[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 47/48

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00817029.0

[43] 公开日 2005 年 4 月 20 日

[11] 公开号 CN 1607962A

[22] 申请日 2000.10.12 [21] 申请号 00817029.0
[30] 优先权
[32] 1999.10.12 [33] US [31] 60/159,135
[86] 国际申请 PCT/US2000/028109 2000.10.12
[87] 国际公布 WO2001/026693 英 2001.4.19
[85] 进入国家阶段日期 2002.6.11
[71] 申请人 细胞治疗公司
地址 美国华盛顿州
[72] 发明人 A·M·库马 J·P·克莱恩
R·巴特 E·沃特

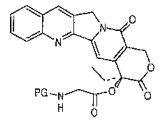
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 7 页

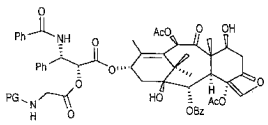
[54] 发明名称 聚谷氨酸 - 治疗剂结合物的生产方法

[57] 摘要

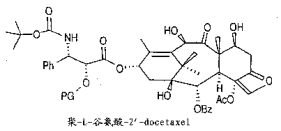
本发明提供了制备用于临床开发和药物使用的聚谷氨酸 - 治疗剂结合物的新方法，以及由这些方法制备的聚谷氨酸 - 治疗剂结合物。



聚-L-谷氨酸-甘氨酰-20(S)喜树碱



聚-L-谷氨酸-2′-(甘氨酰)紫杉醇



聚-L-谷氨酸-2′-docetaxel

ISSN1008-4274

1. 一种制备聚谷氨酸和治疗剂的结合物的方法，该方法包括:

（a）提供质子化形式的聚谷氨酸聚合物和一种用于与其结合的治疗剂;

（b）在一种惰性有机溶剂中将所述试剂共价结合到所述聚谷氨酸聚合物上，形成一种聚谷氨酸-治疗剂结合物;

（c）通过添加过量体积的水性盐溶液，将所述聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来；以及

（d）收集质子化固体形式的所述结合物。

2. 权利要求 1 的方法，其中步骤（a）进一步包括:

（a. 1）提供一种聚-L-谷氨酸钠盐的水溶液;

（a. 2）将该溶液酸化，从而使聚-L-谷氨酸钠盐转化为质子化形式并使其从溶液中沉淀出来；以及

（a. 3）收集聚-L-谷氨酸沉淀物并用水洗涤所述沉淀物。

3. 权利要求 1 的方法，其中步骤（a）中的治疗剂是一种抗肿瘤剂。

4. 权利要求 3 的方法，其中该抗肿瘤剂选自紫杉醇; docetaxel; 依托泊苷; 替尼泊苷; epothilone; 吉西他滨; 20(S)(+)喜树碱; 9-氨基喜树碱; 9-硝基喜树碱; 7-乙基-10-羟基喜树碱; 9-二甲基氨基甲基-10-羟基喜树碱; 10,11-亚甲基二氧喜树碱; 7-methylpiperizinomethyl-10,11-亚乙基二氧喜树碱; flavopiridol; 格尔德霉素; 17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧基格尔德霉素; 海鞘素 743; phthalascidin; CT-2584(1-(11-(十二烷基氨基)-10-羟基十一烷基)-3,7-二甲基黄嘌呤); CT-4582(1-(11-(N-甲基-N-十二烷基氨基)-10-羟基十一烷基)-3,7-二甲基黄嘌呤);多柔比星; 7-（二甲基叔丁基甲硅烷氧基）-10-羟基喜树碱或阿霉素。

5. 权利要求 4 的方法，其中 epothilone 是 epothilone A、epothilone B、epothilone C、epothilone D、epothilone F 和 12,13-二氧代 epothilone F。

6. 权利要求 4 的方法，其中该治疗剂是紫杉醇或 docetaxel。

7. 权利要求 1 的方法，其中步骤（a）中所述聚谷氨酸按照粘度法测定的分子量为 20kd～80kd。

8. 权利要求 1 的方法，其中步骤（b）中所述试剂通过一个可生理断裂的键直接结合到所述聚谷氨酸的羧基上。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述键是一种酯键或酰胺键。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述键是一种酯键。

11. 权利要求 1 的方法，其中步骤（b）中所述试剂通过一种连接体间接地结合到所述聚谷氨酸的羧基上，其中所述连接体通过可生理断裂的键结合到所述聚谷氨酸上并结合到所述试剂上。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述连接体是一种氨基酸。

13. 权利要求 1 的方法，其中步骤（b）中所述聚谷氨酸-治疗剂结合物包含约 5-55 重量%的治疗剂。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述结合物包含约 10-45 重量%的治疗剂。

15. 权利要求 1 的方法，其中步骤（c）中所述水性盐溶液包含氯化钠。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述水性盐溶液以反应混合物溶剂的 1.5-4 倍体积加入。

17. 权利要求 1 的方法，步骤（c）进一步包含使反应混合物酸化的步骤。

18. 权利要求 1 的方法，进一步包含从结合物中除去低分子量杂质的步骤，其中所述除去杂质的步骤可以在步骤（c）和（d）之间或在步骤（d）之后进行。

19. 一种制备聚谷氨酸和治疗剂的结合物的方法，该方法包括:

（a）将聚谷氨酸聚合物的一种盐悬浮在一种惰性有机溶剂中;

（b）通过将一种无水的酸添加到所述悬浮液中使所述聚合物质子化，形成一种基于结合物的可溶盐;

（c）提供一种治疗剂，并使所述试剂共价结合到所述聚谷氨酸聚合物上，形成一种聚谷氨酸-治疗剂结合物;

（d）通过添加过量体积的水性盐溶液，使所述聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来; 以及

（e）收集质子化固体形式的所述结合物。

20. 一种由聚-L-谷氨酸的钠盐和紫杉醇制备聚-L-谷氨酸-2′-紫杉醇结合物的方法，所述方法包括以下步骤:

（a）提供一种聚-L-谷氨酸钠盐的水溶液；

（b）将该溶液酸化到 pH 为约 2～4，从而使聚-L-谷氨酸钠盐转化为质子化形式并使其从溶液中沉淀出来；

（c）收集聚-L-谷氨酸沉淀物并用水洗涤；

（d）将所述聚-L-谷氨酸干燥到水含量介于 7 重量%～21 重量%；

（e）使聚-L-谷氨酸和紫杉醇在标准的偶联条件下接触足够的时间，以通过在紫杉醇的 2′-OH 基团和聚-L-谷氨酸的羧基之间形成的酯键将所述紫杉醇结合到所述聚谷氨酸聚合物上；

（f）将所述反应混合物冷却到 0℃～10℃，同时将水性盐溶液缓慢地加入到该反应混合物中；

（h）将得到的悬浮液酸化；

（i）收集质子化固体形式的所述结合物；以及

（j）从所述质子化固体中萃取出杂质。

21. 权利要求 20 的方法，其中步骤（a）-（d）用步骤（a′）和（b′）代替：

（a′）提供一种聚-L-谷氨酸钠盐在惰性有机溶剂中的悬浮液，以及

（b′）加入约 0.95 当量的三氟乙酸或甲磺酸，从而形成一种包含聚-L-谷氨酸三氟乙酸钠或聚谷氨酸甲磺酸钠的溶液；然后进行如权利要求 20 所述的步骤（e）-（j）。

22. 由权利要求 1 的方法制备的聚谷氨酸-治疗剂结合物。

23. 由权利要求 19 的方法制备的聚谷氨酸-治疗剂结合物。

聚谷氨酸-治疗剂结合物的生产方法

发明领域

本发明涉及一种大规模生产聚谷氨酸治疗剂结合物以进行临床开发的方法。

发明背景

当给药于患肿瘤的宿主时，作为一种聚谷氨酸结合物的抗肿瘤剂紫杉醇与该药物的非结合形式相比，表现出效力提高且毒性降低（美国专利5,977,163; Li等人，Cancer Res.，58:2404，1998）。聚谷氨酸-紫杉醇结合物表现出水溶性提高，从体内清除较慢，并且增加在肿瘤内的聚集。希望聚谷氨酸和各种其它治疗剂的结合物能够提供目前所用配方的临床上有用的替代品。

出于研究的目的，聚谷氨酸-治疗剂结合物可以用上述Li等人公开的方法来生产。在该方法中，将此结合物制备成一种钠盐，渗析以除去低分子量的杂质和过量的盐，然后冻干。但是该方法并不适合于大规模生产大量结合物以进行临床开发和使用。具体地说，利用渗析来除去杂质太耗时间，并且最终产品的产率较低。此外，尽管许多药物当制备成盐时具有更好的性能（例如溶解性、储存性和加工性提高），但对于本发明的聚谷氨酸-治疗剂结合物来说并不是这样。此结合物的盐形式是带静电的固体，并非游离的流动粉末。与游离的流动粉末相比，它们更加难以包装，更容易受到粉尘污染的影响，并且更有可能用有毒试剂污染操作间。因此，需要一种改进的方法来生产聚谷氨酸-治疗剂结合物，该方法可以用来以高产率和改进材料加工和包装的方式生产几克到几百克数量的这种结合物。

发明概述

通过提供一种制备聚谷氨酸-治疗剂结合物的改进方法，本发明满足了这种需要，该方法能够以85%～98%或约85%～约98%的产率提供几克到几千克数量的药用级结合物。

在一个具体实施方案中，该方法包括:

（a）提供质子化形式的聚谷氨酸聚合物和一种用于与其结合的治疗剂；

（b）在一种惰性有机溶剂中将所述试剂共价结合到所述聚谷氨酸聚合物上，形成一种聚谷氨酸-治疗剂结合物；

（c）通过添加过量体积的水性盐溶液，将所述聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来；以及

（d）收集质子化固体形式的所述结合物。

附加的除去残留低分子量杂质的步骤可以在步骤（c）和步骤（d）之间或在步骤（d）之后进行。

在另一个目前是最优选的具体实施方案中，通过下列方法进行质子化聚谷氨酸-治疗剂结合物的原位生成，该方法包括：

（a）将聚谷氨酸聚合物的一种盐悬浮在一种惰性有机溶剂中；

（b）通过将一种无水的酸添加到所述悬浮液中使所述聚合物质子化，形成基于结合物的一种可溶盐；

（c）提供一种治疗剂，并将所述试剂共价结合到所述聚谷氨酸聚合物上，形成一种聚谷氨酸-治疗剂结合物；

（d）通过添加过量体积的水性盐溶液，将所述聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来；以及

（e）收集质子化固体形式的所述结合物。

在另一个具体实施方案中，用于大规模生产聚谷氨酸-2′紫杉醇结合物的方法包括：

（a）提供一种聚-L-谷氨酸钠盐的水溶液；

（b）将所述溶液酸化到 pH 为约 2～4，由此将聚-L-谷氨酸的钠盐转化为质子化形式并从溶液中沉淀出来；

（c）收集聚-L-谷氨酸沉淀并用水洗涤；

（d）将聚-L-谷氨酸干燥到水含量介于约 2～约 7 重量%，优选介于 7～21 重量%，最优选介于约 7～约 21 重量%；

（e）使聚-L-谷氨酸和紫杉醇在标准的偶联条件下接触足够的时间，以通过在紫杉醇的 2′-OH 基团和聚-L-谷氨酸的羧基之间形成的酯键将紫杉醇结合到聚谷氨酸聚合物上；

（f）将反应混合物冷却到 0℃～10℃或约 0℃～10℃，同时将水性盐溶液缓慢地加入到反应混合物中；

（h）酸化得到的悬浮液；

（i）收集作为一种质子化固体的结合物；以及

（j）从质子化固体中萃取出杂质。

为了大规模生产聚谷氨酸-2′紫杉醇结合物，最优选的是用步骤（a′）和（b′）代替以上步骤（a）-（d）：

（a′）提供一种聚-L-谷氨酸钠盐，或者聚-L-谷氨酸的锂盐、钾盐或季铵盐在惰性有机溶剂中的悬浮液；

（b′）加入约 0.95 当量的三氟乙酸或甲磺酸。

由此形成一种包含聚-L-谷氨酸三氟乙酸或聚谷氨酸甲磺酸的钠、锂、钾或季铵盐的溶液；以及

如上所述进行步骤（e）-（j）。

任何聚谷氨酸-治疗剂结合物都可以通过本文所述方法来制备。在一个优选的具体实施方案中，治疗剂是抗肿瘤剂，例如紫杉醇；docetaxel；依托泊苷；替尼泊苷；epothilone 如 epothilone A、epothilone B、epothilone C、epothilone、epothilone F 和 12,13-二氧代 epothilone F；吉西他滨；20(S)(+)喜树碱；9-氨基喜树碱；9-硝基喜树碱；7-乙基-10-羟基喜树碱；9-二甲基氨基甲基-10-羟基喜树碱；10,11-亚甲基二氧喜树碱；7-methylpiperizinomethyl-10,11-亚乙基二氧喜树碱；flavopiridol；格尔德霉素；17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧基格尔德霉素；海鞘素 743；phthalascidin；CT-2584(1-(11-(十二烷基氨基)-10-羟基十一烷基)-3,7-二甲基黄嘌呤)；CT-4582(1-(11-(N-甲基-N-十二烷基氨基)-10-羟基十一烷基)-3,7-二甲基黄嘌呤)；多柔比星；阿霉素；苯丙氨酸氮芥；氟达拉滨；柔毛霉素；异搏定；5-氟尿嘧啶；氟尿苷（FUDR）；环孢菌素；维生素 A 酸；7-（二甲基叔丁基甲硅烷氧基）-10-羟基喜树碱以及其它。

附图简述

图 1. 示范结合物

图 2. 聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物的生产流程

图 3. 聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物的质谱 NMR 扫描

图 4. 聚-L-谷氨酸-甘氨酰-20(S)喜树碱的制备

图 5-7. Ⅰ-Ⅲ的反应流程

发明详述

定义

本文所使用的术语“聚谷氨酸”或“聚谷氨酸聚合物”包括聚（l-谷氨酸）、聚（d-谷氨酸）和聚（dl-谷氨酸）。优选聚谷氨酸聚合物包含至少 50%其自身的氨基酸残基作为谷氨酸，且更优选 100%。聚谷氨酸聚合物可以被天然存在或化学修饰的氨基酸取代最多到 50%，优选亲水性氨基酸，假定当结合上治疗剂时，相对于未结合治疗剂，取代的聚谷氨酸聚合物具有改进的水溶性和/或改进的效力，优选治疗剂是非免疫原性的。

通过本文所述方法制备结合物所使用的聚谷氨酸聚合物的分子量通常大于 5000 道尔顿，优选 15kd～80kd，更优选 20kd～80kd，又更优选 20kd～60kd，且最优选 30kd～60kd（由粘度法测定）。在分子量的较低端，本发明聚谷氨酸聚合物的分子量为约 10000、约 11000、约 12000、约 13000、约 14000、约 15000、约 16000、约 17000、约 18000、约 19000、约 20000、约 21000、约 22000、约 23000、约 24000、约 25000、约 26000、约 27000、约 28000、约 29000 到约 30000 道尔顿。在较高端，本发明聚谷氨酸聚合物的分子量为约 31000、约 32000、约 33000、约 34000、约 35000、约 36000、约 37000、约 38000、约 39000、约 40000、约 41000、约 42000、约 43000、约 44000、约 45000、约 46000、约 47000、约 48000、约 49000、约 50000、约 51000、约 52000、约 53000、约 54000、约 55000、约 56000、约 57000、约 58000、约 59000、约 60000、约 61000、约 62000、约 63000、约 64000、约 65000、约 66000、约 67000、约 68000、约 69000、约 70000、约 71000、约 72000、约 73000、约 74000、约 75000、约 76000、约 77000、约 78000、约 79000 到约 80000 道尔顿。本领域内技术人员明白当用其它方法测量时分子量的数值可以不同。这些其它方法包括，例如凝胶渗透法、小角光散射法、多角度激光散射、折射指数法和它们的组合。

本文所使用的术语“聚谷氨酸-治疗剂结合物”是指一种聚谷氨酸聚合物，它通过聚谷氨酸的一个羧酸残基和治疗剂的一个官能团之间的直接键合、或通过一个或多个双官能化连接体的间接键合而共价结合到治疗剂。优选的连接体是那些在循环中相对稳定地水解的连接

体，当从结合物上切除时是可生物降解和无毒的。当然应该理解合适的连接体不会干扰结合物的抗肿瘤效力。连接体的范例包括氨基酸（例如甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸）、羟基酸（例如γ-羟基丁酸）、二元醇、氨基硫醇、羟基硫醇、氨基醇以及它们的组合。治疗剂可以通过任何键合方法连接到聚合物或连接体上，从而产生可生理切除的键（即一种可以由酶或非酶机理切割的键，这取决于活体动物器官内的条件）。优选的键合物的例子包括酯、酰胺、氨基甲酸酯、碳酸酯、酰氧基烷基醚、酰氧基烷基硫醚、酰氧基烷基酯、酰氧基烷基酰胺、酰氧基烷氧羰基、酰氧基烷基胺、酰氧基烷基氨基甲酸酯、酰氧基烷基磺酰胺、缩酮、缩醛、二硫化物、硫醇酯、N-丙烯酰胺、烷氧基羰氧烷基、脲、和N-磺酰亚氨酸酯。

形成这些键的方法对有机化学合成领域内的技术人员来说是熟知的，并且例如可见于标准的教科书中，如J.March, Advanced Organic Chemistry(高等有机化学), Wiley Interscience , 第四版。

生物活性治疗或诊断剂在聚合物上的承载程度（即“承载密度”）可以表示为每条聚谷氨酸聚合物链上承载的分子数或平均分子数，或者优选表示为结合物总重量的百分比（%）（“承载%”）。通过调节治疗剂和聚合物的比例，并在需要时优化其它试剂可以得到理想的承载百分比。对于给定的结合物和给定的用途，最佳承载密度基于结合物所需要的性能（例如水溶性、治疗效力、药代动力学性能、毒性和剂量需要）根据经验确定。对于此处所述具体的结合物，承载密度的范围是1%～约60%或约1%～约60%，优选5%～55%或约5%～约55%，更优选10%～45%或约10%～约45%。

承载百分比通常由四种方法来确定：（1）计算重量%法；（2）分光光度法，优选紫外分光光度法；（3）NMR比例法；和（4）水解法。

（1）计算重量%法基于聚谷氨酸起始原料的已知重量和治疗剂的重量。对于所有结合物，转化为结合物形式的比例是完全100%，由二氧化硅支持的TLC来测定。

（2）分光光度法，优选紫外分光光度法基于在适当波长的吸收（例如紫外吸收），或荧光（例如对紫杉醇-聚谷氨酸结合物）所测量的治疗剂重量%。结合物溶解于去离子水中（2.5或5mg/ml），在500g离心15分钟以除去可能存在的颗粒物，清澈溶液用去离子水稀释100倍

到 200 倍。在特定波长处对稀释液测定吸光度，例如在 228nm 或 260nm 处对稀释液测定紫外吸收。用于制备结合物的等量聚谷氨酸溶液以与结合物相同的标称浓度溶解，然后在例如 228nm 或 260nm 处对稀释液测定其吸收。通过在例如 228nm 或 260nm 处测量溶于甲醇中的已知浓度紫杉醇溶液的吸光度作出一条线性校准曲线。为了计算承载百分比，从聚谷氨酸-紫杉醇的吸光度中减去聚谷氨酸溶液的吸光度（校准以符合聚谷氨酸-紫杉醇溶液中聚谷氨酸的理论承载百分比）。校准后的吸光度与紫杉醇标准曲线比较以得到结合物溶液中的紫杉醇浓度（w/v）。承载百分比是紫杉醇浓度与聚谷氨酸-紫杉醇结合物浓度的比例再乘以 100。

（3）NMR 比例法基于治疗剂的重量%，它是由聚合物得到的光谱中的峰相对于由治疗剂得到的峰的比例测量的。对于聚谷氨酸-紫杉醇结合物，说明如下：

约 4.5ppm 到约 6.5ppm 之间，优选 4.5ppm 到 6.5ppm 之间的面积相加并除以质子数（7）。然后该数值与约 3.8ppm 到约 4.4ppm 之间，优选 3.8ppm 到 4.4ppm 之间的聚合物骨架区比较，并由重叠的紫杉醇峰以 2 个质子数校准。考虑到紫杉醇和聚合物的分子量比较这两个面积/质子。

A=面积/质子（聚合物）÷面积/质子（紫杉醇）=21.36/1.98=10.79.

紫杉醇的 Mw=837；聚谷氨酸单体的 Mw=129。

承载%=（837/（10.79×129）+837）×100=37.6%。

本文所描述的方法通常用于制备聚谷氨酸和任何具有生物活性的治疗剂或诊断剂（如本文所述，适于官能化键合到聚谷氨酸上）的结合物。此处示范的结合物只是用来说明本发明，并不限制本发明的范围。

在一个优选的具体实施方案中，治疗剂包含可有效治疗癌症状况的药物，希望受益于这些结合物独特的药代动力学性能（例如增强肿瘤组织中的通透性和滞留性，延迟释放活性剂，与非结合的药剂相比有较长的生物半衰期，以及其它）。目前优选的药剂包括，举例来说，有紫杉碱类（例如紫杉醇；docetaxel）；依托泊苷；替尼泊苷；epothilone 如 epothilone A、epothilone B、epothilone C、epothilone D、epothilone F 和 12,13-二氧代 epothilone F；吉西

他滨；20(S)(+)喜树碱；9-氨基喜树碱；9-硝基喜树碱；7-乙基-10-羟基喜树碱；9-二甲基氨基甲基-10-羟基喜树碱；10,11-亚甲基二氧喜树碱；7-methylpiperizinomethyl-10,11-亚乙基二氧喜树碱；flavopiridol；格尔德霉素；17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧基格尔德霉素；海鞘素 743；phthalascidin；CT-2584(1-(11-(十二烷基氨基)-10-羟基十一烷基)-3,7-二甲基黄嘌呤)；CT-4582(1-(11-(N-甲基-N-十二烷基氨基)-10-羟基十一烷基)-3,7-二甲基黄嘌呤)；多柔比星；阿霉素；苯丙氨酸氮芥；氟达拉滨；柔毛霉素；异搏定；5-氟尿嘧啶；氟尿苷（FUDR）；环孢菌素；维生素 A 酸；7-二甲基-（叔丁基甲硅烷基）-10-羟基喜树碱以及其它。

治疗剂必需能够通过一个官能团结合到聚合物上，此官能团是本身分子中已经存在的或者是其它可以用有机化学合成中熟知的不改变试剂活性的方法引入的。在本文给出的实施例中，该试剂在非结合形式时是相对不溶于水的，并且在结合后表现出溶解性大大提高。但是，在水溶性药物与聚谷氨酸结合之后还希望它表现出多种优点（例如与非结合的试剂相比，改进的药代动力学和在作用位点的滞留性）。

在“标准偶联条件”下实施的反应在一种惰性溶剂中（例如 DMF、DMSO、N-甲基吡咯烷酮），于-20℃～150℃或约-20℃～约 150℃，优选 0℃～70℃或约 0℃～约 70℃，更优选 5℃～30℃或约 5℃～约 30℃的温度，在偶联剂和催化剂的存在下进行。当然，所用温度将取决于各种因素如治疗剂的稳定性和结合基团的反应性。合适的偶联剂是有机化学合成中所熟知的，并且包括但不限于碳化二亚胺、氯甲酸烷基酯和三乙基胺、吡啶鎓盐-三丁基胺、苯基二氯磷酸酯、2-氯-1,3,5-三硝基苯和吡啶、二-2-吡啶基碳酸酯、聚苯乙烯基二苯基膦、（三甲基甲硅烷基）乙氧基乙炔、1,1′-羰基双（3-甲基咪唑鎓）triflate、二乙基偶氮二羧酸酯和三苯基膦、N,N′-羰基二咪唑、甲烷磺酰氯、新戊酰氯、双（2-氧代-3-唑烷基）膦酸（“BOP-CI”）、2-氯甲基碘化吡啶（“CMPI”）等。对于醇偶联而言合适的催化剂包括有机碱，例如 4-N,N-二甲基氨基吡啶和 4-吡咯烷吡啶。

本文所使用的术语“惰性溶剂”是指在所述结合的反应条件下是惰性的一种溶剂，[包括，例如苯、甲苯、乙腈、四氢呋喃（THF）、二甲基甲酰胺（DMF）、氯仿（$CHCl_3$）、氯化亚甲基（或二氯甲烷或

“CH_2Cl_2”）、乙醚、乙酸乙酯、丙酮、甲基乙基酮、二氧杂环己烷、吡啶、二甲氧基乙烷、叔丁基甲基醚等]。除非另有具体说明，本发明反应中所使用的溶剂均为惰性溶剂。

如果在治疗剂中存在多个官能团，则该试剂的一个特定基团选择性结合到聚谷氨酸聚合物中就需要使用合适的保护基团。术语“保护基团”或“封闭基团”是指当结合到化合物的一个或多个羟基、巯基、氨基或羧基上时会防止在这些基团上发生反应的任何基团，并且保护基团可以用常规的化学或酶方法除去以重新恢复羟基、巯基、氨基或羧基。通常参见 T.W.Greene&P.G.M.Wuts，“Protective Groups in Organic Synthesis,”第三版，1999，John Wiley and Sons，N.Y.

所采用的可除去封闭基团并不重要，但优选的可除去羟基封闭基团包括常规的取代基，如烯丙基、苄基、乙酰基、氯代乙酰基、硫代苄基、亚苄基、苯甲酰甲基、叔丁基二苯基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、MOM（甲氧基甲基）、MEM（2-甲氧基乙氧基甲基）、t-BOC（叔丁氧基羰基）、CBZ（苄氧基羰基）和任何其它基团，只要它能够通过化学方法引入到羟基官能团上，并且随后可以在与产物性质相容的温和条件下通过化学或酶方法选择性地除去。

优选的可除去氨基封闭基团包括常规的取代基，如叔丁氧基羰基（t-BOC）、苄氧基羰基（CBZ）、芴基甲氧基羰基（FMOC）、烯丙氧基羰基（ALOC）等，它们可以通过与产物性质相容的常规条件除去。

在另一个具体实施方案中，可以使用吡咯衍生的氨基封闭基团如吡咯谷氨酸。在一个特定的实施方案中，吡咯谷氨酸可以或不可以除去。

优选的羧基保护基团包括酯，优选酯含有烷基如甲基、乙基、丙基、叔丁基等，它们可以通过与产物性质相容的温和水解条件除去。

命名法

本文所述的按照本发明具体实施方案制备的示范结合物如图 1 所示。在以下实施例中的结合物按照与图 1 结合物相同的方式命名。

优选实施方案的描述

一般而言，以适用于临床开发和药物使用的规模来生产聚谷氨酸-治疗剂结合物的方法包括以下步骤：

（a）提供质子化形式的聚谷氨酸聚合物和一种用于与其结合的治

疗剂；

（b）在一种惰性有机溶剂中将所述试剂共价结合到所述聚谷氨酸聚合物上，形成一种聚谷氨酸-治疗剂结合物；

（c）通过添加过量体积的水性盐溶液，将所述聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来；以及

（d）收集质子化固体形式的所述结合物。

步骤（a）中质子化形式的聚谷氨酸聚合物通过将一种用作原材料的含有聚谷氨酸盐的溶液酸化，然后将盐转化为其酸的形式来制取。离心分离固体之后，用水洗涤该固体（当在步骤（b）中使用二甲基氨基吡啶（“DMAP”）时，优选洗涤该固体直至水相 pH 值为 3 或更高）。然后在结合到所需治疗剂之前（步骤（b））干燥聚谷氨酸，优选采用冷冻干燥，并且优选干燥到包含约 2%～约 21%水，优选约 7%～约 21%水，更优选 7%～21%水的恒重。

在结合前步骤（b）的治疗剂可能需要修饰，例如引入新的官能团、修饰已存在的官能团或者结合一个间隔分子。这样的修饰可能需要使用如上所述的保护基团。

反应方案Ⅰ-Ⅲ说明了用来将各种示范治疗剂直接或通过甘氨酸间隔分子键合到聚-L-谷氨酸（PG）上的方法。在这些方案中所示以及描述于实施例中的条件可以改变，可以容易地由有机化学合成领域中的技术人员理解。用来将一种具体治疗剂结合到聚谷氨酸上的具体条件可以基于治疗剂对反应条件的稳定性，键合基团的反应性，与生产工艺相关的其它因素（例如安全性和规范生产）等。如上所述，在制备结合物时可以使用各种类型的键，取决于治疗剂中可用的官能团以及如果使用连接体时的连接体分子。因此，治疗剂可以通过不是酯和酰胺键的键结合到聚谷氨酸和/或连接体分子上。也可以使用不是甘氨酸的连接体，不是本文所示的那些偶联剂的偶联剂。说明实施本发明具体方案的用于制备结合物的具体条件将在以下实施例中描述。

在步骤（c）中，将一种水性盐溶液加入到反应混合物中以将聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来。任何水溶性无机盐都可以用于此目的，如钠、钾和铵盐，以及卤化物和硫酸盐（例如氯化钠、氯化钾、氯化铵、硫酸钠、硫酸铵等）。优选以 1 倍到 4 倍的体积使用 10-15%的盐溶液。在一个优选的实施方案中，使用 2.5 倍体积的 10%氯化钠。

将盐溶液缓慢加入到反应混合物中，在添加过程中冷却。为了使结合物的产率最佳，温度保持在约 0℃～约 10℃，优选 0℃～10℃。沉淀步骤从原材料和反应副产物中分离出聚谷氨酸-治疗剂结合物，其中副产物在用于沉淀结合物的条件下是完全或部分可溶的。

在步骤（d）中，收集作为质子化固体的结合物。优选酸化在步骤（c）中获得的悬浮液。取决于药物分子对酸条件的稳定性，pH 值范围可以采用约 pH 为 1～约 pH 为 4，优选 pH 为 1～4。但是为了制备聚谷氨酸-紫杉醇结合物，在 pH 低于 2 时酸化会导致紫杉醇分解，因此通常在 pH 约为 2.5 时进行酸化。优选地，在步骤（d）中采用除去碱如 DMAP，以及酸如盐酸（HCl）的方法。该悬浮液可以过滤或离心以收集结合物，优选过滤。

在酸化以生产最终的质子化结合物之前或之后，可以除去未反应的原材料、副产物以及其它杂质（以下实施例 2 和 3 中，以及图 2 和 4 中作说明）。例如，加入盐溶液后，可以收集固体并重新溶解，然后过滤或用适当的溶剂萃取，在此溶剂中杂质是可溶的而结合物不可溶（例如乙酸乙酯、二氯甲烷、氯仿、己烷、庚烷、乙醚和二氧杂环己烷）。然后酸化该溶液并如上所述收集质子化形式的结合物。

此外，该固体可以冷冻干燥，然后用适当的溶剂或其混合物匀浆以从最终的质子化结合物产物中除去杂质，适当的溶剂如乙腈（MeCN）；醚如乙醚、二氧杂环己烷、四氢呋喃；卤代溶剂如氯仿、二氯甲烷；酮如丙酮和甲基乙基酮（MEK）；C1～C10 的醇如叔丁醇、异丙醇、乙醇或甲醇。

在替代的一个优选实施方案中，以上步骤（c）用步骤（c′）代替，它包括：

（c′）从未反应的原材料和副产物中分离出所述的聚谷氨酸-治疗剂结合物，然后通过添加一种有机溶剂将所述聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来，在该溶剂中未反应的原材料和副产物是可溶的。

除了乙酸乙酯和乙腈之外，可以用来纯化结合物的其它溶剂的例子包括氯仿、四氢呋喃、二氧杂环己烷、甲苯、2-丁基甲基醚等。

一种替代方法是目前最优选的，其中通过下列方法进行质子化聚谷氨酸-治疗剂结合物的原位生成，该方法包括：

（a）将聚谷氨酸聚合物的一种盐悬浮在一种惰性有机溶剂中；

（b）通过将一种无水的酸添加到所述悬浮液中使所述聚合物质子化，形成基于结合物的一种可溶盐；

（c）提供一种治疗剂，并将所述试剂共价结合到所述聚谷氨酸聚合物上，形成一种聚谷氨酸-治疗剂结合物；

（d）通过添加过量体积的水性盐溶液，将所述聚谷氨酸-治疗剂结合物从溶液中沉淀出来；以及

（e）收集质子化固体形式的所述结合物。

该原位工艺减少了制备质子化 PG 聚合物中的多个步骤，并且将整个加工时间减少最多达 1 周。此外，当由原位工艺制备的产物与本文所公开的其它方法相比时，该产物会更快地溶解在水溶液中。

在此工艺中，任何无水的酸都可以用于上述步骤（b），只要结合物基的盐在该工艺所选用的有机溶剂中是可溶的。合适的酸的例子包括三氟乙酸、氯代乙酸、溴代苯甲酸、氯代苯甲酸、氯代苯氧基乙酸、氯代苯基乙酸、氰基乙酸、氰基丁酸、氰基苯氧基乙酸、氰基丙酸、二氯乙酸、乙酰乙酸、富马酸、马尿酸、碘代乙酸、乳酸、丙二酸、甲基富马酸、萘甲酸、硝基苯甲酸、邻苯二甲酸、甲磺酸、HBr、HCl 和 HI。

步骤（c）、（d）和（e）如上所述按普通工艺进行。

表 1 表示对如以下实施例 3 中所述制备的聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物的代表性分析。表 2 表示对如以下实施例 7 中所述原位制备的聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物的代表性分析。

表 1 分析数据

重量%[a]	总输出量[b]（克）	承载%（UV）[c]	承载%（NMR）[d]	游离紫杉醇%[e]	残留乙腈%[f]	残留 DMF%[g]	DIPU%[h]	ROI[i]
93.6	87.80	42.0	34.0	0.128	0.15	0.27	0.160	0.87

[a]产率%；[b]结合物的重量（克）；[c]紫杉醇的重量（克）/结合物重量（克），由紫外吸收法测定；[d]紫杉醇的重量（克）/结合物重量（克），由 NMR 法测定；[e]游离紫杉醇相对于结合物的 wt%；[f]残留乙腈相对于结合物的 wt%；[g]残留二甲基甲酰胺相对于结合物的 wt%；[h]二异丙基脲相对于结合物的 wt%；[I]燃烧残留物的 wt%。

表 2 分析数据

重量%[a]	总输出量[b]（克）	承载%（NMR）[d]	残留乙腈%[f]	残留 DMF%[g]	DIPU%[h]
95.1	0.485	36.0	0-0.01	0.01-0.45	0

[a]产率%; [b]结合物的重量（克）; [d]紫杉醇的重量（克）/结合物重量（克），由 NMR 法测定; [f]残留乙腈相对于结合物的 wt%; [f]残留二甲基甲酰胺相对于结合物的 wt%; [h]二异丙基脲相对于结合物的 wt%。

通过以下实施例说明本发明，这些实施例不应理解为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

在以下实施例中，结合物生产过程中的中间体用 ^{1}HNMR 来表征。用来制备如下所示结合物的聚谷氨酸（钠盐）的分子量范围是 20kd～50kd，具体由供应商基于粘度测量法来确定（Sigma 化学品公司，Milwaukee，WI）。结合物的平均承载密度是 37%。

实施例 1 制备聚-L-谷氨酸

聚-L-谷氨酸钠盐（85.9g）（Sigma 化学品公司，由粘度法测量确定 MW 为 37kd）溶解在 USP 纯化水中（534ml; 6.2ml/g），然后将该溶液冷却到 0℃～5℃。在剧烈搅拌并保持温度<10℃下滴加稀盐酸溶液（1M），直至 pH 介于 2～2.5。在滴加过程中，聚-L-谷氨酸从溶液中分离出来。反应混合物升温到室温并搅拌 1 小时，悬浮液在 2700×g 离心 10 分钟，移去上面的水层，固体重新悬浮在 560ml USP 纯化水中，然后离心 10 分钟。移去上面的水层并测量 pH 值。如果需要的话继续洗涤，直至水层的 pH 值≥3.0。在 LABCONCO™ 冻干系统中冷冻干燥湿固体，直至得到恒重。由 ICP 测定，钠的重量%不超过 7000ppm。

实施例 2 制备聚-L-谷氨酸-2′-紫杉醇结合物

如以上实施例 1 所述制备的聚-L-谷氨酸（16.82g）悬浮在无水 N,N-二甲基甲酰胺（180ml）、紫杉醇（9.923g, 11.6mmol）和 N,N-二甲基氨基吡啶（283mg, 2.32mmol）中。反应混合物搅拌 30 分钟。用注射泵在 3 小时中加入 N,N-二异丙基碳二亚胺（1.903g, 15.08mmol）在 N,N-二甲基甲酰胺（50ml）中的溶液。加入之后，搅

拌直至反应完成（室温下约为 4 小时）。反应冷却到 5℃～10℃，缓慢加入 10%氯化钠溶液（345ml）以沉淀出聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物，通过将混合物移入离心管中并在 1500g 下将其离心来分离沉淀物。湿固体重新悬浮在水（150ml）中，在剧烈搅拌下缓慢加入 1M 的碳酸氢钠溶液（120ml），以调节溶液的 pH 值为 7。反应物再搅拌 1 小时，然后通过 0.2 微米的过滤器过滤以除去杂质。滤液冷却到 0℃～5℃，在剧烈搅拌下缓慢加入 HCl 溶液（1N），直至溶液的 pH 值调节到 3，继续搅拌 30 分钟。沉淀出的固体在 1500g 离心，通过悬浮在水中（150ml）然后离心将湿固体洗涤两次。产物冷冻干燥，得到 24g 聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物（产率 90%）。

在以上工序中，过滤步骤可以由用乙酸乙酯（250ml，2 次）洗涤溶液以除去杂质来代替。

图 3 表示由如上所述相同方法制备的聚-L-谷氨酸-2′-紫杉醇结合物的一个代表性质谱 NMR 扫描，但具有较高的紫杉醇含量（即 55%）。

实施例 3 制备聚-L-谷氨酸-2′-紫杉醇结合物（生产工艺）

如以上实施例 1 所述制备的聚-L-谷氨酸（42g）加入到装配有机械搅拌器、进料漏斗和温度探针的三颈三升圆底烧瓶中。加入 N,N-二甲基甲酰胺（350ml）并搅拌 10 分钟，加入紫杉醇（24.66g）和 N,N-二甲基氨基吡啶（0.70g）并搅拌 10 分钟。在室温下用进料漏斗于 1 小时内加入 N,N-二异丙基碳二亚胺（4.73g）在 N,N-二甲基甲酰胺（143ml）中的溶液，并搅拌 4 小时。反应混合物冷却到 5℃～10℃，然后用进料漏斗滴加 10%的氯化钠冷溶液（1.2L），并通过在冰盐混合物中冷却烧瓶将温度保持在 5℃～10℃。加入氯化钠溶液之后，滴加 1N 的盐酸溶液（35ml）直至反应物的 pH 值达到 2.5。反应混合物在 5℃～10℃搅拌 30 分钟，然后通过过滤收集沉淀出来的聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物。该固体用水洗涤 3 次，在冻干机中冷冻干燥 24 小时。用研钵和研杵将干燥后的固体粉碎成细小的粉末，该细小的粉末状聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物悬浮在乙腈中（1000ml）并搅拌 2 小时，然后过滤，并用 2×200ml 乙腈洗涤固体。固体在真空下干燥 24 小时以得到聚-L-谷氨酸-紫杉醇结合物（60g）。产率为 90%。

实施例 4 制备聚-L-谷氨酸-甘氨酸-紫杉醇结合物（反应方案Ⅱ）

基本上如 Mathew 等人所述进行以下步骤 1 和 2（Mathew, A.E., Mejillano, M.R., Nath, J.P., Himes, R.H., 和 Stella, V.J., J.Med.Chem., 35: 145-151, 1992）。

步骤 1 制备 2′ -(N-t-BOC-甘氨酰)紫杉醇

向 N-t-BOC-L-甘氨酸（131mg, 0.75mmol）和紫杉醇（640mg, 0.75mmol）在二氯甲烷（20ml）的溶液中加入 1,3-二异丙基碳二亚胺（124mg, 0.98mmol），然后加入 N,N-二甲基氨基吡啶（27mg, 0.23mmol）。室温搅拌 4 小时后，在减压下将该混合物浓缩。采用硅胶快速色谱术纯化残留物，用 1:1（v/v）的乙酸乙酯/己烷洗脱，得到白色粉末状的 2′ -(N-t-BOC-甘氨酰)紫杉醇（720mg, 产率 95%）。

步骤 2 制备 2′ -(甘氨酰)紫杉醇

2′ -(N-t-BOC-甘氨酰)紫杉醇（245mg, 0.242mmol）在甲酸中（2ml）的溶液搅拌 30 分钟。减压下浓缩之后，残留物悬浮在水中（15ml）。加入 0.05M 的碳酸氢钠冷溶液（45ml），然后用二氯甲烷（2×40ml）萃取该溶液（pH 为 8.0）。合并后的二氯甲烷萃取液用无水硫酸钠干燥，然后在减压下浓缩。采用硅胶快速色谱术纯化残留物，用 4%甲醇/二氯甲烷洗脱，得到白色粉末状的 2′ -(甘氨酰)紫杉醇（161mg, 产率 73%）。

步骤 3 制备聚-L-谷氨酸-2′ -(甘氨酰)紫杉醇结合物

向聚-L-谷氨酸（275mg, 1.87mmol）在无水二甲基甲酰胺（6ml）的搅拌悬浮液中加入 2′ -(甘氨酰)紫杉醇（161mg, 0.177mmol）。在 30 分钟内将 1,3-二异丙基碳二亚胺（29mg, 0.23mmol）在二甲基甲酰胺（1.4ml）中的溶液加入到搅拌悬浮液中，在室温下搅拌 3 小时之后，在冰浴中冷却混合物，以调节冰浴温度为 0℃～5℃，然后在 30 分钟内加入 10%的氯化钠水溶液（7ml）以沉淀聚-L-谷氨酸-2′ -(甘氨酰)紫杉醇结合物。得到的白色悬浮液在 1500g 离心 15 分钟。过滤后，通过悬浮在水中（10ml）然后离心将固体洗涤两次。粗产物悬浮在水中（6ml），然后在搅拌的同时缓慢加入 1M 的碳酸氢钠水溶液

（2.3ml），以调节烧瓶中物质的 pH 值为 7.6。再搅拌 2 小时之后，水层用乙酸乙酯（3×6ml）洗涤，然后通过加入 1N 的盐酸使 pH 值为 2.8 来酸化。沉淀的固体用离心分离，并用水洗涤（2×6ml）。冷冻干燥湿固体以得到白色粉末状的聚-L-谷氨酸-2′-(甘氨酰)紫杉醇结合物（315mg,，产率 72%）。

采用类似工序，以上结合物可以被并非甘氨酸的其它氨基酸所取代。

实施例 5 制备聚-L-谷氨酸-2′-docetaxel 结合物（反应方案Ⅲ）

步骤 1 制备 10-脱乙酰紫杉醇

基本上如 Zheng, Q. Y., Darbie, L.G., Chen, X., Murray, C.K., Tetrahedron Letters., 36: 2001-2004, 1995 和美国专利 5629433 中所述制备 10-脱乙酰紫杉醇。

向紫杉醇（1.0g, 1.17mmol）在四氢呋喃（20ml）的溶液中加入过氧化氢（30%, 20ml），随后加入碳酸氢钠（1.92g, 22.85mmol）。室温下搅拌 18 小时之后，混合物用二氯甲烷/水（1:1(v/v), 100ml）处理，有机相用水洗涤（2×30ml），用无水硫酸镁干燥，然后在真空下浓缩。采用硅胶快速色谱术纯化残留物，用 3%甲醇/二氯甲烷（v/v）洗脱，得到白色粉末状的 10-脱乙酰紫杉醇（890mg，产率 93%）。

步骤 2 制备 2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇

如美国专利 5629433 中所述制备 2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇。

室温下在氩气中于 30 分钟内向 10-脱乙酰紫杉醇（850mg, 1.05mmol)在无水吡啶(20ml)的溶液中加入氯化三乙基硅烷(2.72ml, 20.1mmol）。搅拌 17 小时后，混合物用二氯甲烷（75ml）处理，用水（3×30ml）、用 10%的硫酸铜水溶液（4×35ml）、用水（30ml）、以及用氯化钠的饱和水溶液（30ml）洗涤。有机相用无水硫酸镁干燥，然后在减压下浓缩以得到粉末状的 2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇（980mg，产率 90%）。

步骤 3 制备 2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇亚胺

如美国专利5629433中所述制备2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇亚胺。

向2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇(730mg,0.70mmol)在四氢呋喃(7.3ml)的溶液中加入氢氯化茂锆(543mg,2.11mmol)。室温下在氢气中搅拌15小时之后,将混合物倾入冷己烷中(75ml)。沉淀出的锆络合物通过过滤除去。滤液在减压下浓缩以得到白色粉末状的2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇亚胺(636mg,产率92%)。

步骤4 制备10-脱乙酰紫杉醇伯胺

按照美国专利5629433制备10-脱乙酰紫杉醇伯胺。

2′,7-双(三乙基甲硅烷基)-10-脱乙酰紫杉醇亚胺(636mg,0.621mmol)在1%(w/w)浓盐酸/95%乙醇(25ml)的溶液搅拌15小时,用水(65ml)处理,然后用己烷(2×30ml)洗涤。通过加入饱和碳酸氢钠水溶液来中和水层(pH值为7),并用二氯甲烷萃取(2×40ml)。合并后的萃取液用无水硫酸镁干燥,然后在减压下浓缩以得到白色粉末状的粗伯胺产物(405mg,产率92%)。该产物不需要进一步纯化就可用于下一步骤。

步骤5 制备docetaxel

按照美国专利5629433制备docetaxel。

向10-脱乙酰紫杉醇伯胺(405mg,0.57mmol)在乙酸乙酯(40ml)的溶液中加入饱和碳酸氢钠水溶液(40ml)。向此双相混合物中加入二碳酸二叔丁酯(225mg,1.03mmol),室温下搅拌15小时之后,加入乙酸乙酯(75ml)。有机相用水洗涤(2×30ml),用无水硫酸钠干燥,然后真空下浓缩。采用硅胶快速色谱术纯化残留物,用4%甲醇/二氯甲烷洗脱,以得到白色粉末状的docetaxel(351mg,产率76%)。

步骤6 制备聚-L-谷氨酸-2′-docetaxel结合物

向聚-L-谷氨酸(658mg,4.47mmol)在无水二甲基甲酰胺(10ml)的悬浮液中加入docetaxel(385mg,0.48mmol)和N,N-二甲基氨基吡啶(12mg,0.096mmol)。在20分钟内将1,3-二异丙基碳二亚胺

（78.8mg，0.624mmol）在二甲基甲酰胺（3ml）中的溶液滴加到搅拌悬浮液中。搅拌15小时后，混合物在冰浴中冷却，并在30分钟内加入10%的氯化钠水溶液（20ml）。再搅拌1小时后，过滤固体，然后用水（4×50ml）洗涤过滤后的滤饼。将固体冷冻干燥到恒重，然后用乙腈（4×50ml）粉碎。在高真空下干燥15小时，得到白色粉末状的聚-L-谷氨酸-2′-docetaxel结合物（890mg，产率87%）。^{1}H NMR(300MHz, DMSO-d_6)：δ12.10(s, -COO<u>H</u>)，7.05-8.20(m, 芳族质子)，4.80-6.05(m)，3.80-4.50(m)，5.0-5.6(m, 5-<u>H</u>$_2$, 7-<u>H</u>$_2$)，3.70-4.35(m)，1.20-2.80(m)，1.00(s)。

实施例6 制备聚-L-谷氨酸-甘氨酰-20（s）喜树碱（反应方案Ⅰ）

如Greenwald, R.B., Pendri, A., Conover, C.D., Lee, C., Choe, Y.H., Gillbert, C., Martinez, A., Xia, J., Wu, D.,和Hsue, M., Bioorg.& Med.Chem., 6: 551-562, 1998所述进行以下步骤1和2。

步骤1 制备20-(N-t-BOC-甘氨酰)-20(s)喜树碱

在0℃向N-t-BOC-甘氨酸（530mg，3.0mmol）在无水二氯甲烷（240ml）的溶液中加入1,3-二异丙基碳二亚胺（379mg，3.0mmol）、N,N-二甲基氨基吡啶（244mg，2mmol）和20（s）喜树碱（348mg，1.0mmol）。反应混合物升温到室温。搅拌18小时后，混合物用0.1N的盐酸水溶液（2×50ml）、水（2×50ml）、0.1M的碳酸氢钠水溶液（2×25ml）以及水（2×50ml）顺序洗涤。有机相用无水硫酸钠干燥，然后在减压下浓缩。残留物从甲醇中（7ml）结晶出来，得到黄色粉末状的20-(N-t-BOC-甘氨酰)-20(s)喜树碱（424mg，产率84%）。^{1}H NMR(300MHz, $CDCl_3$)：δ8.35(s, 1H)，8.22(d, J=8.38Hz 1H)，7.91(d, J=8.07 1H)，7.76-7.85(m. 1H)，7.65(t, J=7.4Hz,1H)，7.26(s, 1H)，5.70(d, J=17.25Hz,1H)，5.40(d, J=17.25Hz,1H)，5.25(s, 2H)，4.95(br, s, 1H)，3.98-4.25(m, 2H)，2.18-2.26(m, 2H)，1.38(s, 9H)，0.95(t, J=7.47Hz,3H)。

步骤2 制备20-甘氨酰-20(s)喜树碱三氟乙酸盐

20-(N-t-BOC-甘氨酰)-20(s)喜树碱（424mg，0.84mmol）在1:1(v/v)的二氯甲烷/三氟乙酸（21ml）混合物的溶液在室温下搅拌1小时。减压下蒸发掉溶剂，从二氯甲烷/乙醚（3:7(v/v)，50ml）中结晶出黄色固体，得到微黄色粉末状的20-甘氨酰-20(s)喜树碱三氟乙酸盐（361mg，产率83%）。^{1}H NMR(300MHz，DMSO-d_6)：δ8.78(s，1H)，8.45(br，s，2H)，8.20(d，J=8.2Hz，1H)，7.70-7.95(m. 2H)，7.30(s，1H)，5.55(s，2H)，5.30(s，2H)，4.35(d，J=17.9Hz，1H)，4.15(d，J=17.9Hz，1H)，2.10-2.30(m. 2H)，1.00(t，J=7.4Hz，3H)。

步骤3 制备聚-L-谷氨酸-20-甘氨酰-20（s）喜树碱结合物

20分钟内向20-甘氨酰-20（s）喜树碱三氟乙酸盐（351mg，0.68mmol）、聚-L-谷氨酸（465mg，3.16mmol）、和N,N-二甲基氨基吡啶（249mg，2.04mmol）在无水二甲基甲酰胺（13ml）的搅拌悬浮液中加入1,3-二异丙基碳二亚胺（111.6mg，0.88mmol）在二甲基甲酰胺（2ml）中的溶液。在氩气中搅拌2天后，混合物在冰浴中冷却，并在30分钟内加入10%的氯化钠水溶液（35ml）。再搅拌1小时后，通过加入1N的盐酸水溶液将悬浮液酸化到pH值为2.5。过滤收集黄色的沉淀物，用水洗涤（5×25ml），真空下干燥过夜，然后用乙腈粉碎（100ml）。高真空下干燥24小时后，得到黄色粉末状的聚-L-谷氨酸-20-甘氨酰-20(s)喜树碱结合物(703mg，产率95%)。^{1}H NMR(300MHz，DMSO-d_6)：δ 12.10(s，-COOH)，7.05-8.74(m，7,9,10,11,12,&14CH)，5.0-5.6(m，5-CH_2，7-CH_2)，3.70-4.35(m，-Gly-CH_2，PG-N-CH-)，1.42-2.62(m，18-CH_2，PG-δCH_2，δCH_2)，0.90(br，s，19-CH_3)。^{1}H NMR表明紫杉醇的含量为34%。

实施例7 原位法生产聚谷氨酸-紫杉醇

装有搅拌棒的100ml圆底烧瓶中加入聚-L-谷氨酸(钠盐，340mg，2.25mmol，11.3当量）和7ml干燥的二甲基甲酰胺。搅拌悬浮液并通过注射器恒速加入三氟乙酸（156μl，2.03mmol，10.2当量）。悬浮的固体在约5分钟内溶解，紫杉醇（170mg，0.199mmol，1.0当量）作为固体加入，然后加入4-(N,N-二甲基氨基)吡啶(10mg，0.082mmol，

0.4 当量）和二异丙基碳二亚胺（40μl，0.259mmol，1.3 当量）。室温下搅拌溶液 18 小时，然后用冰浴冷却到 0℃，在剧烈搅拌下缓慢加入 10 重量%的氯化钠水溶液，导致沉淀出细小的白色固体。用稀盐酸调节 pH 值为 2.5，然后将悬浮液移到 50ml 的离心管中。旋转固体，滗出上清液，并将所得物质悬浮在 35ml 水中。悬浮液再次旋转、滗析、并重新悬浮在 35ml 水中。最终漂洗后，剩余的物质冷冻干燥以得到一种干燥粉末。该粉末用 3×15ml 的乙腈洗涤，然后在高真空下除去残留的溶剂，得到 485mg 白色粉末。^{1}H NMR (d_6 DMSO) 表明紫杉醇的含量为 38 重量%。

实施例 8 生物试验

用皮下移植有路易斯肺癌细胞（LL/2）的大鼠测试抗肿瘤活性。通过以 0.25ml PBS+2%FBS 的体积皮下注射 2.5×10^5 鼠路易斯肺（LL/2）癌细胞(ATTC CRL-1642)在右肩胛间区域的肌肉中产生肿瘤。在肿瘤细胞移植之后，当肿瘤生长到 $20\pm20mm^3$（230 个肿瘤的平均值）时，腹膜内注射测试化合物和对照赋形剂 7 天。在 0.1N Na_2HPO_4 中的单剂量聚谷氨酸-治疗剂结合物以非结合剂最大耐受剂量的 1 到 4 倍给药，通常以 0.75%盐水中的 8.3% cremophore EL/8.3%乙醇给药。每个处理组由随机分配到每组中的 10 只大鼠组成。开始时每 3 到 4 天检测肿瘤生长，当肿瘤尺寸达到随机设定的 $2500mm^3$ 上限时，每天测定肿瘤的尺寸。根据公式：（长度×宽度×高度）/2 来计算肿瘤的体积。肿瘤等于或大于 $2500mm^3$ 的大鼠用颈椎错位法处死，各种处理的效力表示为与非结合治疗剂的最大耐受剂量相比，肿瘤达到 $2500mm^3$ 体积的天数（即 TGD，肿瘤生长延滞）。

测试以上实施例 2、3、5 和 6 中所述的聚谷氨酸-治疗剂结合物，并发现在本试验中有活性。

实施例 9 制备聚-L-谷氨酸-CT2584

聚-L-谷氨酸（4.95g）悬浮在无水 N,N-二甲基甲酰胺（120ml）中并加入 CT 2584（0.873g，1.634mmol）。搅拌下将反应混合物加热到 50℃直至形成清澈溶液。反应混合物冷却回到室温，使用滴液漏斗在 30 分钟内加入 N,N-二异丙基碳二亚胺（0.247g，1.96mmol）在 N,N-

二甲基甲酰胺（5ml）中的溶液。加入之后，在室温下搅拌反应物 4 小时，反应物冷却到 5℃～10℃，缓慢加入 10%的氯化钠溶液（200ml）以沉淀出聚-L-谷氨酸 CT2584 结合物。通过在 1500×g 下离心收集沉淀物。通过悬浮在水中（150ml）然后离心将湿固体洗涤 2 次。产物冻干，得到 5.16g 聚-L-谷氨酸 CT2584 结合物，产率=88.6%。

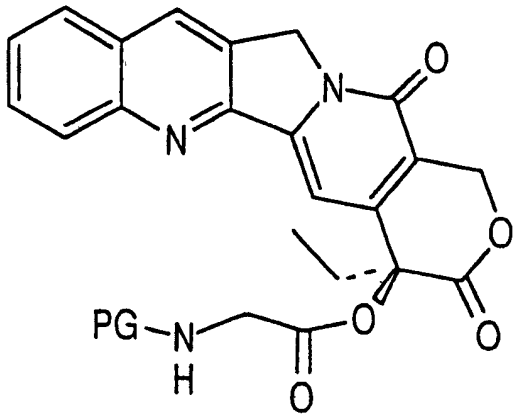
该产物用 ^{1}H NMR 表征，结果表明在 3.9ppm 和 3.4ppm 处有一个单峰，对应于在 N3 和 N7 上的甲基基团，以及在 1.24ppm 处有一个较宽的单峰，对应于烷基质子，以及在 0.85ppm 处有一个较宽的峰，对应于 CT2584 的末端甲基基团。此外 NMR 表明在 1.5ppm-3.0ppm 和 3.5ppm-4.5ppm 处有多重峰，对应于聚-L-谷氨酸骨架。

实施例 10 制备聚-L-谷氨酸-喜树碱

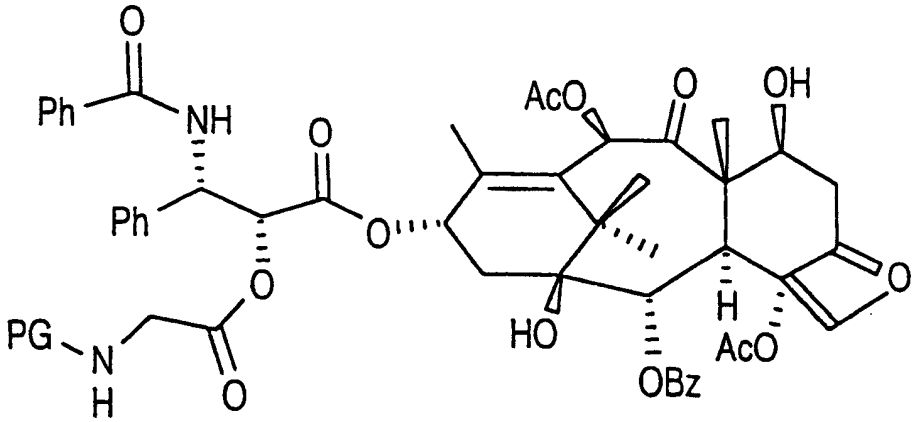
20(s)-喜树碱（64mg，0.184mmol）、聚-L-谷氨酸（256mg，49.8kD）的混合物在真空下干燥 6 小时，然后溶解在无水二甲基甲酰胺中（15ml）。该溶液在冰/盐浴中冷却到-5℃，在氩气保护下向其中加入 2-氯甲基碘化吡啶（85mg，0.33mmol）和 N,N-二甲基氨基吡啶（81mg，0.66mmol）。反应混合物升温到室温过夜，4 天后，反应烧瓶再次冷却到 0℃，然后在 25 分钟内缓慢加入 10%的氯化钠溶液（35ml）。该混合物用 0.5N HCl(3.5ml)酸化到 pH 值为 2.5，然后在室温再搅拌 1 小时，过滤所形成的黄色沉淀物，用水（4×30ml）洗涤，然后真空下干燥 12 小时。所得干燥的黄色滤饼研磨成细小的粉末，重新悬浮在 2%MeOH/CH_2Cl_2（10ml）中并搅拌 3 小时。通过离心分离固体。重复该工艺 4 次以除去任何未反应的喜树碱。所得固体在真空下干燥 2 天，得到聚-L-谷氨酸-20(s)-喜树碱（295mg，产率 97%，由基于回收喜树碱(13mg)的重量比确定）。^{1}H NMR(300MHz, DMSO-d_6): δ 12.10(s, -COOH), 6.90-8.80(m), 5.15-5.8(m), 3.10-4.35(m), 1.42-2.62(m), 0.90(br, s, 19-CH_3), 紫杉醇承载%为 16 重量%。

尽管本发明已经参考其具体实施方案作了描述，但本领域内技术人员应该理解，可以作各种改动并可以替代等效物，只要不背离本发明的真实主旨和范畴。此外，可以作出各种修改以适应具体情况、材料、物质组成、工艺、工艺步骤或各步骤，以体现本发明的主旨和范畴。所有这些修改均在所附权利要求的范围之内。

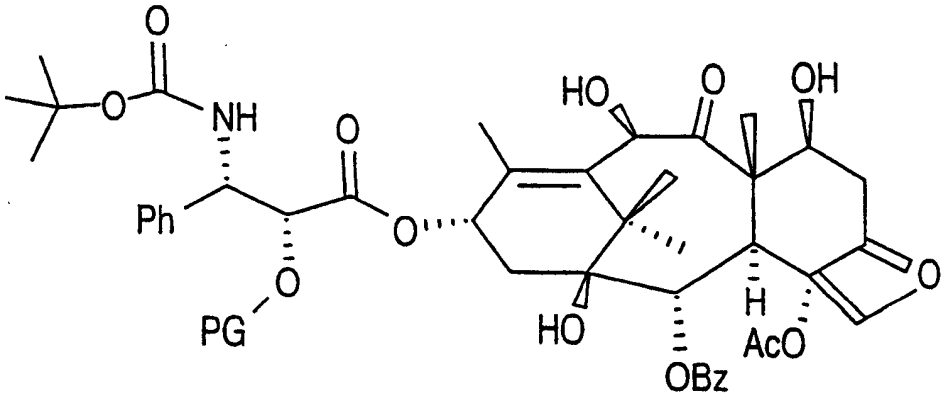
在本申请中所引用的所有公开文献、专利申请和专利在此均以其相同范畴的整体内容引为参考文献，如同每个单独的公开文献、专利申请或专利均具体而单独地指出以其整体内容作为参考。



聚-L-谷氨酸-甘氨酰-20(S)喜树碱



聚-L-谷氨酸-2′-(甘氨酰)紫杉醇



聚-L-谷氨酸-2′-docetaxel

图 1

生产方案

聚-L-谷氨酸钠盐

1. 溶于水中
2. 用1M的HCl酸化到pH=2
3. 通过离心分离固体
4. 用水洗涤直至pH>3.5
5. 冷冻干燥

聚-L-谷氨酸

1. 紫杉醇,二甲基氨基吡啶,二异丙基碳二亚胺,二甲基甲酰胺,搅拌直至反应完全
2. 用10%NaCl溶液稀释(DMF体积的2.5倍)
3. 过滤
4. 用水洗涤若干次
5. 冷冻干燥
6. 用乙腈制浆
7. 真空干燥

CT 2103

产率=87%(10批料的平均值)

图 2

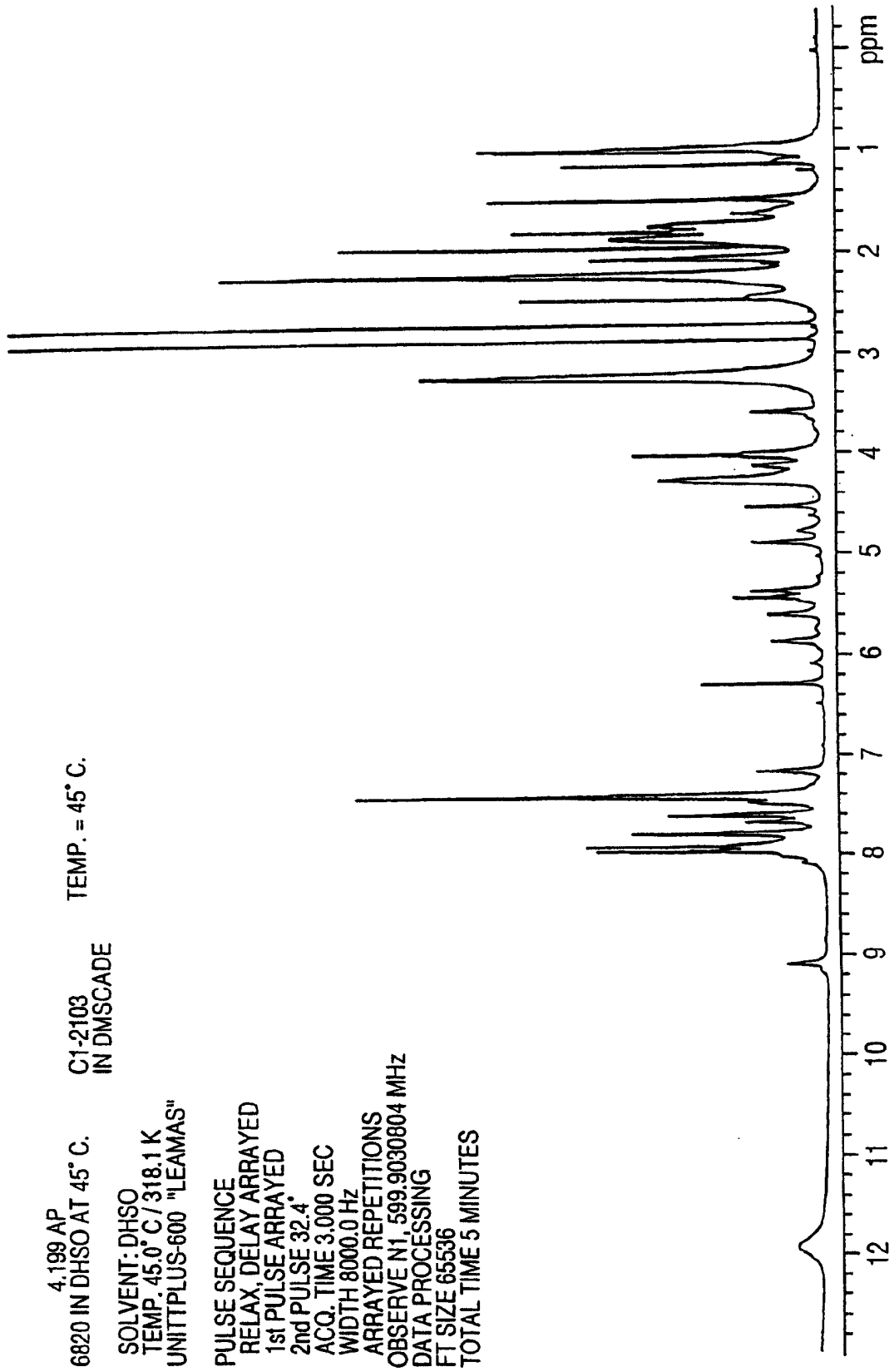

4.199 AP
6820 IN DHSO AT 45° C.
C1-2103
IN DMSCADE
TEMP. = 45° C.
SOLVENT: DHSO
TEMP. 45.0° C / 318.1 K
UNITYPLUS-600 "LEAMAS"
PULSE SEQUENCE
RELAX. DELAY ARRAYED
1st PULSE ARRAYED
2nd PULSE 32.4°
ACQ. TIME 3.000 SEC
WIDTH 8000.0 Hz
ARRAYED REPETITIONS
OBSERVE N1, 599.9030804 MHz
DATA PROCESSING
FT SIZE 65536
TOTAL TIME 5 MINUTES
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

图 3

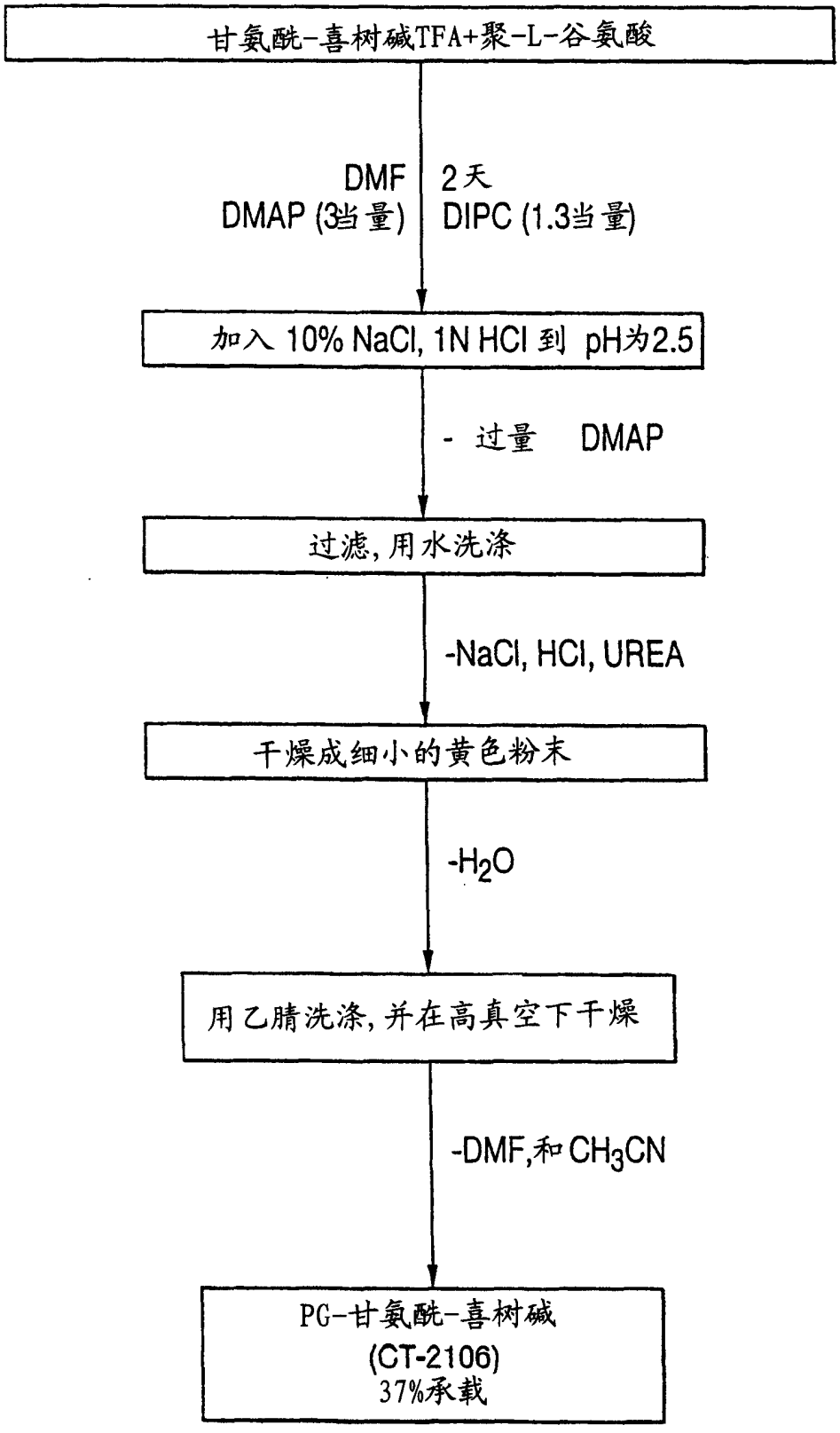
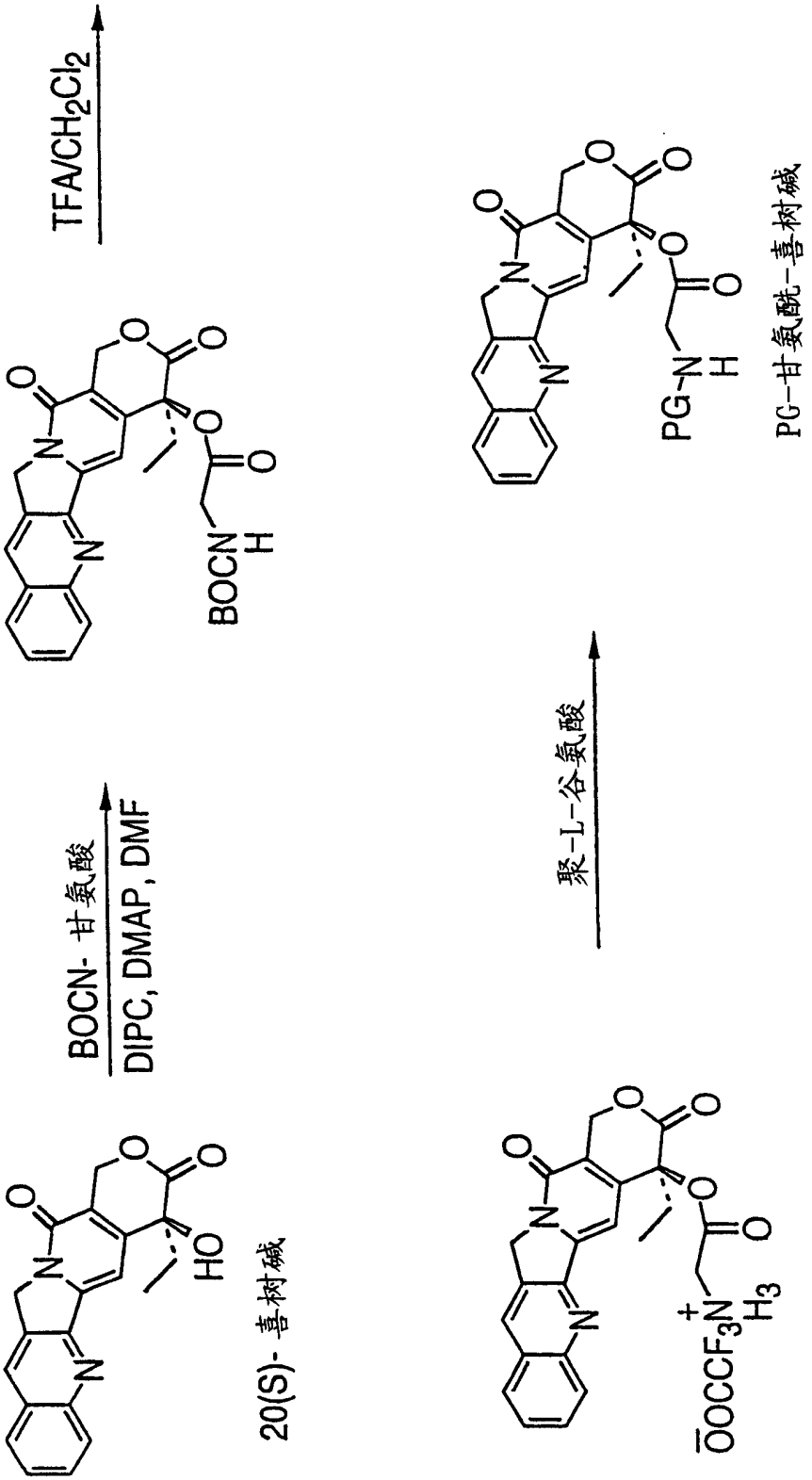
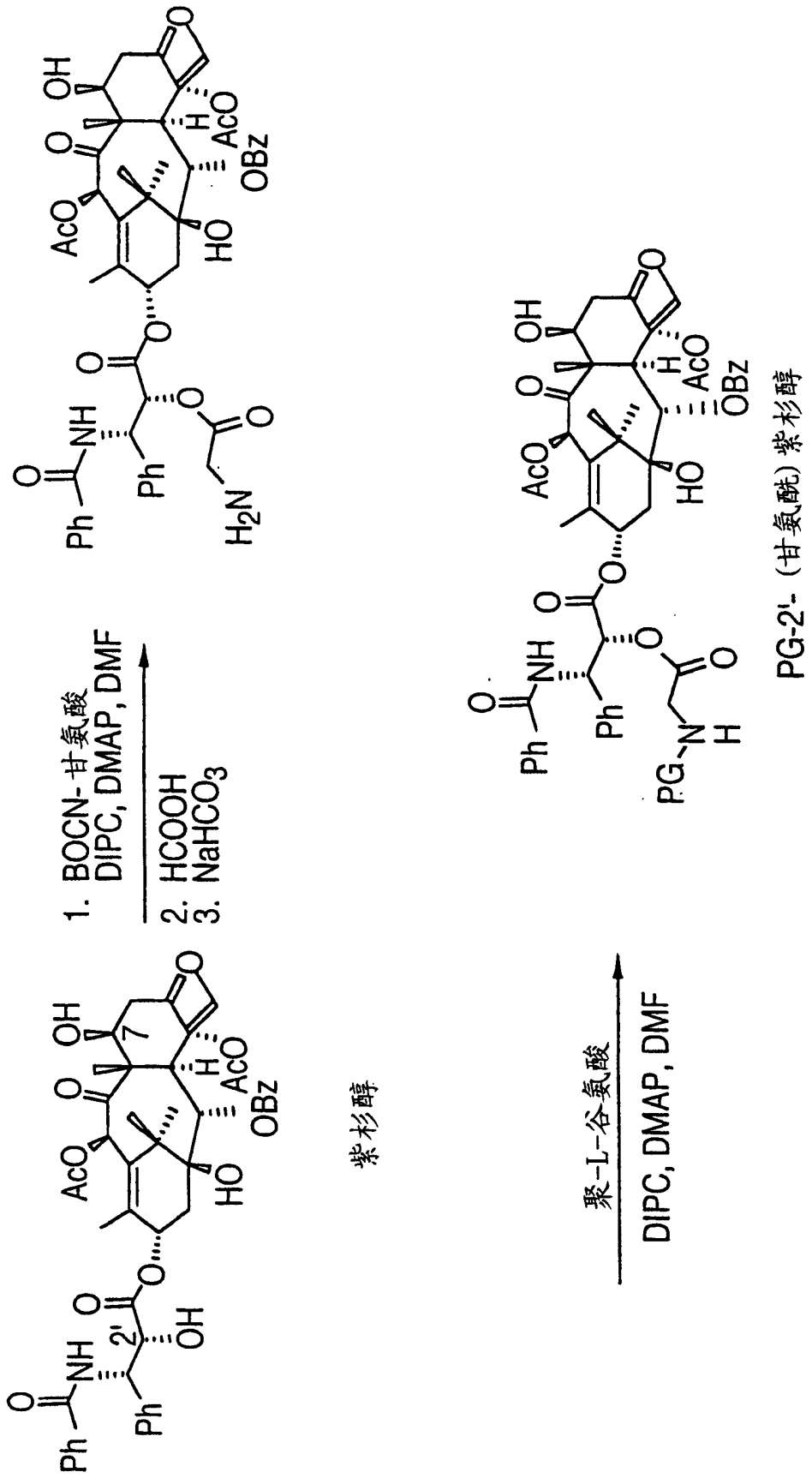

甘氨酰-喜树碱TFA+聚-L-谷氨酸
DMF
DMAP (3当量)
2天
DIPC (1.3当量)
加入 10% NaCl, 1N HCl 到 pH为2.5
- 过量 DMAP
过滤, 用水洗涤
-NaCl, HCl, UREA
干燥成细小的黄色粉末
-H_2O
用乙腈洗涤, 并在高真空下干燥
-DMF,和 CH_3CN
PG-甘氨酰-喜树碱
(CT-2106)
37%承载

图 4



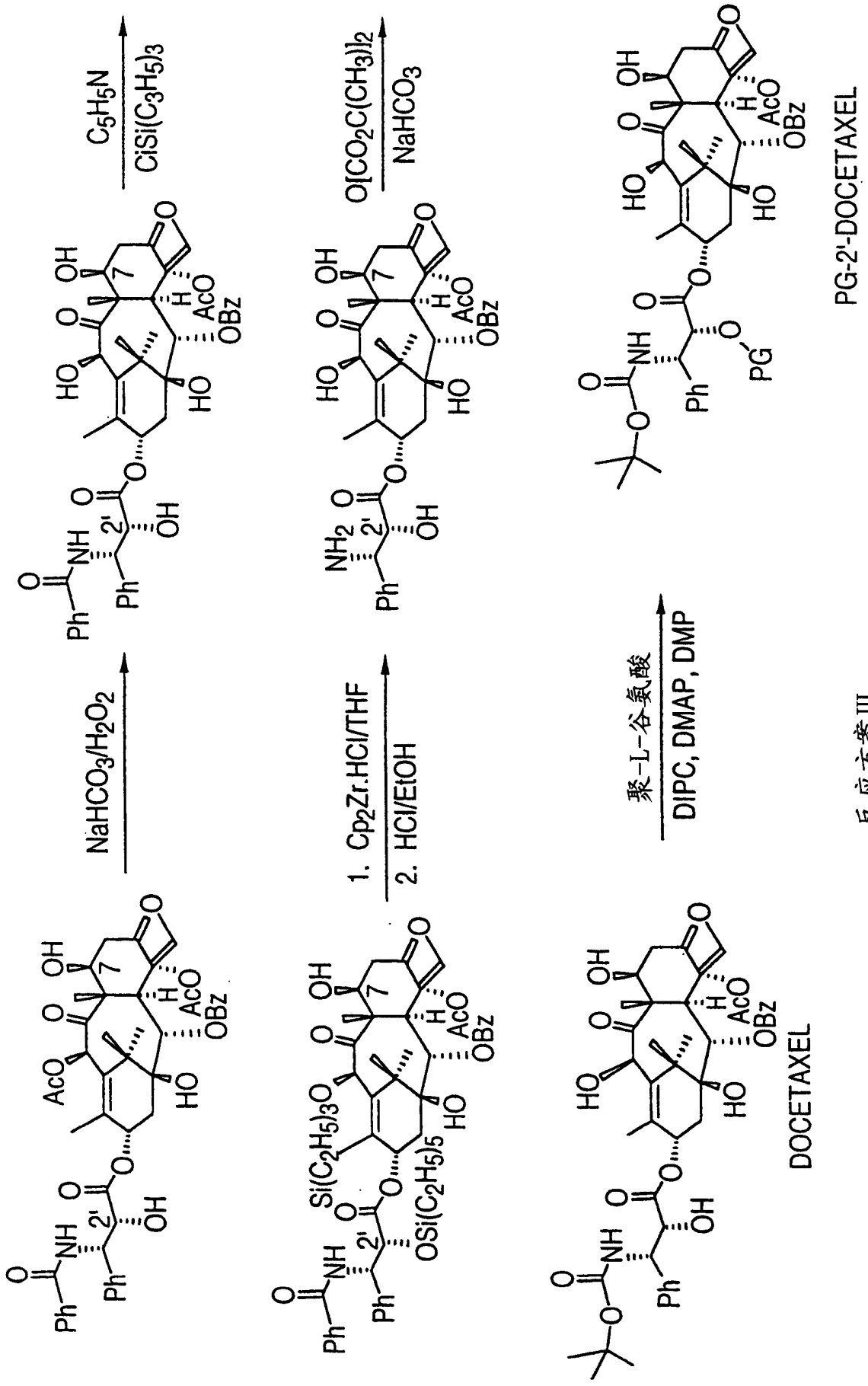
反应方案 I

图 5


1. BOCN-甘氨酸
DIPC, DMAP, DMF
2. HCOOH
3. NaHCO3
紫杉醇
聚-L-谷氨酸
DIPC, DMAP, DMF
PG-2'-(甘氨酰)紫杉醇

反应方案 II

图 6


NaHCO3/H2O2
C5H5N
ClSi(C3H5)3
1. Cp2Zr.HCl/THF
2. HCl/EtOH
O[CO2C(CH3)]2
NaHCO3
聚-L-谷氨酸
DIPC, DMAP, DMP
DOCETAXEL
PG-2'-DOCETAXEL

反应方案III

图 7