地是氢；X 是 -O-，PAG 是 PEG，即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基，该残基具有 10,000-40,000 道尔顿的分子量；n 为 0；m 为 4。

11. 权利要求 10 所述的偶联物，其中 R 是甲基。

12. 权利要求 10 或 11 任一项所述的偶联物，其中 P 是 AZT 的残基。

13. 下式的偶联物



其中, P 是其中的末端羟基被脱除了的具有末端羟基的生物药物的残基, R 是 C₁₋₇ 烷基, R¹ 和 R² 独立地是氢; X 是 -O-, PAG 是 PEG, 即通过脱除其两个末端羟基得到的聚乙二醇的二价残基, 该残基具有 10,000-40,000 道尔顿的分子量; n 为 0; m 为 4。

14. 权利要求 13 所述的偶联物, 其中 PAG 是分子量为 10,000-15,000 道尔顿的聚乙二醇残基。

15. 权利要求 13 至 14 任一项所述的偶联物, 其中 P 是具有序列(SEQ ID NO: 1)的多肽 T-20。

聚亚烷基二醇酸加合物

本发明涉及聚亚烷基二醇酸及其与治疗活性生物药物连接来制备与这些生物药物的治疗活性聚亚烷基二醇偶联物。

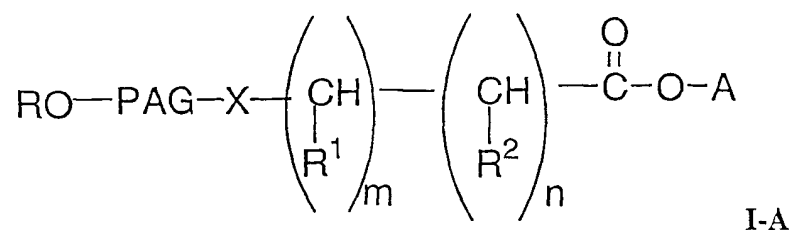
亲水性聚亚烷基二醇线性聚合物(称作 PAG)与生物药物如蛋白质和肽的化学连接是公知的且广泛应用在生物工程中。最常见的聚亚烷基二醇分子是聚乙二醇聚合物(称作 PEG)。

作为 PAG 的生物工程应用的一个实例,某些 PAG 的活性衍生物已经连接于具有有益效果的生物药物例如蛋白质和酶。由于 PAG 可溶于有机溶剂,和生物药物如酶或蛋白质相连的 PAG 可以生成在有机溶剂中可溶且具有活性的偶联物。与未改性蛋白质相比,PAG 与蛋白质的连接可以降低 PAG-蛋白质偶联物的免疫原性和肾脏清除率。此外 PAG 与生物药物如蛋白质的连接还可以大大提高这些 PAG 偶联物在血液循环中的生存期。

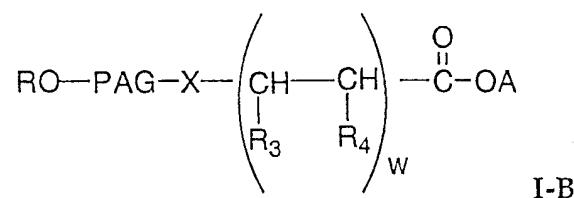
在制备与生物药物如蛋白质的 PAG 复合物中,特定生物药物的药代动力学将支配着药物的功效和效力持续时间。从生物药物、特别是蛋白质和多肽的免疫原性、水不溶性和体内半衰期短的角度看,降低这些生物药物的清除速率变得非常重要,由此可以达到延长的作用。这可以通过避免或抑制肾小球过滤实现,而肾小球过滤受蛋白质电荷及其分子大小两者的影响(Brenner 等,(1978) Am. J. Physiol, 234, F455)。通过增加分子体积和掩蔽潜在的表位,治疗性生物药物如多肽和蛋白质利用聚合物的改性已经被证实可有效降低生物药物尤其是蛋白质的清除速率和抗原性。降低的蛋白水解、增高的水溶性、降低的肾清除率和对受体介导的清除的位阻是多种作用机理,通过这些机理,PAG 聚合物与生物药物如多肽和蛋白质的骨架的连接有利于提高药物的药代动力学性质。所以 Davis 等的美国专利 4,129,337 公开了偶联 PEG 与蛋白质如酶和胰岛素以便制备低免疫原性产物同时保持这种生物药物的大部分的生物活性。

已经开发了大量用于修饰生物药物如蛋白质的活性 PAG, 特别是 PEG 试剂(参见例如 Zalipsky 等, 和 Harris 等: 聚(乙二醇)化学: 生物工程和生物医学应用; (J. M. Harris 编辑) Plenum Press: 纽约, 1992; 21 和 22 章), 其中的大部分试剂需要在 PEG 和生物药物之间形成连接基团。一些此类试剂在含水介质中不同程度的不稳定, 会发生偶联反应。此外, 偶联过程常常导致体外生物活性的丧失, 这是由于多种因素造成的, 其中最主要的因素是与蛋白活性位点的空间相互作用。因此新试剂的理想性质应该是在含水介质中不易降解并且可以用来完成蛋白质的位点特异性修饰。

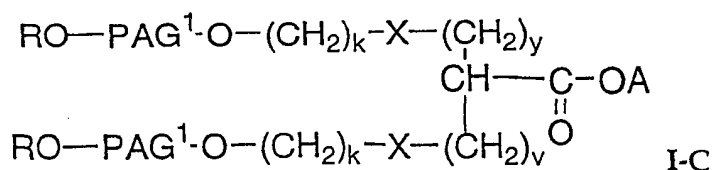
按照本发明, 我们发现了一类新的用于与生物药物例如多肽、糖、蛋白质和治疗活性小分子偶联的活化聚亚烷基二醇酸及其活性酯试剂。这些试剂是那些具有任一下式的化合物:



其中 R、R₁ 和 R₂ 独立地是氢或低级烷基; X 是 -O- 或 -NH-; PAG 是通过脱除其两个末端羟基得到的聚亚烷基二醇的二价残基, 该残基具有 1,000-50,000 道尔顿的分子量; n 是 0-1 的整数; m 是 4-8 的整数; 并且 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团; 或者当 A 是氢时是其可水解的酯;

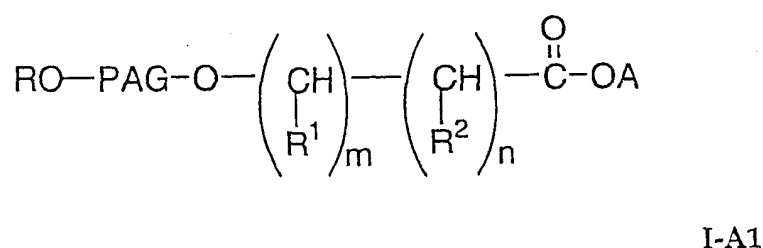


其中 R、PAG、X 和 A 如上所述; w 是 1-3 的整数; 并且 R₃ 和 R₄ 之一为低级烷基且另一个为氢或低级烷基;
和



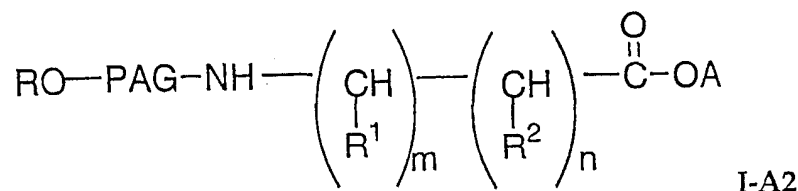
其中 R、A 和 X 如上所述， PAG^1 是通过脱除其两个末端羟基得到的聚亚烷基二醇的二价残基，该基团具有约 500-25,000 道尔顿的分子量，y 是 0-3 的整数且 v 是 1-3 的整数；k 是 1-2 的整数。

优选的上面定义的式 I-A 的化合物是那些式 I-A1 的化合物



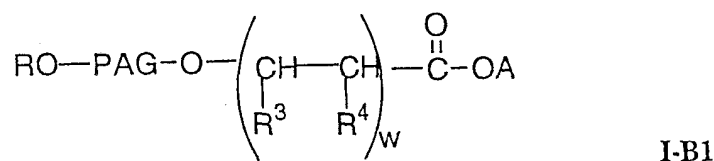
其中 A、R、PAG、 R^1 、 R^2 、m 和 n 定义如上。

上述式 I-A 的其他优选化合物是那些下式 I-A2 的化合物



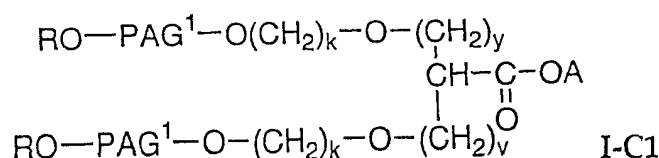
其中 A、R、PAG、 R^1 、 R^2 、m 和 n 定义如上。

优选的上述式 I-B 的化合物是那些式 I-B1 的化合物



其中 A、R、PAG、R³、R⁴和 w 定义如上。

优选的上述式 I-C 的化合物是那些是 I-C1 的化合物



其中 R 、 PAG^1 、 A 、 v 、 y 和 k 定义如上。

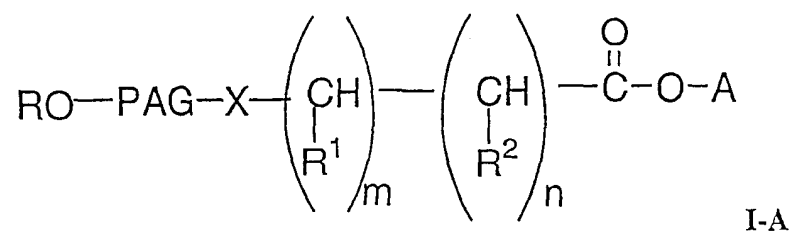
优选地, A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团或者其可水解酯, 更优选 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团。

在上述化合物中, A 优选是氢。还优选其中 A 是活化离去基团的定义如上的化合物。在上述定义的化合物中, 特别是式 I-C1 的化合物中, 当 A 是优选的活泼离去基团时, 优选 A 是 N-羟基琥珀酰亚胺基。

在另一优选实施方式中, R 是甲基。优选定义如上的化合物, 其中 PAG 为 PEG, 即通过脱除其两个末端羟基得到的二价聚乙二醇基团。优选地, PEG 具有 10,000-40,000 的分子量, 更优选 20,000-35,000。在上述其中 PAG¹ 是 PEG¹ 的式 I-C 化合物中, 优选 PEG¹ 具有 500-15,000 的分子量。

在一更优选的实施方式中, n 是 0 且 m 是 4。优选 w 是 1。

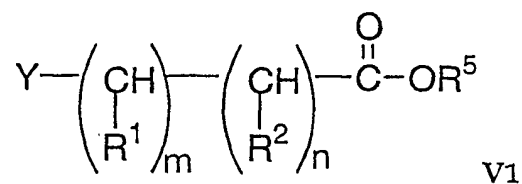
在另一优选的实施方式中, 本发明涉及一种制备下式的活化酯的方法:



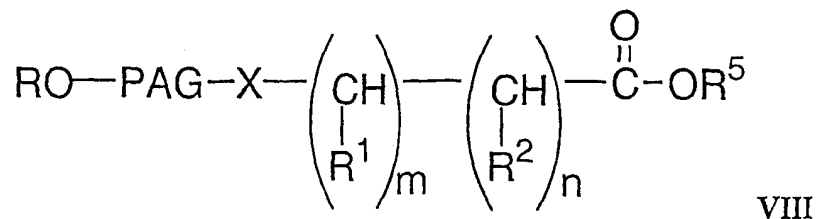
其中 R、R₁ 和 R₂ 独立地是氢或低级烷基; X 是 -O- 或 -NH-; PAG 是通过脱除其两个末端羟基得到的聚亚烷基二醇的二价残基, 该残基的分子量为 1,000-50,000 道尔顿; n 是 0-1 的整数; m 是 4-8 的整数; 并且 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团, 该方法包括, 将下式化合物:



其中 R 和 PAG 定义如上, 并且 V 是 -OH 或 -NH₂, 与下式的化合物缩合

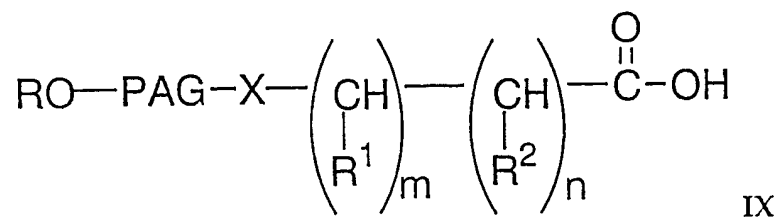


其中 R^5 形成可水解的酯保护基并且 Y 是卤化物, 且 R^1 、 R^2 和 n 定义如上, 生成下式的酯



其中 R、PAG、X、 R^1 、 R^2 、 R^5 、m 和 n 定义如上。

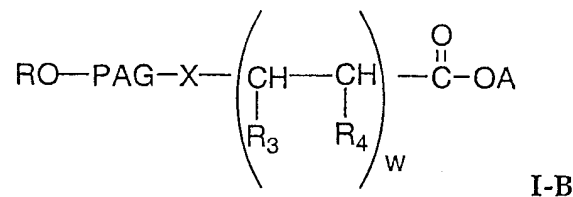
水解该酯生成下式的游离酸:



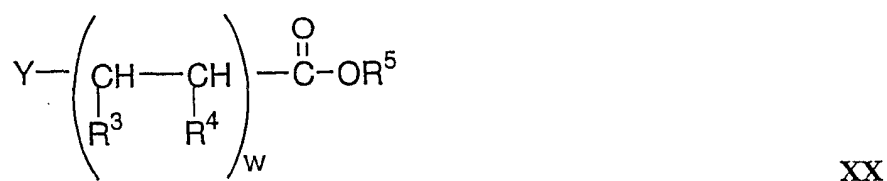
其中 R、PAG、X、 R^1 、 R^2 、m 和 n 定义如上,

使所述游离酸与活化离去基团的卤化物在偶联剂的存在下反应生成所述的活化酯。

在另一优选实施方式中, 本发明涉及一种制备下式的活化酯的方法:



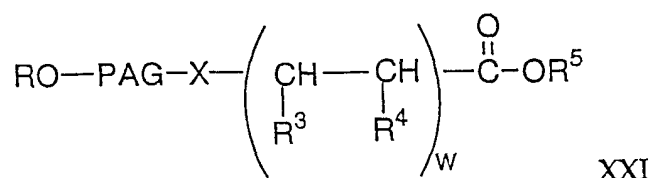
其中 R 是氢或低级烷基; X 是 -O- 或 -NH-; PAG 是通过脱除其两个末端羟基得到的聚亚烷基二醇的二价残基, 该残基的分子量为 1,000-50,000 道尔顿; w 是 1-3 的整数; 并且 R_3 和 R_4 之一为低级烷基且另一个为氢或低级烷基; 且 A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团
该方法包括, 将下式化合物:



其中 w 、 R^3 、 R^4 定义如上， Y 是卤化物且 R^5 形成可水解的酯保护基，与下式化合物缩合

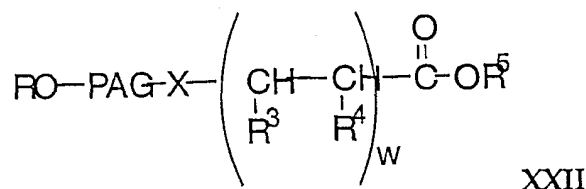


其中 R 和 PAG 定义如上， V 是 $-\text{OH}$ 或 $-\text{NH}_2$ ，生成下式的酯



其中 w 、 R 、 PAG 、 X 、 R^3 、 R^4 和 R^5 定义如上。

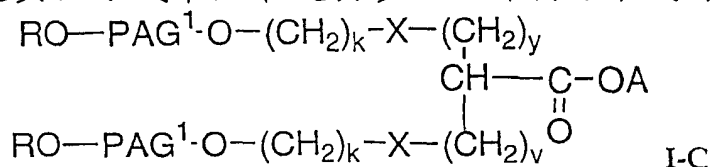
水解该酯生成下式的游离酸：



其中 w 、 R 、 PAG 、 X 、 R^3 、 R^4 和 R^5 定义如上，

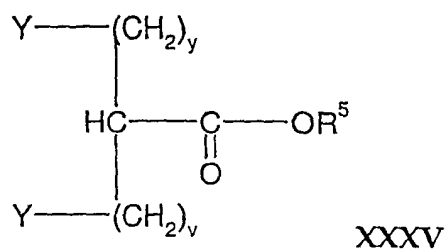
使所述游离酸与活化离去基团的卤化物在偶联剂的存在下反应生成所述的活化酯。

在另一优选实施方式中，本发明涉及一种制备下式的活化酯的方法：

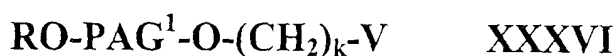


其中 R 是氢或低级烷基， X 是 $-\text{O}-$ 或 $-\text{NH}-$ ， A 是氢或与其所连的氧原子合在一起形成酯的活化离去基团， PAG^1 是通过脱除其两个末端羟基得到的聚亚烷基二醇的二价残基，该残基的分子量为约 500-约 25,000 道尔顿， y 是 0-3 的整数且 v 是 1-3 的整数；并且 k 是 1-2 的整数

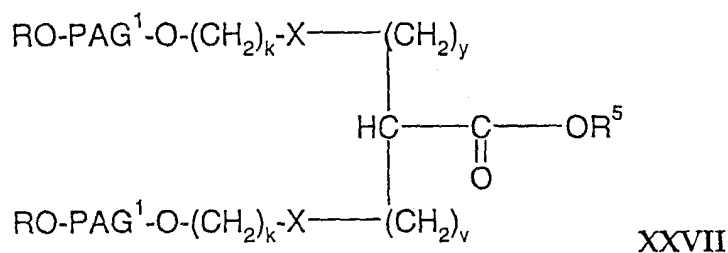
该方法包括, 将下式化合物:



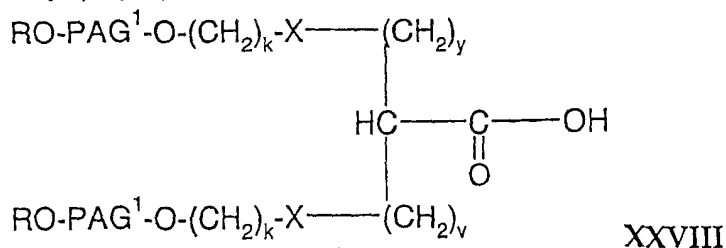
其中 y 和 v 定义如上, Y 是卤化物且 R^5 形成可水解的酯保护基, 与下式化合物缩合



其中 R 、 PAG^1 和 k 定义如上, V 是 $-\text{OH}$ 或 $-\text{NH}_2$, 生成下式的酯



其中 R 、 PAG^1 、 X 、 R^5 、 k 、 v 和 y 定义如上, 水解该酯生成下式的游离酸:

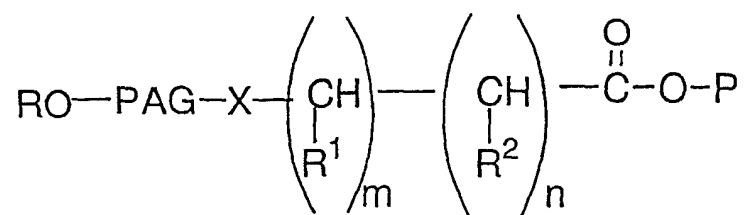


其中 R 、 PAG^1 、 X 、 k 、 v 和 y 定义如上,

使所述游离酸与活化离去基团的卤化物在偶联剂的存在下反应生成所述的活化酯。

在上述方法中, 所述的离去基团优选是 N -羟基琥珀酰亚胺基。

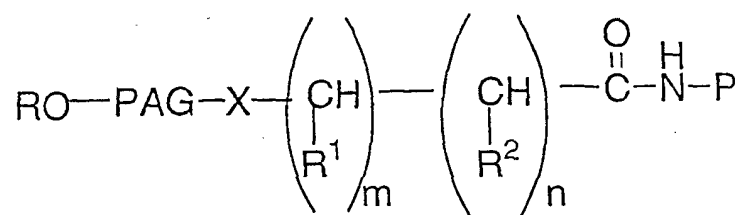
本发明的另一优选实施方式涉及一种下式的偶联物



其中, P 是其中的末端羟基被脱除了的具有末端羟基的生物药物的残基, R、R₁ 和 R₂ 独立地是氢或低级烷基; X 是 -O- 或 -NH-; PAG 是通过脱除其两个末端羟基得到的聚亚烷基二醇的二价残基, 该残基具有 1,000-50,000 道尔顿的分子量; n 为 0-1 的整数; m 为 4-8 的整数。

在上述偶联物中, P 优选是糖苷或 AzT 的残基。优选地, X 是 -O-。优选地 PAG 是分子量为 10,000-15,000 的聚乙二醇残基。优选地, R 是甲基。

本发明的另一优选实施方式涉及下式的偶联物



其中, P 是其中的末端羟基被脱除了的具有末端羟基的生物药物的残基, R、R₁ 和 R₂ 独立地是氢或低级烷基; X 是 -O- 或 -NH-; PAG 是通过脱除其两个末端羟基得到的聚亚烷基二醇的二价残基, 该残基具有 1,000-50,000 道尔顿的分子量; n 为 0-1 的整数; m 为 4-8 的整数。

在上述偶联物中, P 优选是蛋白质或多肽的残基, 更优选其中 P 是具有 SEQ ID NO: 1 中序列的多肽 T-20。优选 X 是 -O-。优选 PAG 是分子量为 10,000-15,000 的聚乙二醇残基。

这些化合物是与生物药物如多肽、糖、蛋白质和糖苷形成偶联物的有效试剂。当它们形成与生物药物如蛋白质、肽和糖苷的偶联物时, 式 I-A、I-B 和 I-C 的化合物可提高它们的药代动力学和药效学性质。这些临床有用的性质包括体内循环半衰期更长、降低清除率并提高效价、改变生物分布导致功效潜在增强、降低免疫原性、减小毒性、物理和热稳定性更好、对

蛋白水解降解的防护，等等。式 I-A、I-B 和 I-C 的化合物的稳定性使其易于偶联于生物药物从而降低变性的危险性。

式 I-A、I-B 和 I-C 的试剂可以与含氨基或羟基的生物药物的氨基或羟基偶联生成偶联物，该偶联物基本保持其所衍生的生物药物的生物活性。通常出于偶联目的，优选所述的含氨基或羟基生物药物包含末端氨基或羟基。本发明的试剂可以通过这样的末端氨基或羟基偶联得到本发明的偶联物。本发明的试剂在含水介质中不容易降解，因此它们可容易地与生物药物在含水介质中反应形成可用于治疗目的进行给药的偶联物。

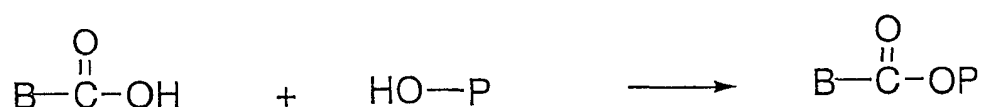
术语聚亚烷基二醇代表聚(低级亚烷基)二醇基团，其中该亚烷基是含有 2-7 个碳原子的直链或支链基团。术语“低级亚烷基”代表含有 2-7 个碳原子的直链或支链二价亚烷基基团，例如聚亚乙基、聚亚正丙基、聚亚异丙基、聚亚正丁基和聚亚异丁基以及由混和亚烷基二醇形成的聚亚烷基二醇，例如含有聚亚乙基和聚亚丙基基团的混合物的聚合物和含有聚亚异丙基、聚亚乙基和聚亚异丁基基团的混合物的聚合物。根据亚烷基的直链中所含的碳原子数，支链亚烷基二醇基团提供给聚合物链中含 2 至 4 个碳原子的低级烷基，因此，构成聚亚烷基二醇取代基的任何亚烷基部分的碳原子总数为 2 至 7 个。术语“低级烷基”包括含有 1 至 7 个碳原子、优选 1 至 4 个碳原子的低级烷基，例如甲基、乙基、丙基、异丙基等，特别优选甲基。

按照本发明的优选实施方式，式 I-A、I-B 和 I-C 的化合物中的 PAG 是通过脱除两个末端羟基形成的聚乙二醇基团。按照本发明，式 I-A 和 I-B 的化合物中 PAG 基团具有约 10,000-约 50,000 的分子量，最优选约 20,000-约 40,000，并且尤其优选约 25,000-约 35,000。在式 I-C 的化合物中，一般优选两个 PAG¹基团的总的分子量为约 10,000-约 50,000 且优选约 20,000-约 40,000。首选为约 25,000-约 35,000。

式 I-A、I-B 和 I-C 的试剂可以偶联于任何含有游离羟基和氨基的常规生物药物。缩合可以用游离酸或者利用活化酯来完成。

按照本发明，式 I-A、I-B 和 I-C 的化合物可以与生物药物的游离羟基或游离氨基反应生成酯或酰胺偶联物，该生物药物可以是蛋白质、肽或小的有机部分。

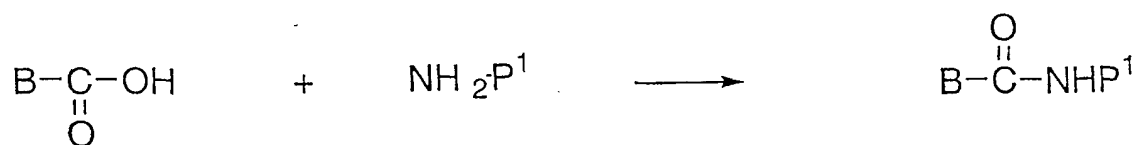
按照本发明，所述的酯或酰胺偶联物可以由本发明的试剂经过以下反应路线制备。在酯偶联物的形成中，所述的试剂与含末端羟基的生物药物反应，如下所示



其中 P 是其中的末端羟基被脱除的具有末端羟基的生物药物的残基。

在该反应路线中，B 是不具有末端反应性酸或活化酸离去基团的化合物 I-A、I-B 和 I-C 的组成部分。在该反应进行时，任何通过反应性酸基与醇反应形成酯的常规方法均可以用来制备酯偶联物。其中优选的方法是在偶联剂的存在下例如二环己基碳二亚胺的存在下利用偶联催化剂使酸和醇偶联。可以使用任何常规偶联催化剂例如 1-羟基苯并三唑和(4-二甲基氨基)吡啶或其混合物。通常该反应在惰性有机溶剂介质中进行。该反应可以采用该酸的游离或活化酯衍生物来完成。如果使用活化酸衍生物，则不需要使用偶联催化剂和/或偶联剂。在进行该反应时温度和压力并不关键并且该反应可以在室温下进行。然而，如果需要，可以采用高温或低温。按照本发明，P 可以是任何具有末端羟基的生物药物的残基。为了形成上述酯，具有末端羟基的优选生物药物是核苷例如 AZT。此外，P 可以是任何具有末端羟基的小分子生物药物。

在形成酰胺时，使用下列反应中的化合物：



其中 P¹ 是具有末端氨基但该末端氨基已经被脱除的生物药物的残基。

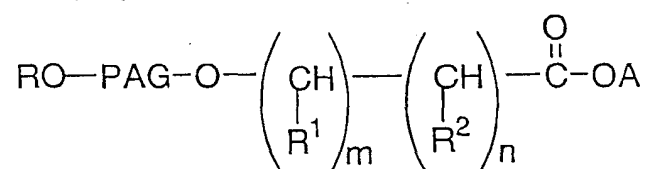
在上述反应中，路线 B 如上所述。根据该反应，P¹ 可以是任何具有末端氨基的生物药物例如蛋白质或肽或者具有末端氨基的小分子生物药物的残基。其中优选的蛋白质和肽包括干扰素-α、干扰素-β、共有干扰素、GCSF、

GM-CSF、白介素类、集落刺激因子以及免疫球蛋白例如 IgG、IgE、IgM、IgA 和 IgD 及其片段。另一优选的氨基生物药物是那些美国专利 5,464,933 中给出的肽,尤其是 T-20 肽,其具有如下结构: Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe (SEQ ID: 1)。

生成酰胺的反应可以利用任何偶联酸或活化酸衍生物“OA”与酰胺形成肽键的常规方法。任何通过酸和胺形成酰胺的反应生成肽键的常规方法均可以用于形成偶联物。

按照本发明, OA 可以是任何常规的酸活化离去基团。其中优选的酸活化离去基团是卤素例如氯和溴, N-琥珀酰亚胺基氧基, 磺基-N-琥珀酰亚胺基氧基, 1-苯并三唑基氧基, 1-咪唑基, 对硝基苯氧基, 2,3,4-三氯苯氧基, 五氯苯氧基, 五氟苯氧基, N-邻苯二甲酰亚胺基氧基, N-四氢邻苯二甲酰亚胺, N-戊二酰胺, 1-羟基哌啶, 5-氯-8-羟基-喹啉, N-降冰片烯-2,3-二碳二亚胺和羟基-7-氮杂苯并三唑。

其中 X 为 0 的式 I-A 的化合物是:

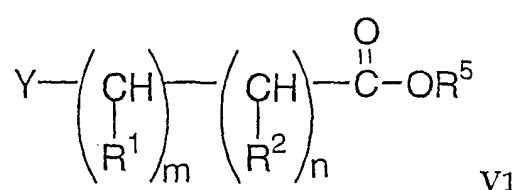


I-A1

其中 A、R、PAG、R¹、R²、m 和 n 如上所述, 该化合物通过将下式的 PAG 羟基化合物

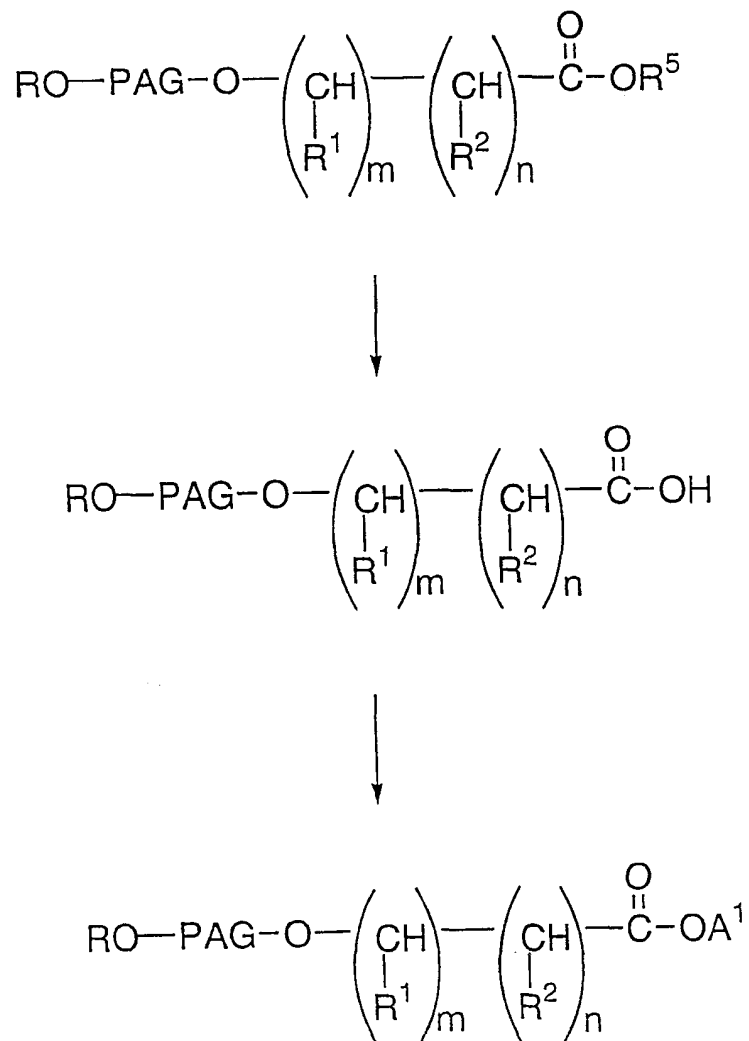


其中 R 和 PAG 如上定义 与下式的化合物



其中 R^5 形成可水解的酯保护基且 Y 是卤化物, 并且 R^1 、 R^2 、 m 和 n 如上所述,

经下列反应路线反应进行制备



其中 R 、 PAG 、 m 和 n 如上所定义且 A^1 是当与其所连的氧原子合在一起时形成酯的活化离去基团。

式 V 的化合物当与式 VI 的化合物缩合时可生成式 VIII 的化合物。在该反应中, 式 V 的化合物与式 VI 的化合物通过在有机溶剂中在碱金属氢化物例如氢化钠的存在下回流进行反应。任何醇和卤化物缩合中采用的常规方法均可以用于本反应。通常优选芳烃溶剂例如苯和甲苯作为惰性有机溶剂。然而, 任何常规惰性有机溶剂均可以用于实施该反应。在式 VI 的化合物中, R^3 可以是任何常规的酸可水解酯保护基。通常, 那些可水解的酯保护基包括低级烷基酯保护基。式 VIII 的化合物通过常规方式水解为

式 IX 的化合物, 例如用碱例如碱金属氢氧化物在含水介质中碱性水解。式 IX 的酸此后例如通过与 N-羧基琥珀酰亚胺反应经活化离去基团如 N-羧基琥珀酰亚胺基转化为其活化形式, 式 X 的化合物。然而, 任何常规活化离去基团例如在此提及的那些离去基团均可以用在式 X 化合物的形成中。使羧酸转化为含活化离去基团例如 N-羧基琥珀酰亚胺基的活化酯的任何常规方法均可以用来制备式 X 的化合物。

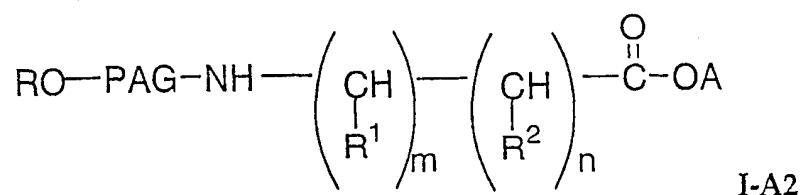
在通过将式 V 与式 VI 的化合物按照上述反应路线缩合来制备式 I-A-1 化合物(包括式 IX 和 X 的化合物)时, 该反应路线可以以如下一般方式进一步说明:

将 5g 式 V 的 PEG 化合物(分子量 1000-4000)在 50-100mL 的甲苯中通过回流 1-3 小时共沸干燥, 随后除去 20-30mL 的甲苯。将所得混合物溶于 20-30mL 无水四氢呋喃, 并在氩气流下滴加至在圆底烧瓶中的氢化钠(5-10 倍摩尔过量)和无水四氢呋喃(20~30mL)中。将所得混合物回流过夜。用下列的式 VI 的卤代酸酯来制备式 VIII 的化合物: 5-溴戊酸甲酯或(5-碘代戊酸乙酯; 或, 6-溴己酸乙酯, ω -氯代戊酸乙酯; 或 6-溴代己酸甲酯; 或 7-溴代庚酸甲酯; 或 7-溴代庚酸乙酯; 或 8-溴代辛酸甲酯; 或 8-溴代辛酸乙酯; 或 10-溴代癸酸乙酯; 或 10-溴代癸酸甲酯; 或 ω -溴代十一烷酸乙酯; 或 11-溴代十一烷酸甲酯; 或溴代肉豆蔻酸甲酯; 或 15-溴代十五烷酸乙酯; 或 16-溴代-十六烷酸甲酯; 或 17-溴代十七烷酸甲酯; 或 3-氯代丁酸甲酯, 3-溴代丁酸甲酯; 或 3-溴代丁酸乙酯, β -溴代戊酸乙酯; 或 β -溴代己酸乙酯) (5-10 摩尔过量), 将其经注射器加入到反应中且使该反应回流过夜。此后通过旋转蒸发浓缩该反应溶液。通过加入 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀出含式 VIII 化合物的残余物。过滤沉淀的产物(式 VIII 的化合物)并真空干燥。

将式 VIII 的 PEG 酸酯(4g)溶于 50-100mL 的 1N 氢氧化钠中并将该溶液在室温下搅拌过夜。加入 1 至 6N 盐酸调整混合物的 pH 至 2.5-3.0, 并且用二氯甲烷萃取该混合物。有机层用硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 并且在乙醚中沉淀。通过过滤收集式 IX 的 PEG 酸并在真空下干燥。

将式 IX 的 PEG 酸(2g)溶于无水二氯甲烷(10-20mL), 此后加入 N-羧基琥珀酰亚胺(1.05-2.0 倍摩尔过量)和二环己基碳二亚胺(1.05-2.0 倍摩尔过量)。氩气和室温下将该混合物搅拌过夜。过滤该反应混合物, 浓缩, 用 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。真空干燥该产物得到式 Ia1 的活化酯(式 X 的化合物)。

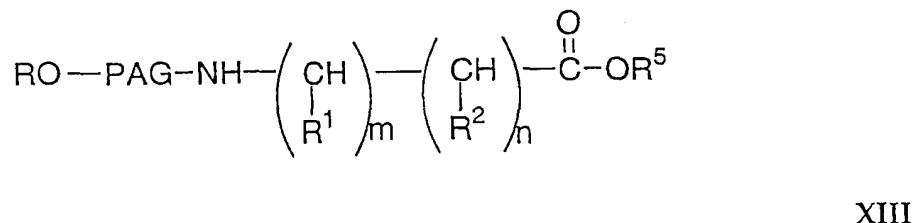
其中 X 为 NH 的式 I-A 的化合物具有下式:



其中 A、R、PAG、R¹、R²、m 和 n 如上所述,
该化合物由下式的化合物制备:

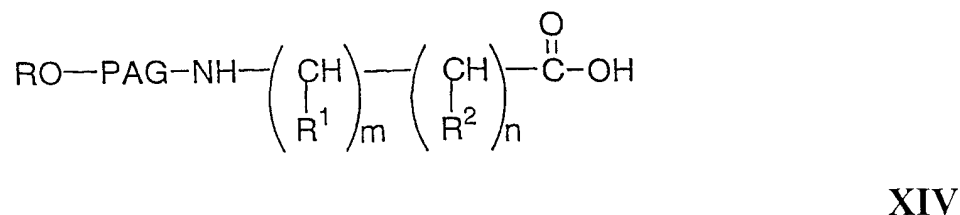


首先通过式 XII 化合物与式 VI 化合物的反应生成下式的化合物:



其中 R、R¹、R²、R⁵、PAG、m 和 n 如上所述。

制备式 XIII 化合物的反应通过式 XII 的胺与式 VI 化合物的卤化物缩合来完成。任何用于缩合胺和卤化物的常规方法均可以用来进行该反应。式 XIII 的化合物经过下式的中间体转化为其中 A 为离去基团的式 I-A2 的化合物



其中 R、PAG、R¹、R²、m 和 n 如上所述。

形成式 XIV 化合物的转化反应通过本文所述的常规碱性水解来实现。按照与将式 IX 化合物转化为式 X 化合物相同的方式，将式 XIV 化合物转化为式 1A2 的化合物，其中 A 是当与其所连的氧原子合在一起时形成酯的活化离去基团。

通常，制备其中 A 是当与其所连的氧原子合在一起时形成酯的活化离去基团的式 I-A2 化合物的方法是首先将式 XII 的化合物与式 VI 的化合物反应生成式 I-A2 的化合物，该方法可以通过以下通用反应流程进一步说明：

第一步

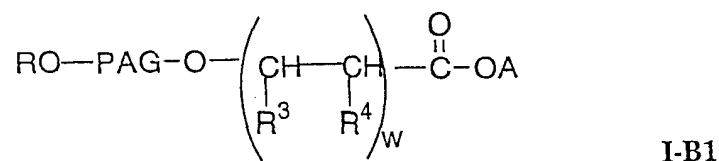
将 5g 式 XII 的 PEG 胺(分子量为 1000-40000)溶于 25-50mL 的绝对乙醇中。随后，将式 VI 的化合物加入到 PEG 溶液内，所述式 VI 的化合物可以为 5-溴代戊酸甲酯或(5-碘代戊酸乙酯；或，6-溴代己酸乙酯， ω -氯代戊酸乙酯；或 6-溴代己酸甲酯；或 7-溴代庚酸甲酯；或 7-溴代庚酸乙酯；或 8-溴代辛酸甲酯；或 8-溴代辛酸乙酯；或 10-溴代癸酸乙酯；或 10-溴代癸酸甲酯；或 ω -溴代十一烷酸乙酯；或 11-溴代十一烷酸甲酯；或溴代肉豆蔻酸甲酯；或 15-溴代十五烷酸乙酯；或 16-溴代-十六烷酸甲酯；或 17-溴代十七烷酸甲酯；或 3-氯代丁酸甲酯，3-溴代丁酸甲酯；或 3-溴代丁酸乙酯， β -溴代戊酸乙酯；或 β -溴代己酸乙酯)(5-10 倍摩尔过量)。所得混合物在室温下搅拌过夜。此后通过旋转蒸发浓缩该反应溶液。通过加入 2-丙醇和乙醚(1: 1)的化合物沉淀残余物。过滤沉淀的产物并真空干燥得到式 XIII 的化合物。

第二步

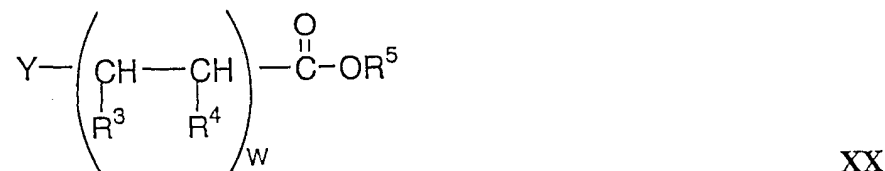
将式 XIII 的 PEG 酸酯(4g)溶于 50-100mL 的 1N 氢氧化钠中并将该溶液在室温下搅拌过夜。加入 1 至 6N 盐酸调整混合物的 pH 至 2.5-3.0，并且用二氯甲烷萃取该混合物。有机层用硫酸钠干燥，过滤，浓缩，并且在乙醚中沉淀。通过过滤收集式 XIV 的 PEG 酸并在真空下干燥。

将式 XIV 的 PEG 酸(2g)溶于无水二氯甲烷(10-20mL), 此后加入 N-羟基琥珀酰亚胺(1.05-2.0 倍摩尔过量)和二环己基碳二亚胺(1.05-2.0 倍摩尔过量)。氩气和室温下将该混合物搅拌过夜。过滤该反应混合物, 浓缩, 用 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。真空干燥该产物得到式 I-A2 的化合物, 其中 A 是当与其所连的氧原子合在一起时形成酯的活化离去基团。

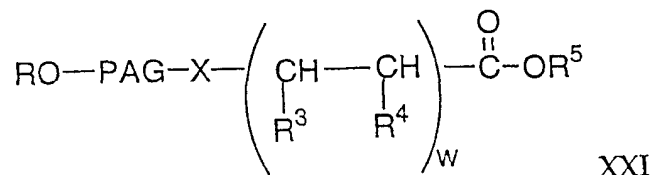
其中 X 是 O 的式 I-B 化合物具有下式 I-B1



其中 A、R、PAG、 R^3 、 R^4 、w 和 n 如上所述,
该化合物通过将式 V 的化合物与下式的化合物反应来制备

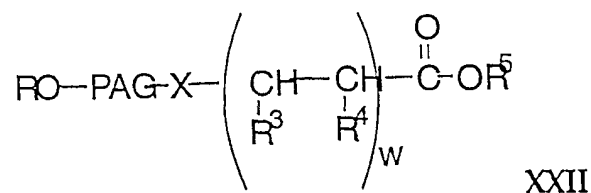


其中 w、Y、 R^3 、 R^4 和 R^5 如上所述,
反应生成下式的化合物:



其中 w、R、PAG、 R_3 、 R_4 和 R_5 如上所述。

式 XX 化合物与式 V 化合物的生成式 XXI 化合物的反应采用与本文所述的式 V 和 VI 化合物反应生成式 VII 化合物的相同的方式进行。随后将式 XXI 化合物在本文所述的条件下进行碱性水解后生成下式的化合物

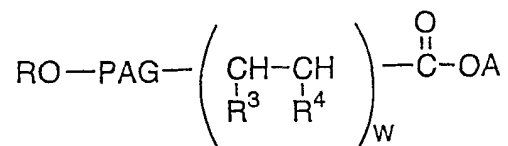


其中 R、PAG、 R^3 和 R^4 如上所述。

然后将式 XXII 的化合物转化为其中 A 表示当与其所连的氧原子合在一起时形成酯的活化离去基团的式 I-B1 化合物。该转化反应按照与本文中所述由式 IX 化合物形成式 X 化合物的相同方式进行。

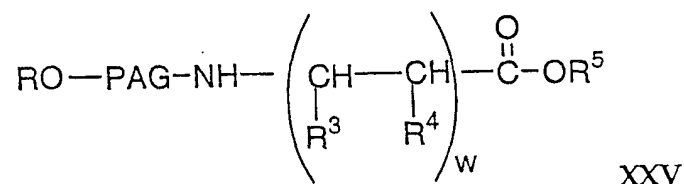
其中 X 为 NH 的式 I-B 化合物具有下式：

I-B2



其中 A、R、PAG、R³、R⁴ 和 w 如上所述，

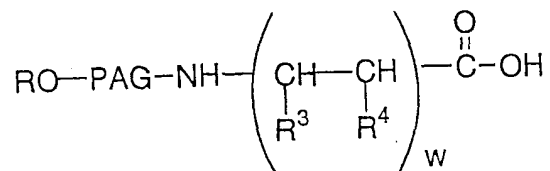
该化合物通过将式 XII 化合物与式 XX 化合物反应来制备。该反应制得下式的化合物：



其中 R、PAG、R₃、R₄ 和 R₅ 如上所述。

式 XX 化合物与式 XII 化合物的生成式 XXV 化合物的反应采用与本文中关于式 XII 化合物与式 VI 化合物反应制备式 XIII 化合物的相同的方式进行。随后将式 XXV 化合物在本文所述的条件下进行碱性水解生成下式的化合物

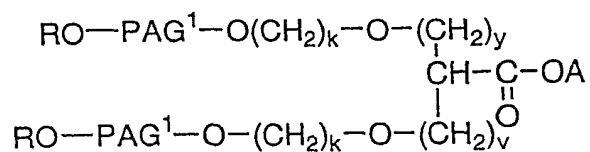
XXVI



其中 R、PAG、R³、R⁴ 和 w 如上所述。

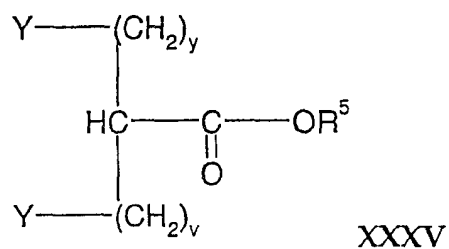
通过式 XX 化合物和式 III 化合物的反应形成式 I-B2 化合物采用与本文中所述的关于式 I-A2 化合物的相同的方式进行，但除了用式 XX 的化合物代替式 VI 的化合物之外。

其中 X 为 O 的式 I-C 的化合物为下式的化合物



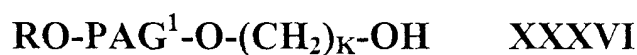
其中 R、PAG¹、A、v、y 和 k 定义如上，

该化合物通过将下式的化合物



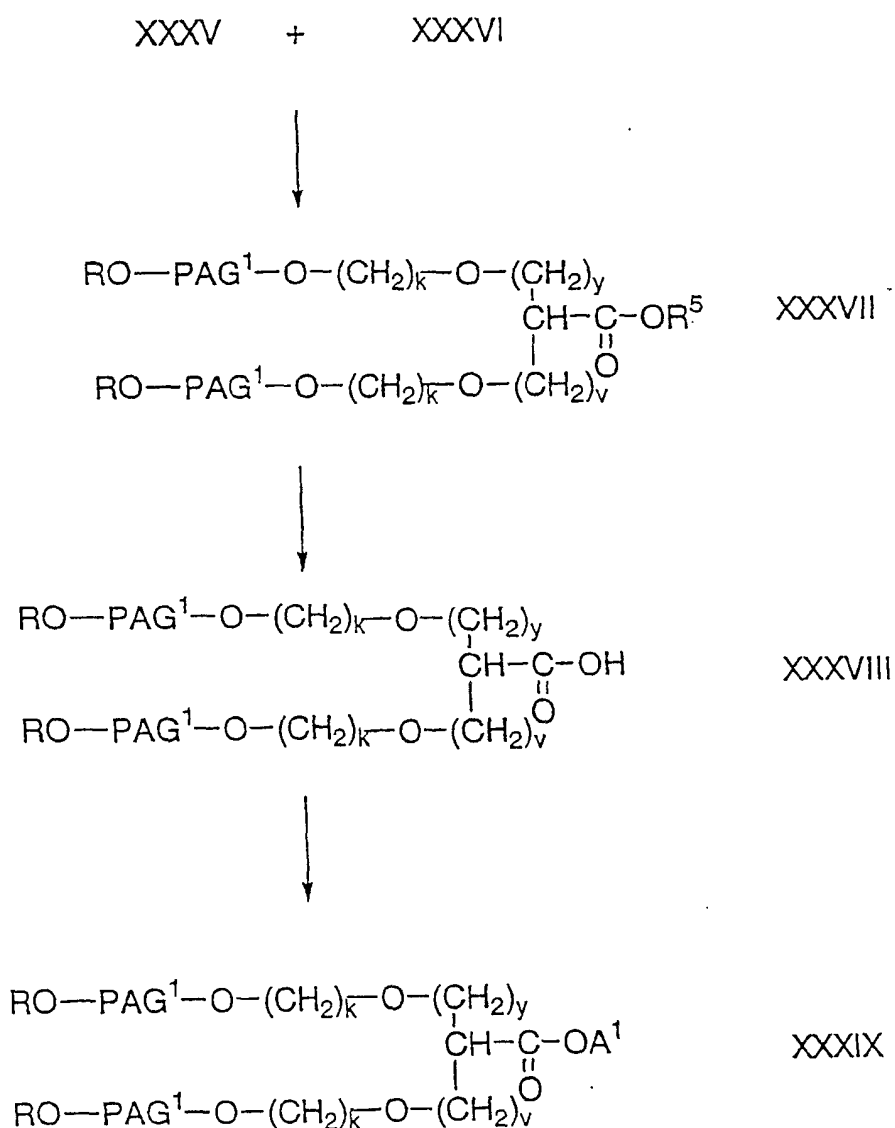
其中 Y、R⁵、y 和 v 定义如上

与下式的化合物反应来制备：



其中 R、PAG 和 k 如上所述。

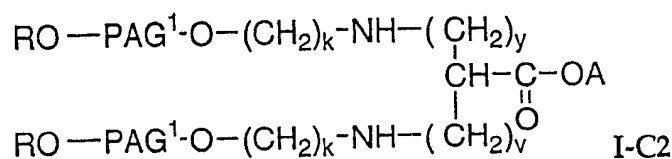
式 I-C1 的化合物的形成是经下列反应路线进行的：



其中 A1、R、PAG¹、n 和 v 如上所述。

在化合物式 I-C1 的形成中, 将 2 摩尔的式 XXXVI 化合物与 1 摩尔的式 XXXV 化合物反应。该反应在本文中关于式 V 和式 VI 化合物的反应所描述的相同条件下进行。以该方式制得式 XXXVII 的化合物。式 XXXVII 的化合物以与本文中关于将式 VIII 化合物水解为式 IX 化合物所描述的相同方式水解得到式 XXXVIII 的化合物。在最后的步骤中, 将式 XXXVIII 的化合物以与本文中关于形成式 IX 化合物所描述的相同方式反应, 使羧基转化为活化离去基团。通过这样的方式使式 XXXVIII 的化合物转化为其中 A 表示当与其所连的氧原子合在一起时形成酯的活化离去基团的式 I-C1 的化合物。

其中 X 为 NH 的式 I-C 化合物, 即下式的化合物

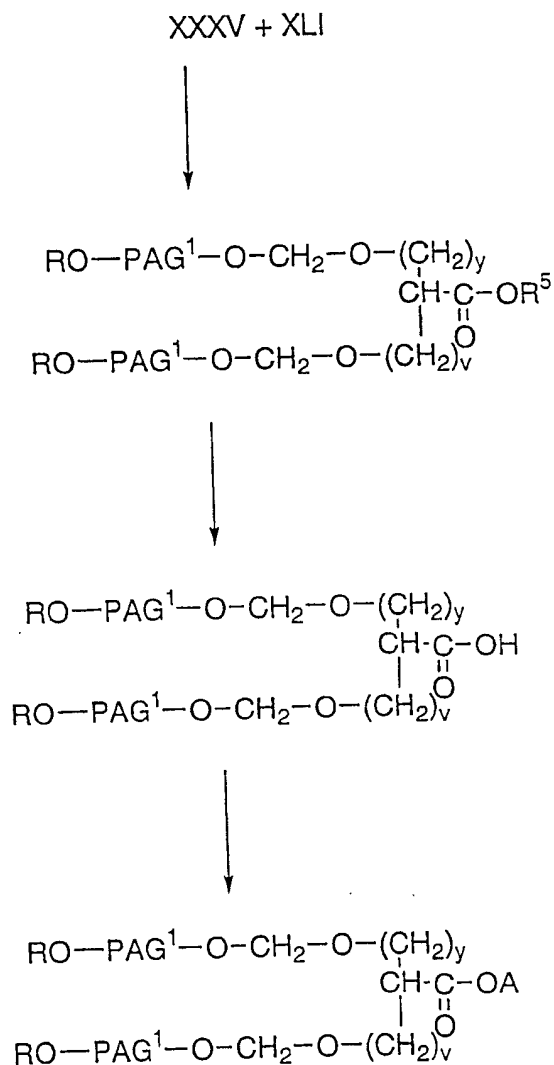


其中 A、R、PAG¹、v、w 和 y 如上所述,

该化合物通过将上式 XXXV 的化合物与下式化合物按照下列反应路线反应制成



其中 R、PAG¹ 和 k 如上所述。



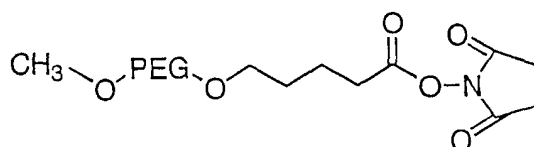
在该反应的第一步中, 式 XXXV 化合物与式 XLI 化合物反应生成式 XLII 的化合物。该反应通过与本文所述的式 XII 化合物与式 VI 化合物反

应制备式 XIII 化合物的相同方式进行。下一步骤中，将式 XLII 化合物按照与本文中关于水解式 XIII 化合物所描述的相同方式水解为式 XLIII 的化合物。随后将 XLII 的化合物进行反应使羧基转化为以上所述的活化离去基团，由此得到式 I-C2 的化合物，其中 A 表示当与其所连的氧原子合在一起时形成酯的活化离去基团。该反应按照与本文中关于将式 XIV 化合物转化为式 I-A2 化合物所描述的相同方式进行。

实施例

实施例 1

PEG 的 α -甲氧基, ω -戊酸琥珀酰亚胺酯的制备



将其中 R 为甲基、PAG 为分子量是 10000 的 PEG 的式 V 化合物(5.0g, 0.5mmol)在 50mL 甲苯中通过回流 2 小时共沸干燥，此后除去 40mL 的甲苯。将所得混合物溶于 30mL 的无水四氢呋喃中，并在氩气流下滴加至存在于圆底烧瓶中的氯化钠(0.12g, 5mmol)和无水四氢呋喃(20mL)中。将所得混合物回流过夜。将 5-溴代戊酸乙酯(0.79mL, 5mmol)经注射器加入到该反应中且使该反应回流过夜。此后通过旋转蒸发浓缩该反应溶液。通过加入 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀出残余物。过滤所沉淀的产物并真空干燥。收率: 4.5g 的标题化合物，其中 PEG 的分子量为 1,000 (m-Peg 戊酸乙酯)。

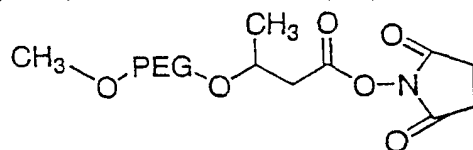
将 m-PEG 戊酸乙酯(4g)溶于 100mL 的 1N 氢氧化钠中，并将该溶液于室温下搅拌过夜。加入 6N 盐酸将该混合物的 pH 调节至 2.5，并且用二氯甲烷(50mL, 40mL 和 30mL)萃取该混合物。有机层用硫酸钠干燥，过滤，浓缩，并且在乙醚中沉淀。通过过滤收集其中 PEG 的分子量为 1,000 的产物 m-PEG 戊酸并在真空下干燥。收率: 3g。NMR (d6-DMSO): 1.50ppm (q,

2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$); 2.21ppm (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$); 3.21ppm (s, $-\text{OCH}_3$); 3.5ppm (s, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$).

将 m-PEG 戊酸(2g, 0.2mmol)溶于无水二氯甲烷(10mL), 此后加入 N-羟基琥珀酰亚胺(47mg, 0.41mmol)和二环己基碳二亚胺(87mg, 0.42mmol)。氩气和室温下将该混合物搅拌过夜。过滤该反应混合物, 浓缩, 并用 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。产物在真空中干燥过夜。收率: 1.6g 的标题化合物。NMR (d6-DMSO): 1.58-1.67ppm (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}-$); 2.69ppm (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}-$); 2.81ppm (s, 4H, NHS); 3.21ppm (s, $-\text{OCH}_3$); 3.5ppm (s, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$).

实施例 2

PEG 的 α -甲氧基, ω - β 丁酸琥珀酰亚胺酯的制备



将其中 PAG 为分子量是 10000 的 PEG 的式 I 的甲氧基化合物(5.0g, 0.5mmol)在 50mL 甲苯中通过回流 2 小时共沸干燥, 此后除去 40mL 的甲苯。将所得混合物溶于 30mL 的无水四氢呋喃中, 并在氩气流下滴加至存在于圆底烧瓶中的氢化钠(0.12g, 5mmol)和无水四氢呋喃(20mL)中。将所得混合物回流过夜。将 β -溴代丁酸乙酯(0.74mL, 5mmol)经注射器加入到该反应中使该反应回流过夜。此后通过旋转蒸发浓缩该反应溶液。通过加入 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀出残余物, 生成甲基 PEG, 其中 β 丁酸乙酯 PEG 的分子量为 1,000。过滤所沉淀的产物并真空干燥。收率: 4.5g。NMR(d6-DMSO): 0.83ppm (t, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 1.05ppm (t, 3H, $-\text{CH}_3$); 1.57ppm (m, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{CO}-$); 3.21ppm (s, $-\text{OCH}_3$); 3.5ppm (s, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$).

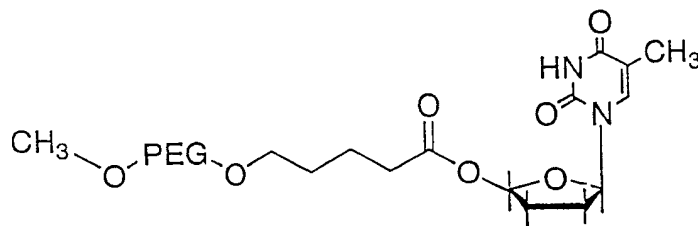
将 m-PEG β 丁酸乙酯(3g)溶于 50mL 的 1N 氢氧化钠中, 且使该溶液在室温下搅拌过夜。加入 6N 盐酸将该混合物的 pH 调节至 2.5, 并且用二氯甲烷(25mL, 20mL 和 20mL)萃取该混合物。有机层用硫酸钠干燥, 过滤,

浓缩，并沉淀在乙醚中。通过过滤收集产物 m-PEG 戊酸并在真空下干燥。收率：2.4g。NMR(d6-DMSO): 0.88ppm (t, 3H, -CH₃); 1.61ppm (m, 1H, -CHCH₂CO-); 3.21ppm (s, -OCH₃); 3.5ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-), 生成甲氧基 PEG 丁酸，其中 PEG 的分子量为 41,000。

将 m-PEG10k-β丁酸(1g, 0.1mmol)溶于无水二氯甲烷(5mL), 此后加入 N-羟基琥珀酰亚胺(24mg, 0.20mmol)和二环己基碳二亚胺(43mg, 0.21mmol)。氩气和室温下将该混合物搅拌过夜。过滤该反应混合物，浓缩，并用 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。产物在真空中干燥过夜，得到 6.6g 的标题化合物，其中 PEG 的分子量为 13000。

实施例 3

PEG-AZT 偶联物的制备



将实施例 1 中的 m-PEG10K 戊酸(0.2g, 0.02mmol)溶于无水二甲基甲酰胺(2mL)中，此后加入 3'-叠氮基-3'-脱氧-胸苷(AZT) (10.7mg, 0.04mmol)、1-羟基苯并三唑(HOBT) (9.8mg, 0.04mmol)、(4-二甲氨基)吡啶(DMAP) (5.7mg, 0.042mmol)和二环己基碳二亚胺(DCC) (9.5mg, 0.046mmol)。氩气和室温下将该混合物搅拌过夜。过滤该反应混合物，浓缩，并用 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。产物在真空中干燥过夜。收率：0.17g。NMR (d6-DMSO): 1.18ppm (m, 3H, H1); 1.51ppm (m, 2H, H9); 2.23ppm (m, 1H, H4); 2.37ppm (t, 2H, H8); 3.21ppm (s, H12); 3.5ppm (s, H11), 4.2ppm (m, 1H, H5); 6.12ppm (m, H₃, H6); 7.45ppm (s, 1H, H₂); 11.35ppm (br, 1H, H10)。

实施例 4

通过 mPEG10k-SVA 对 T-20 的聚乙二醇化

将实施例 1 中制备的 PEG 10kDa 的 α -甲氧基, ω -戊酸琥珀酰亚胺酯加入到 20mg 具有下述序列的 T-20 中:

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
Phe (SEQ ID: 1)

该加入在 1.0ml 缓冲液(50mM 硼酸盐 pH 8.0)中以 2 摩尔试剂/1 摩尔 T-20 的摩尔比进行。该溶液在室温下搅拌 4 小时。使用离子交换色谱(QA)从反应混合物中纯化出聚乙二醇化的 T-20。采用在 20mM Tris, pH 7.5 中的盐浓度由 100mM 递增至 1M NaCl 的线性梯度分离聚乙二醇化的 T-20 和未经修饰的 T-20。

实施例 5

通过 mPEG30K- β -SBA 对 EPO 的聚乙二醇化

1. 人 EPO 的发酵和纯化

注: 人 EPO 的发酵和纯化方法与欧洲专利申请(EP 1 064 951 A2)中所述的方法完全相同。(参见第 7-9 页)

2. 聚乙二醇化反应

向 5mg 的 EPOsf (653 μ l 的 7.66mg/ml EPOsf 储备液, 0.274 μ mol)中加入 347 μ l 含有 8.2mg 的 30kDa 甲氧基-PEG-9-SBA (0.274 μ mol)的 100mM 硼酸盐缓冲液, pH 8.0, 并在 4 $^{\circ}$ C 下混和 4 小时。最终的蛋白质浓度为 5mg/ml 且蛋白质: PEG 试剂的比例为 1: 1。4 小时后, 用冰醋酸调节 pH 至 4.5 以中止该反应, 并且储存于 -20 $^{\circ}$ C 下, 直至准备纯化。

3. 纯化

将上步的反应混合物用 10mM 醋酸钠, pH 4.5 按 1: 5 稀释, 并加样于装在 18mm x 143mm 柱内的 100ml SP-Sepharose FF(磺基丙基阳离子交换树脂)。该柱预先用同样的缓冲液平衡。用 Gilson UV 监测器在 280nm 下

监测柱洗脱液并用 Kipp 和 Zonen 读数仪记录。柱子用 100ml 或 1 柱床体积的平衡缓冲液洗涤以除去过量的试剂、反应副产物和低聚 PEG-EPO。此后用 2 柱床体积的 100mM NaCl 洗涤以除去二-PEG-EPO。此后用 200mM NaCl 洗脱出单-PEG-EPO。在单-PEG-EPO 的洗脱期间，弃去首个 50ml 的蛋白质峰并按 150ml 的级分收集单-PEG-EPO。残留在柱子上的未经修饰的 EPOsf 用 750mM NaCl 洗脱。所有洗脱缓冲液均在平衡缓冲液中制备。洗脱的样本通过 SDS-PAGE 和 MAIDI-TOF 分析。然后将由 150ml 级分所得且未监测到未经修饰的 EPOsf 的单-PEG-EPO 合并液浓缩至 ~5.0mg/ml，并渗滤到储备缓冲液，10mM 磷酸钾，100mM NaCl，pH 7.5 中。室温下通过 Millipore Labscale™TFF 系统进行浓缩/渗滤，该系统带有 5kDa 截止 Millipore Pellicon XL Biomax 50 膜。将浓缩的单-PEG-EPO 无菌过滤并冷冻储存在 -20℃ 下。

实施例 6

通过 mPEG10K-SVA 对 EPO 的聚乙二醇化

将不同等份试样的实施例 5 中所用的 EPOsf 与 10kDa 甲氧基-PEG-SVA 反应。该反应以蛋白质：试剂比为 1：2 进行，纯化技术按照实施例 5 所述。

实施例 7

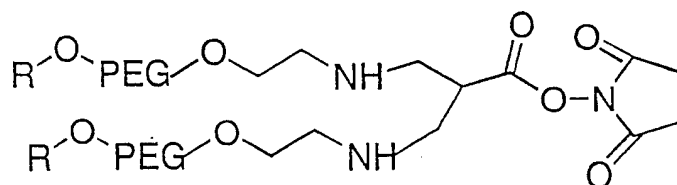
通过正常红细胞性贫血(normocythaemic)小鼠测定的聚乙二醇化 EPO 的体内活性

正常红细胞性贫血小鼠生物学测定是本领域中公知的(Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2))，并且该方法可参见 Ph. Eur. BRP 的红细胞生成素的专题论文。将样本用 BSA-PBS 稀释。对 7-15 周龄的正常健康小鼠皮下给予 0.5ml 的含得自实施例 5 或 6 的未聚乙二醇化 EPO (40ng/小鼠)或单聚乙二醇化 EPO (10 或 40ng/小鼠)的 EPO-级分。在 6 天期间，通过尾静脉穿刺取血并稀释，由此使 1μl 血液存在于 1ml 的

0.15mol 吡啶橙染色溶液中。染色时间为 3 至 10 分钟。以绝对数字(每 30,000 个所分析的血细胞)给出网状细胞计数。对于所给出的数据, 每组每天由 5 只小鼠组成, 并且小鼠仅取血 1 次。结果证明, 聚乙二醇化的 EPO 的活性增强且半衰期延长, 这一点通过与 40ng 剂量未经修饰的 EPO 相比、每只小鼠使用相同剂量(10ng)所得的网状细胞的数量明显增加以及网状细胞计数最大值的迁移得以表明。

实施例 8

甲氧基支链 PEG-酸及其琥珀酰亚胺基酯的制备



40℃下将其中 PAG 为分子量是 1,000 的 PEG 的式 VI 化合物[分子量为 10000 的 m-Peg 胺] (1.0g, 0.1mmol)溶于 5mL 的无水乙醇中, 此后加入 3-溴-2-(溴甲基)丙酸乙酯(7.6μl, 0.048mmol), 并将该混合物在 40℃和氩气下搅拌过夜。反应溶液通过旋转蒸发浓缩。残余物通过加入 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。过滤出所沉淀的产物并真空干燥。收率: 0.89g。

将该支链 m-Peg 酸酯(0.89g)溶于 20mL 的 1N 氢氧化钠中, 并将该溶液在室温下搅拌过夜。该混合物的 pH 通过加入 6N 盐酸调至 2.5, 并且用二氯甲烷(10mL、5mL 和 5mL)萃取该混合物。有机层用硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩并在乙醚中沉淀。通过过滤收集产物 m-Peg 戊酸并在真空中干燥。收率: 0.64g。

将支链 m-Peg 酸(0.64g, 0.032mmol)溶于无水二氯甲烷(5mL)中, 随后加入 N-羟基琥珀酰亚胺(11mg, 0.098mmol)和二环己基碳二亚胺(20mg, 0.099mmol)。该混合物在室温下于氩气中搅拌过夜。过滤反应混合物, 浓缩, 并用 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。产物在真空中干燥过夜。收率: 0.58g。

实施例 9

支链 PEG-酸及其琥珀酰亚胺酯的制备

40℃下将其中 PAG 为分子量是 2,000 的 PEG 的式 V 的甲氧基 PAG 化合物[分子量为 10000 的 m-Peg 胺] (1.0g, 0.1mmol)溶于 50mL 的无水乙醇中, 此后加入 3-溴-2-(溴甲基)丙酸乙酯(7.6μl, 0.048mmol), 并将该混合物在 40℃和氩气下搅拌过夜。通过旋转蒸发浓缩反应溶液。残余物通过加入 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。过滤所沉淀的产物并真空干燥。收率: 0.89g。

将该支链 m-Peg 酸酯(0.89g)溶于 20mL 的 1N 氢氧化钠中, 并将该溶液在室温下搅拌过夜。加入 6N 盐酸将该混合物的 pH 调节至 2.5, 并且用二氯甲烷(10mL、5mL 和 5mL)萃取该混合物。有机层用硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩并在乙醚中沉淀。通过过滤收集产物 m-Peg 戊酸并在真空下干燥。收率: 0.64g。

将该支链 m-Peg 酸 (0.64g, 0.032mmol)溶于无水二氯甲烷(5mL)中, 随后加入 N-羟基琥珀酰亚胺(11mg, 0.098mmol)和二环己基碳二亚胺(20mg, 0.099mmol)。将该混合物在氩气和室温下搅拌过夜。过滤该反应混合物, 浓缩, 并用 2-丙醇和乙醚(1: 1)的混合物沉淀。产物在真空中干燥过夜。收率: 0.58g 的标题化合物。

 序列表

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> 聚亚烷基二醇酸加合物

<130> 20917 US

<140> US 60/398,137

<141> 2002-07-24

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工多肽/蛋白

<300>

<302> HIV传播的合成肽抑制剂

<309>

<310> 5465933

<311> 1993-06-07

<312> 1995-11-07

<313> (1)..(36)

<400> 1

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
20 25 30

Trp Asn Trp Phe
35