

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780032880.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C08G 69/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 8 月 19 日

[11] 公开号 CN 101511862A

[22] 申请日 2007.7.5

[21] 申请号 200780032880.9

[30] 优先权

[32] 2006.7.5 [33] US [31] 60/806,585

[86] 国际申请 PCT/US2007/072865 2007.7.5

[87] 国际公布 WO2008/006026 英 2008.1.10

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.5

[71] 申请人 莫门塔制药股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 马尼·S·艾耶 科琳·鲍尔

帕特·奥利弗-谢弗

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 陈 桢

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 2 页

[54] 发明名称

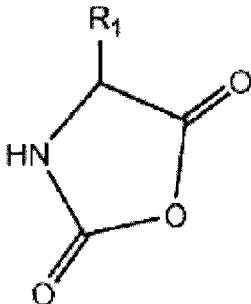
制备共聚物-1 的改进方法

[57] 摘要

本发明披露的主题提供了制备共聚物-1 的新方法。在一个实施方案中,用聚合引发剂处理 N-羧基环内酸酐(NCAs)的混合物以引发 N-羧基环内酸酐的混合物的聚合,以及由此合成受保护的共聚物-1,所述 N-羧基环内酸酐包含丙氨酸、受保护的谷氨酸、受保护的赖氨酸,以及酪氨酸,以及其中谷氨酸含有苄基或甲氧基保护基,赖氨酸含有环酰亚胺或 Boc 保护基。然后可用脱保护剂处理受保护的共聚物-1 和/或使受保护的共聚物-1 解聚,从而获得具有期望分子量的共聚物-1。

1. 制备共聚物-1 的方法, 所述方法包括:

(a) 使具有下式的 N-羧基环内酸酐的混合物与聚合引发剂反应以引发 N-羧基环内酸酐的混合物的聚合, 从而形成受保护的共聚物-1;



其中 R_1 包含选自丙氨酸、受保护的谷氨酸、受保护的赖氨酸, 以及酪氨酸中的一种或多种氨基酸; 以及其中所述受保护的谷氨酸含有苄基或甲氧基保护基, 以及所述受保护的赖氨酸含有环酰亚胺或叔丁氧基羰基保护基;

(b) 对受保护的谷氨酸进行脱保护;

(c) 对受保护的赖氨酸进行脱保护, 从而形成共聚物-1。

2. 权利要求 1 的方法, 所述方法还包括:

d) 在进行 N-羧基环内酸酐的混合物聚合的期间, 确定共聚物-1 的分子量至少一次; 以及

e) 当共聚物-1 的分子量具有预定值或在预定范围内时, 终止对 N-羧基环内酸酐的混合物的聚合。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合引发剂选自二乙胺、叔丁醇钾、NaH、KH、三乙胺、四甲基哌啶、二环己基胺、二环己基十一烷、二异丙基氨基锂、叔丁基锂, 以及上述物质的组合。

4. 权利要求 1 的方法, 其中对所述受保护的谷氨酸进行脱保护是在对所述受保护的赖氨酸进行脱保护之前进行的。

5. 权利要求 1 的方法, 其中通过用 NaOH 对所述受保护的共聚物-1 进行处理来对所述受保护的谷氨酸进行脱保护。

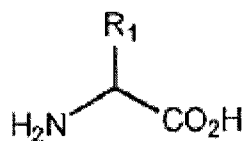
6. 权利要求 1 的方法, 其中通过用 HBr 的冰乙酸溶液对所述受保护的共聚物-1 进行处理来对所述受保护的赖氨酸进行脱保护。

7. 权利要求 1 的方法, 其中所述环酰亚胺选自邻苯二甲酰亚胺、N-四

氯邻苯二甲酰亚胺、4-硝基-N-邻苯二甲酰亚胺、N-二硫代琥珀酰亚胺、N-2,3-二苯基马来酰亚胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-2,5-二(三异丙基甲硅烷氧基)吡咯和N-1,1,4,4-四甲基二甲硅烷基氮杂环戊烷加成物。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述共聚物-1 包含摩尔比例分别为约 5-7:1-3:4-6:0.2-2.2 的丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸和酪氨酸。

9. 权利要求 1 的方法，其中 N-羧基环内酸酐的混合物如下制备：使光气或光气替代物与具有以下结构的多种氨基酸反应，

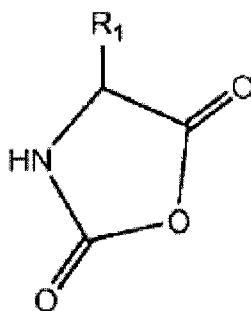


其中 R_1 包含选自丙氨酸、受保护的谷氨酸、受保护的赖氨酸，以及酪氨酸中的一种或多种氨基酸；以及其中所述受保护的谷氨酸含有苄基或甲氧基保护基，以及所述受保护的赖氨酸含有环酰亚胺或叔丁氧基羰基保护基。

10. 由权利要求 1 的方法制备的共聚物-1。

11. 选择性制备分子量在约 2 千道尔顿至约 25 千道尔顿之间的共聚物-1 的方法，所述方法包括：

(a) 使具有下式的 N-羧基环内酸酐的混合物与聚合引发剂反应以引发 N-羧基环内酸酐的混合物的聚合，从而形成受保护的共聚物-1；



其中 R_1 包含选自丙氨酸、受保护的谷氨酸、受保护的赖氨酸，以及酪氨酸中的一种或多种氨基酸；以及其中所述受保护的谷氨酸含有苄基或甲氧基保护基，以及赖氨酸含有环酰亚胺或叔丁氧基羰基保护基；

(b) 在进行 N-羧基环内酸酐的混合物聚合的期间，测量所述共聚物-1 的分子量至少一次；以及

(c) 当从步骤(b)中测量的共聚物-1 的分子量具有预定值或在预定范围内时，终止对 N-羧基环内酸酐的混合物的聚合，从而形成分子量在约 2 千道尔顿至约 25 千道尔顿之间的共聚物-1。

12. 权利要求 11 的方法，其中测量共聚物的分子量包括：移取步骤(c)的反应产物的等份试样，然后通过色谱法确定分子量。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述聚合物的分子量是原位测量的。

14. 权利要求 11 的方法，所述方法还包括从一种或多种所述受保护的谷氨酸和所述受保护的赖氨酸中脱除保护基。

15. 权利要求 11 的方法，其中共聚物-1 包含摩尔比例分别为约 6:2:5:1 的丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸和酪氨酸。

16. 权利要求 11 的方法，其中终止对 N-羧基环内酸酐的聚合包括：当从步骤(b)中测量的分子量在约 4 千道尔顿至约 16 千道尔顿之间时，终止聚合反应。

17. 权利要求 11 的方法，其中所述聚合引发剂包含一种或多种仲胺，所述仲胺选自二甲胺、二乙胺、二正丙胺、二异丙胺、N-乙基甲胺、二正丁胺、二异丁胺、二仲丁胺、二叔丁胺、二戊胺、二正辛胺、二-(2-乙基己基)-胺、二异壬胺、二烯丙胺、N-甲基苯胺、二苯胺、氮丙啶、吡咯、吡咯烷、咪唑、吡啶、哌啶、嘌呤，以及上述物质的组合。

18. 权利要求 11 的方法，其中所述受保护的谷氨酸含有甲氧基保护基，以及所述受保护的赖氨酸含有叔丁氧基羰基保护基。

19. 权利要求 18 的方法，所述方法还包括以下步骤：

d) 用碱对所述共聚物-1 进行处理，脱除谷氨酸的甲氧基保护基；以及

e) 用 HBr 的冰乙酸溶液对所述共聚物-1 进行处理，脱除赖氨酸的叔丁氧基羰基保护基。

20. 权利要求 11 的方法，其中所述受保护的谷氨酸含有苄基保护基，以及所述受保护的赖氨酸含有邻苯二甲酰亚胺保护基。

21. 权利要求 20 的方法，所述方法还包括以下步骤：

d) 对受保护的谷氨酸进行脱保护；以及

e) 对受保护的赖氨酸进行脱保护。

22. 权利要求 11 的方法，所述方法还包括对所述共聚物-1 进行纯化。

23. 权利要求 11 的方法，其中所述共聚物-1 的分子量如下确定：测量氨基甲酸酯、酰胺羰基或其组合的红外强度，然后将所测量的红外强度与将共聚物-1 的分子量描述为所测量的红外强度的函数的模型相关联。

制备共聚物-1的改进方法

技术领域

本发明披露的主题大体上涉及用于聚合氨基酸的方法。更具体而言，本发明披露的主题涉及制备共聚物-1的方法。

背景技术

共聚物-1(copolymer-1)是多肽的复杂混合物(complex mixture)，所述多肽是由对氨基酸，即谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸和酪氨酸进行聚合而制备的。共聚物-1也称为乙酸格拉默(glatiramer acetate, GA)，并且具有以下结构式：



乙酸格拉默是 COPAXONE® (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel) 的活性成份，其包含合成多肽的乙酸盐，所述合成多肽含有四种天然存在的氨基酸：L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-酪氨酸和 L-赖氨酸，这四种氨基酸所报道的平均摩尔分数(molar fraction)分别为 0.141、0.427、0.095 和 0.338。

乙酸格拉默用于治疗复发-缓解型多发性硬化(relapsing-remitting form of multiple sclerosis, RRMS)。

发明内容

本发明披露的主题提供了制备共聚物-1的方法。

在一个实施方案中，使 N-羧基环内酸酐(N-carboxyanhydrides, NCAs)的混合物与聚合引发剂接触以引发 N-羧基环内酸酐的混合物的聚合，从而形成受保护的共聚物-1，所述 N-羧基环内酸酐包含丙氨酸、受保护的谷氨酸、受保护的赖氨酸，以及酪氨酸，其中受保护的谷氨酸含有苄基或甲氧基保护基，以及受保护的赖氨酸含有环酰亚胺(cyclic imide)或叔丁氧基羰基(Boc)保护基。然后可用一种或多种脱保护剂处理受保护的共聚物-1，和/或对受保护的共聚物-1 进行解聚。在一个实施方案中，所述方法包括对受保护的谷氨酸和受保护的赖氨酸进行脱保护，从而生成共聚物-1。

在一些实施方案中,所述方法还包括:在进行 N-羧基环内酸酐混合物的聚合时,测量共聚物-1 的分子量。在聚合进行时测量分子量使得可以在共聚物-1 已经获得期望的分子量时终止聚合反应,或者在一些实施方案中,终止解聚反应(depolymerization reaction)。在一个实施方案中,可通过一种或多种联机方法(in-line method)、在线方法(on-line method)、离线方法(off-line method),以及所述方法的组合来确定分子量。在一个实施方案中,在聚合反应进行时可通过以下方式确定分子量:使用红外(IR)探针来测量反应混合物中氨基甲酸酯部分基的量(通过氨基甲酸酯部分的一种或多种特征性红外吸收带的强度确定)。然后可以使测量的氨基甲酸酯部分的量与模型(所述模型将分子量关联为反应混合物中存在的氨基甲酸酯部分的量的函数)相关联。在另一实施方案中,可在解聚反应期间测量酰胺羰基部分的量。可以使测量的酰胺羰基部分的量与模型(所述模型将分子量关联为反应混合物中存在的酰胺羰基部分的量的函数)相关联。

本发明披露的方法克服了可能与制备多肽如共聚物-1 的现有技术方法相关的许多问题。更具体而言,本发明披露的方法能够更有效,并且能够合成具有期望分子量的共聚物-1。

在上文中已经说明了本发明所披露主题的某些方面,这些方面可通过本发明披露的主题整体或部分地得到解决,并且随着本申请说明书的展开以及当与下文中最佳描述的实施例和附图结合时,其它方面将会变得明显。

附图说明

由于已概括地描述了本发明披露的主题,现在参照附图(附图未必是按比例绘制的),以及其中:

图 1 是描述用于制备共聚物-1 的本发明所披露方法的代表性非限制实施方案,其中谷氨酸用甲氧基保护基保护,以及赖氨酸用 Boc 保护基保护;以及

图 2 是描述用于制备共聚物-1 的本发明所披露方法的代表性非限制实施方案,其中谷氨酸用苄基保护基保护,以及赖氨酸用邻苯二甲酰基(phthaloyl)保护基保护。

具体实施方式

以下参照附图，更充分地描述本发明披露的主题，这些附图显示了本发明披露主题的一些实施方案，但并非所有的实施方案。受益于前述说明书和相关附图所表现出的教导，本发明披露主题所属领域的技术人员将会意识到对本申请列出的本发明披露主题进行各种修改和其它实施方案。因此，应该理解的是，本发明披露的主题并非局限于所披露的具体实施方案，并且修改和其它实施方案意图包括在所附权利要求的范围内。尽管本申请使用了具体的术语，但是它们仅用于一般意义和描述性意义，并非出于限制的目的。

当在本申请(包括权利要求书在内)使用术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“所述(the)”时，它们是指“一种或多种”或“一个或多个”。因此，例如当提及“试样”时，包括多个试样，除非上下文中有明确的相反指示(例如，多个试样)，等等。在本申请中引入所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献作为参考，所引用的程度就如同每篇出版物、专利申请、专利和其它参考文献被明确和单独地指示引入作为参考一样。应该理解的是，尽管本申请参考许多专利申请、专利和其它参考文献，这些参考并非构成了对任何这些文件形成了本领域的公知常识的一部分的认可。

在说明书全文中，当将组合物描述为具有(having)、包括(including)或包含(comprising)各种具体组分时，或者当将工艺或方法描述为具有、包括或包含特定步骤时，预期本发明披露主题的组合物还可基本上由所述组分组成，或者由所述组分组成，以及本发明披露主题的工艺或方法还可基本上由所述步骤组成，或者由所述步骤组成。此外，应该理解的是，只要本发明披露的主题保持是可操作的，各步骤的顺序或进行某些操作的顺序并非是最重要的。而且，就本发明披露的主题而言，可同时进行两步或多步步骤或操作。

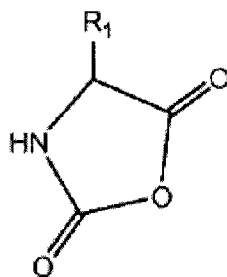
在一些实施方案中，本发明披露的主题提供了制备合成肽(synthetic polypeptide)如共聚物-1的方法，其中对具有受保护的氨基酸和未保护的氨基酸的N-羧基环内酸酐(NCAs)的混合物进行聚合，从而形成多肽。如本申请使用的“多肽”是指包含氨基酸残基的聚合物，所述氨基酸残基是通过酰胺键(通常称为肽键)结合在一起的。肽键是由氨基酸C末端上的羰基与另一个氨基酸N末端上的氨基之间的键形成的。当多个氨基酸使用这些肽键

结合时，它们形成了多肽。

多肽可包括由相同氨基酸、不同氨基酸，或相同氨基酸或不同氨基酸的组合而形成的聚合物。多肽可以具有氨基酸的随机排列，或氨基酸的有序排列。在一些实施方案中，多肽可以是仅由 L 氨基酸或 D 氨基酸组成的聚合物，或由一些任意比例的 L 氨基酸和 D 氨基酸的组合组成的聚合物。更具体而言，在一些实施方案中术语“多肽混合物”是指氨基酸共聚物的混合物，所述氨基酸包含 L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-酪氨酸和 L-赖氨酸，或这四种氨基酸的类似物或衍生物。

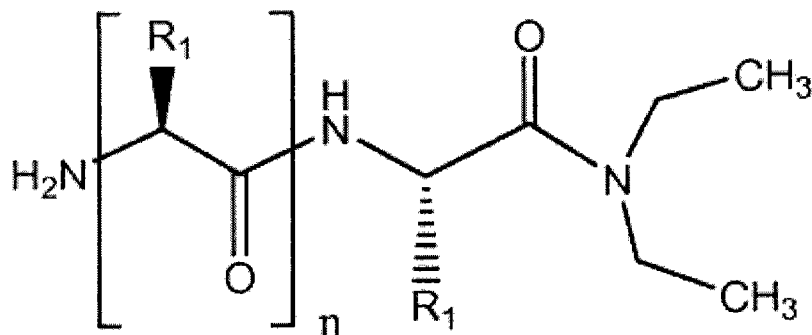
如本申请使用的，术语“共聚物”、“氨基酸共聚物”或“氨基酸共聚物制剂”是指由限定的多个不同氨基酸(通常为 2-10 个，例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个不同氨基酸，以及在一些实施方案中，为 3-6 个，例如 3、4、5 或 6 个不同氨基酸)组成的多肽的异质混合物(heterogenous mixture)。如本申请描述的，共聚物可由单独氨基酸的聚合来制备。术语“氨基酸”不限于天然存在的氨基酸，但是可包括氨基酸衍生物和/或氨基酸类似物。例如，在包含酪氨酸氨基酸的氨基酸共聚物中，所述氨基酸中的一个或多个可以是高酪氨酸(homotyrosine)。此外，在此定义中包括在两个相邻残基之间具有一个或多个非肽键或拟肽键(peptidomimetic bond)的氨基酸共聚物。就所述混合物中各种多肽的分子量而言，共聚物可以是不均一的。本发明披露主题的具体共聚物包含多肽的混合物，所述多肽包含丙氨酸(A)、谷氨酸(E)、赖氨酸(K)和酪氨酸(Y)。因此，在一个实施方案中，所述共聚物包含由氨基酸 Y、E、A 和 K 组成的多肽的混合物，并且也称为共聚物-1(Cop 1)或乙酸格拉默(GA)。

更具体而言，在一些实施方案中，本发明披露的主题提供了制备共聚物-1 的方法，所述方法包括使具有下式的 N-羧基环内酸酐(NCAs)的混合物与聚合引发剂接触以引发包含一种或多种氨基酸的 NCAs 的混合物的聚合，从而产生具有以下结构的共聚物-1:



NCAs 的结构式

其中 R_1 包含一种或多种选自丙氨酸、受保护的谷氨酸、受保护的赖氨酸，以及酪氨酸的氨基酸；



共聚物-1 的结构式

其中 R_1 如上文所定义，以及 n 为描述包含酰胺键的聚合物链的整数。

在随后的步骤中，可从受保护的谷氨酸和受保护的赖氨酸中除去保护基以产生共聚物-1。在一个实施方案中，本发明披露的方法可用于制备分子量在约 2 kDa 至约 40 kDa 之间的共聚物-1。在其它实施方案中，本发明披露的方法可用于制备具有分子量在约 2 kDa 至约 25 kDa 之间的共聚物-1；在一些实施方案中，分子量在约 4 kDa 至约 16 kDa 之间；在一些实施方案中，分子量在约 4 kDa 至约 9 kDa 之间；在一些实施方案中，分子量在约 4 kDa 至约 8 kDa 之间；在一些实施方案中，分子量在约 9 kDa 至约 12 kDa 之间；在一些实施方案中，分子量在约 10 kDa 至约 11 kDa 之间；以及在一些实施方案中，分子量在约 10 kDa 至约 12 kDa 之间。如本申请所使用的，短语“分子量”表示峰值平均分子量(peak average molecular weight, Mp)。可通过以下方式测量共聚物-1 的分子量：例如，凝胶渗透色谱法(GPC)，使用例如 SUPEROSE 12™ 或 SUPERDEX™ 柱，所述柱用蛋白质标准品、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)标准品，或本领域已知并且可得到的其它适当的标准品校准。也可通过本领域已知的其它计量法(metric)描述多肽的异质混合物如共聚物-1，所述的其它计量法包括但不限于重均分子量(weight average molecular weight, Mw)、数均分子量(number average molecular weight, Mn)、z-均分子量(z-average molecular weight, Mz)，以及所述多肽混合物的多分散性(polydispersity)。

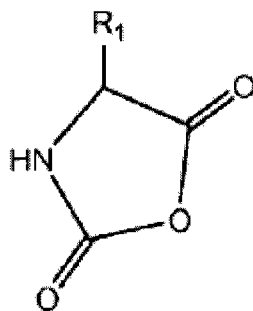
合适的聚合引发剂可包括例如碱、亲核试剂以及它们的组合。在一个实施方案中，聚合引发剂可包括一种或多种胺、醇、水，以及上述物质的

组合。在一个实施方案中，聚合引发剂包含一种或多种仲胺。合适的仲胺包括但不限于，二甲胺、二乙胺、二正丙胺、二异丙胺、N-乙基甲胺、二正丁胺、二异丁胺、二仲丁胺、二叔丁胺、二戊胺、二正辛胺、二-(2-乙基己基)-胺、二异壬胺、二烯丙胺、N-甲基苯胺、二苯胺、氮丙啶、吡咯、吡咯烷、咪唑、吡啶、哌啶、嘌呤，以及上述物质的组合。其它聚合引发剂可包括叔丁醇钾(K-tOBu)、NaH、KH、三乙胺(TEA)、四甲基哌啶、二环己基胺、二环己基十一烷(dicyclohexylundecane, DCU)、二异丙基氨基锂、叔丁基锂(t-BuLi)，以及上述物质的组合。

使聚合引发剂与 N-羧基环内酸酐的混合物接触，这使得氨基酸的延伸和共聚物-1 的合成开始。在一个实施方案中，当共聚物-1 的分子量在期望的范围内，如约 10 kDa 至约 12 kDa 时，可通过终止聚合反应来控制共聚物-1 的分子量。

在一个实施方案中，制备共聚物-1 的方法包括使 NCAs 的混合物与聚合引发剂接触，其中 NCAs 的混合物包括含有苄基或甲氧基(OMe)保护基的谷氨酸。在另一实施方案中，NCAs 的混合物包括含有环酰亚胺衍生物或叔丁氧基羰基(Boc)保护基的赖氨酸。适用于本发明披露方法的环酰亚胺衍生物包括但不限于邻苯二甲酰亚胺、N-四氯邻苯二甲酰亚胺、4-硝基-N-邻苯二甲酰亚胺、N-二硫代琥珀酰亚胺(N-dithiasuccinimide)、N-2,3-二苯基马来酰亚胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-2,5-二(三异丙基甲硅烷氧基)吡咯、N-1,1,4,4-四甲基二甲硅烷基氮杂环戊烷加成物等等。在一些实施方案中，所述赖氨酸保护基为邻苯二甲酰亚胺。

更具体而言，在一个实施方案中，可通过使具有以下结构的 N-羧基环内酸酐(NCAs)的混合物与聚合引发剂接触以形成受保护的共聚物-1，从而制备共聚物-1，



其中 R₁ 包含一种或多种选自丙氨酸、甲氧基-保护的谷氨酸、Boc-保护的赖氨酸的氨基酸。现参照图 1，提供了制备共聚物-1 的示例性多步骤反应

方案。在步骤(a)中,使 NCAs 的混合物与聚合引发剂如二乙胺接触,以形成受保护的共聚物-1 中间体 1。在此实施例中,谷氨酸用甲氧基保护,以及赖氨酸用 Boc 基保护。步骤(a)可在各种溶剂中进行,所述溶剂包括但不限于,例如四氢呋喃(THF)、二氯甲烷(DCM)、二氧杂环己烷、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基甲酰胺(DMF)和乙腈(ACN)。

在步骤(b)中,用脱保护剂如 NaOH 处理中间体 1,从而对甲氧基-保护的谷氨酸进行脱保护。然后可用酸如 HBr 将反应混合物中和,以产生中间体 2。在步骤(c)中,用 HBr/乙酸混合物处理中间体 2 以脱除赖氨酸的 Boc 保护基,由此产生共聚物-1,其标记为图 1 中的中间体 3。

然后可以使用已知方法(例如,冻干和/或透析(dialysis))纯化和表征所形成的共聚物-1,以产生共聚物-1 的盐。应该意识到,在一些实施方案中,步骤(b)和步骤(c)的顺序可以相反。例如,在一个实施方案中,可用 HBr 的冰乙酸溶液处理中间体 1,以脱除赖氨酸的 Boc 保护基,接着用碱如 NaOH 处理所形成的共聚物-1 中间体,以脱除谷氨酸的甲氧基保护基。

现参照图 2,以分步方式阐明了制备共聚物-1 的供选反应方案。在此实施方案中,谷氨酸用苄基保护,以及赖氨酸用邻苯二甲酰亚胺保护基保护。在步骤(a)中,使 NCAs 的混合物与聚合引发剂如二乙胺接触,以形成受保护的共聚物-1 中间体 1。聚合步骤即图 2 的步骤(a),可在各种溶剂中进行,所述溶剂包括但不限于,例如 THF、DCM、二氧杂环己烷、NMP、DMF 和 ACN。

现再次参照图 2,在步骤(b)中,用脱保护剂如 HBr 的冰乙酸溶液处理中间体 1,以便从受保护的谷氨酸中除去苄基保护基,从而形成中间体 2。在步骤(c)中,用从赖氨酸中除去邻苯二甲酰亚胺保护基的脱保护剂处理中间体 2,以产生未保护的共聚物-1。可用于除去邻苯二甲酰亚胺保护基的合适脱保护剂包括但不限于,胍、苯基胍、甲胺、丁胺、氢氧化钠、羟胺-甲醇钠和乙酸胍。可以使用已知方法(例如,冻干和/或透析)纯化和表征所形成的未保护的共聚物-1,以产生共聚物-1 的盐。

在一个实施方案中,将高纯度的酸用于制备共聚物-1 的方法中。在一个实施方案中,高纯度的酸包含少于 0.5% 的游离卤素和少于 1000 ppm 的金属离子杂质。

除去可能存在的任何保护基后,可进一步纯化共聚物-1。纯化共聚物-1

的合适方法可以包括但不限于, 透析, 真空干燥(vacuum desiccation), 冻干, 重结晶, 回流, 各种形式的色谱法, 析出法(precipitation methods), 升华法(sublimation methods), 过滤, 加成、萃取和熔体结晶(melt crystallization), 蒸发, 固/液分离, 离心, 柱分离法, 蒸馏, 共沸、萃取和蒸汽蒸馏, 离子交换法, 膜分离技术, 吸附分离方法(adsorption separation processes), 模拟移动床色谱法(simulated moving bed chromatography), 固/液萃取和沥滤(solid/liquid extraction and leaching), 液/液萃取和超临界流体萃取(supercritical fluid extraction), 以及所述方法的组合。

在一个实施方案中, 一旦将聚合反应淬灭, 可使用色谱法如 GPC 纯化反应的产物。GPC 柱可用例如 SUPERDEX™((获自 GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey) 或其等价物, 和 / 或 SUPEROSE™(GE Healthcare)或其等价物填充。

在 GPC 分离方法中可利用本领域通常使用的任何流动相, 包括水性溶剂和有机溶剂, 以及它们的任何组合。在一个非限制性实施方案中, 可将共聚物-1 溶于流动相中, 然后经过校准的填充 GPC 柱洗脱。蛋白质标准品、PMMA 标准品, 或本领域已知并且可用的其它适当标准品可用于校准 GPC 柱。检测器如紫外(UV)检测器可用于确定共聚物-1 何时洗脱经过柱。收集所洗脱的共聚物-1 的级份, 分子量可由洗脱时间确定。

可用于纯化根据本发明披露方法的共聚物-1 的其它纯化方法包括但不限于真空干燥; 冻干; 重结晶; 萃取、回流; 析出法; 升华法; 过滤; 加成、萃取和熔体结晶; 蒸发; 固/液分离; 离心; 柱分离法; 沉降法(sedimentation); 蒸馏; 共沸、萃取和蒸汽蒸馏; 离子交换法; 膜分离技术; 吸附分离方法; 模拟移动床色谱法; 固/液萃取和沥滤; 液/液萃取; 超临界流体萃取; 毛细管电泳(CE), 包括毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)、毛细管凝胶电泳(CGE)、毛细管等电聚焦(capillary isoelectric focusing, CIEF)、等速电泳(ITP)、电动色谱法(EKC)、毛细管胶束电动色谱法(MECC 或 MEKC)、微乳电动色谱法(MEEKC)、非水性毛细管电泳(NACE)和毛细管电色谱法(CEC); 凝胶电泳; 透析; HPLC; RP-HPLC; 亲合色谱法; 气相色谱法, 包括气-液色谱法、气-固色谱法、分配色谱法(partition chromatography)、吸附色谱法、薄层色谱法, 和超临界流体色谱法。一般而言, 上文刚刚披露的任何技术可单独使用或联用, 并且以任何顺序

使用,以纯化共聚物-1。

使聚合引发剂与 N-羧基环内酸酐混合物接触,这引发了氨基酸的延伸,由此开始共聚物-1 的合成。在一个实施方案中,当共聚物-1 的分子量在期望的范围内,如约 10 kDa 至约 12 kDa 时,可通过终止聚合反应来控制共聚物-1 的分子量。

因此,在一个实施方案中,本发明披露的制备共聚物-1 的方法可包括在进行聚合反应时测量共聚物产物的分子量。在所述实施方案中,在进行聚合反应时测量分子量可以在共聚物-1 已经达到期望的分子量时使反应停止。以这种方式,可以制备具有期望分子量范围的共聚物-1。因此,可以减少或在一些情况下消除对额外步骤(如解聚以获得期望的分子量)的需要。

在一个实施方案中,可通过在进行聚合反应时移取等份试样的共聚物来确定分子量。然后可用已知方法确定共聚物的分子量,所述的已知方法包括但不限于 GPC 和其它使用蛋白质标准品、PMMA 标准品或本领域已知并且可用的其它适当标准品来校准柱的色谱法、端基分析(end group analysis)、蒸汽相法(vapor phase methods)、沸点升高法(elevation of boiling points method)、沸点测定法(ebulliometry)、渗透压、使用 prinner-stabin 渗透仪(prinner-stabin osometer)、扩散和梯度法(diffusion and gradient methods)、光散射法、溶液粘度测定法(solution viscometry methods)、红外法(IR methods)和 X-射线法。

如本申请下文中进一步讨论的那样,在一些实施方案中,可通过将联机仪器(in-line instrument)如红外探针引入反应混合物中来确定分子量。联机仪器可用于在进行聚合反应时原位确定共聚物-1 的分子量。在进行反应时测量共聚物-1 的分子量,使得可以在共聚物-1 已经获得期望的分子量时终止反应。因此,可以在不使用将多肽中间体断裂为更小分子量片段的试剂如 HBr 的情况下,获得具有期望分子量的共聚物-1。

可通过许多本领域已知方法中的任何一种来终止聚合反应。例如,在一个实施方案中,可通过加入足够量的水来淬灭聚合反应,从而终止反应。在一些实施方案中,当共聚物-1 具有约 2 kDa 至约 40 kDa 之间的分子量时,可以终止聚合反应。聚合反应可以在以下情况时终止,在另一实施方案中,当共聚物-1 具有超过约 3 kDa 的分子量时;在一些实施方案中,当共聚物-1 具有超过约 4 kDa 的分子量时;在一些实施方案中,当共聚物-1 具有超过

约 5 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有超过约 6 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有超过约 7 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有超过约 8 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有超过约 9 kDa 的分子量时；以及在一些实施方案中，当共聚物-1 具有超过约 10 kDa 的分子量时。聚合反应可以在以下情况时终止，在另一实施方案中，当共聚物-1 具有少于约 25 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有少于约 20 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有少于约 15 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有少于约 14 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有少于约 13 kDa 的分子量时；在一些实施方案中，当共聚物-1 具有少于约 12 kDa 的分子量时；以及在一些实施方案中，当共聚物-1 具有少于约 11 kDa 的分子量时。在一个实施方案中，共聚物-1 的分子量在约 10 kDa 至约 12 kDa 之间。

在一些实施方案中，可以在进行聚合反应时，通过使用联机方法、在线方法、离线方法，以及所述方法的组合来确定共聚物-1 的分子量。如本申请使用的，术语“联机”是指在进行聚合反应时，通过将测量装置或探针直接引入反应容器中来测量共聚物-1 的分子量的方法。例如，在一个实施方案中，在聚合反应期间，可以通过将 IR 探针直接引入反应容器中来测量共聚物-1 的分子量。在一个实施方案中，IR 探针可以在聚合反应期间测量存在的氨基甲酸酯的量，例如通过特征性氨基甲酸酯 IR 吸收带的强度确定。通常地，氨基甲酸酯的量以及其 IR 吸收带的强度应该随着聚合反应的进展而降低。反应混合物中氨基甲酸酯的量的降低应该与共聚物-1 的分子量的增加成比例。可以将特征性氨基甲酸酯 IR 吸收带的强度的变化与模型(所述模型将分子量描述为混合物中存在的氨基甲酸酯的量的函数)相关联。利用该模型，可以在聚合反应期间的任一点确定共聚物-1 的分子量。

在其它实施方案中，可以在解聚期间使用 IR 探针测量存在的酰胺羰基部分的特征性红外吸收带的强度，所述吸收带的强度随着分子量降低而增加。也可将酰胺羰基 IR 强度与模型(所述模型将分子量描述为混合物中存在的酰胺羰基的量的函数)相关联。当共聚物-1 在期望的分子量范围内时，可使用所测量的强度来停止聚合反应或解聚反应。测量混合物中氨基甲酸酯部分和/或酰胺羰基部分的量(如浓度)的其它方法可以包括拉曼(Raman)、紫

外、其它振动技术以及类似的光谱分析技术。

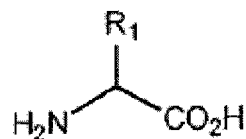
作为确定反应混合物中分子量的方法，除了测量混合物中存在的氨基甲酸酯部分和/或酰胺羰基部分的量之外，可使用其它方法将反应进展与共聚物的分子量相关联。所述的其它方法包括但不限于，粘度测量法、浊度测量法(turbidity measurements)、CO₂测量法、密度和热膨胀法(dilatometry)测量法、超声测量法、荧光光谱法、量热法等等。例如，在一个实施方案中，可将聚合反应期间生成的 CO₂ 的量与共聚物-1 的分子量相关联。在聚合反应期间，当消耗 NCAs 时，生成了 CO₂。在其它实施方案中，可将所测量的共聚物-1 的粘度和/或浊度与模型(所述模型将分子量描述为聚合物粘度和/或浊度的函数)相关联。

在其它实施方案中，可通过“离线”方法确定共聚物-1 的分子量。在离线方法中，在进行聚合反应时从反应容器中移取等份试样的聚合反应混合物。在等份试样中将反应淬灭，然后可以使用各种方法，如使用由蛋白质标准品、PMMA 标准品或本领域已知并且可用的其它适当标准品来校准的 GPC 柱等等来确定分子量。在一个实施方案中，此离线方法还可以包括在对分子量进行离线确定的时期中在反应器容器中使聚合反应减慢。例如，可通过使反应容器冷却至 0℃ 至 10℃ 之间的温度来减慢反应。

在另一实施方案中，可以在聚合反应期间“在线”确定分子量。在此实施方案中，反应容器可包括通道(channel)，可以使等份试样的反应混合物通过所述通道暂时在反应容器外循环以用于进行分子量确定，然后再引入反应容器中。例如，在一个实施方案中，反应器可包括具有两个或多个开口的通道，所述开口能够与反应容器的内部流体相通。所述开口可以包括能够阻止反应混合物从通道中进入(ingress)或流出(egress)的门(gate)或相似的装置，例如阀(valve)。在期望的时间，可以使所述门或阀中的一个打开以使得等份试样的反应混合物流入通道中。位于所述通道相对端的第二个门或阀可以保持在关闭的位置。然后可分析试样以确定反应混合物的分子量。然后通过打开第二个门或阀使等份试样返回至反应混合物中。在此实施方案中，可以使用如上文所讨论的涉及使用联机技术确定分子量的那些技术，包括但不限于 IR、拉曼、紫外光谱分析。在一些实施方案中，也可从反应容器中永久除去等份试样。

在一个供选的实施实施方案中，可通过以下方式制备 NCA 或 NCAs 的混合

物：使具有以下结构的一种或多种氨基酸与光气或光气替代物(surrogate)反应，



其中 R_1 如上文中所定义。合适的光气替代物包括但不限于双光气、三光气、羰基二咪唑、碳酸二琥珀酰亚胺基酯(disuccinimidyl carbonate)，以及上述物质的组合。

在一些实施方案中，可选择性控制多肽中存在的 D、L 立体异构体的比例。所形成的肽键的立体化学可被用于合成多肽的氨基酸的立体化学控制。相反地，具有环结构的活化的氨基酸能够生成右旋(D)和左旋(L)立体异构体的混合物。在一个实施方案中，多肽可包含约 80%至约 100%的 L 对映异构体，以及约 0%至约 20%的 D 对映异构体。在另一实施方案中，多肽可包含大于约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的 L 对映异构体。在另一实施方案中，多肽可含有少于约 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%的 L 对映异构体。

在另一非限制性实施方案中，共聚物-1 可包含合成多肽的乙酸盐，所述合成多肽含有四种天然存在的氨基酸：L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-酪氨酸和 L-赖氨酸，这四种氨基酸的平均摩尔分数分别为约 0.141、0.427、0.095 和 0.338。共聚物-1 的分子量可以在约 4,700 至约 11,000 道尔顿之间。在一个实施方案中，共聚物-1 的化学式为 L-谷氨酸与 L-丙氨酸、L-赖氨酸和 L-酪氨酸的聚合物乙酸盐。其结构式可表示为： $(\text{Glu, Ala, Lys, Tyr})_x \text{XCH}_3\text{COOH}$ 或 $[(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \text{ C}_3\text{H}_7\text{NO}_2 \text{ C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \text{ C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3)_x \text{XC}_2\text{H}_4\text{O}_2$ 。

在另一非限制性实施方案中，可将共聚物-1 加到可药用赋形剂中，并且可将共聚物-1 配制成含有约 50 mg 至约 10 mg 乙酸格拉默以及约 100 mg 至约 10 mg 甘露醇的白色至灰白色灭菌冻干粉末。在另一实施方案中，可将共聚物-1 加到可药用赋形剂中，并且可将共聚物-1 配制成含有约 20 mg 乙酸格拉默以及约 40 mg 甘露醇的白色至灰白色灭菌冻干粉末。在一个实施方案中，可将共聚物-1 与可药用赋形剂一起提供于单次使用或多次使用的小瓶中，并且可在用所提供的任何稀释剂如灭菌注射用水稀释后，使用皮下给药的方式给药。

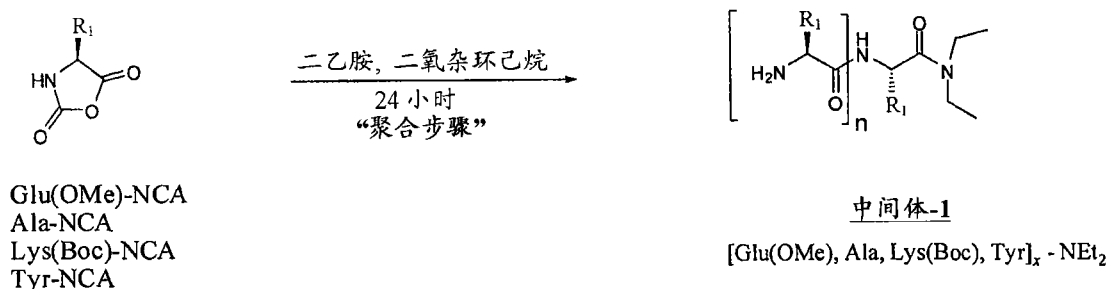
实施例

以下实施例已经包括在本发明中，从而对本领域普通技术人员提供指导，用于实践本发明披露主题的代表性实施方案。鉴于本发明所披露的内容和本领域技术人员的一般水平，本领域的技术人员可以理解的是，以下实施例的目的仅为示例性的，并且可以在不偏离本发明披露主题的范围的情况下，使用多种变化、修改和变更。因此，以下所提供的实施例是为了示例性的，而不是为了限制性的。

实施例 1

使用甲氧基-保护的谷氨酸和 Boc-保护的赖氨酸制备共聚物-1

步骤(a): 现在参照方案 1，在第一步中，将酪氨酸(3 g, 14.5 mmol, 1.0 当量)、丙氨酸(8.3 g, 72.1 mmol, 5.0 当量)、 γ -甲氧基谷氨酸(Glu(OMe))(5.8 g, 22.2 mmol, 1.5 当量)、 ϵ -N-Boc-赖氨酸(13.8 g, 51.5 mmol, 3.6 当量)的 N-羧基环内酸酐的混合物在氮气流(低速)下装入 1.0-L 带夹套的烧瓶(jacketed flask)中。所述烧瓶包括机械搅拌器和温度探针。然后将 583.3 mL 二氧杂环己烷加到烧瓶中。将反应混合物搅拌 30 分钟，然后使用移液管将 116 μ L (1.1 mmol, 0.08 当量)二乙胺(聚合引发剂)加到烧瓶中。在第一个小时的期间内反应混合物变得粘稠并非常混浊。

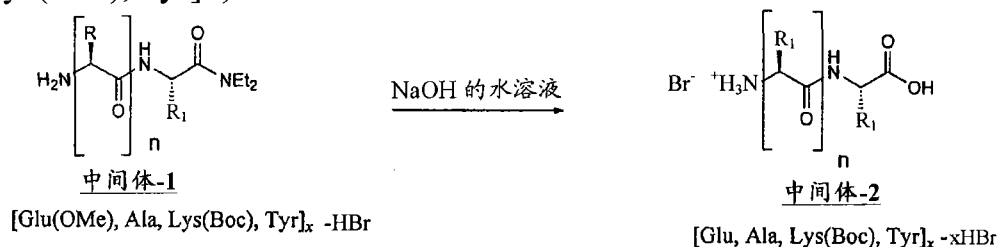


方案 1. NCAs 的混合物的聚合以形成受保护的共聚物-1

约 24 小时后，将反应混合物如下淬灭：在剧烈搅拌下将混合物倒入含有水(1.58 L)的第二个烧瓶(3.0 L)中。形成白色固体。沉淀经真空过滤分离，并用水(6 x 250 mL)洗涤，然后在真空干燥箱中干燥过夜至恒定的重量，获得中间体 1。

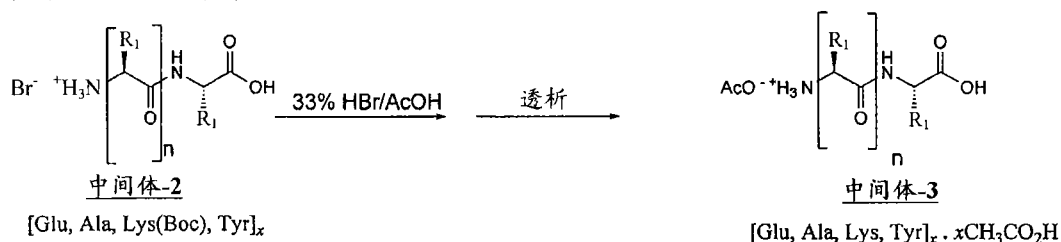
步骤(b): 现在参照方案 2，在以下步骤中，通过用 NaOH 处理中间体 1 将甲氧基保护基从受保护的谷氨酸中除去。在此步骤中，将 1.8 g 中间体

1 装入 250-mL 烧瓶中。将 1M 氢氧化钠水溶液加到烧瓶中，然后在 4℃ 至 15℃ 的温度搅拌 24 小时。反应结束后，使用 HBr 水溶液将反应混合物中和至 pH = 7。对固体进行过滤，然后在真空干燥箱中干燥，获得中间体 2 ([Glu, Ala, Lys(Boc), Tyr]_x)。



方案 2. 对甲氧基-保护的谷氨酸脱保护

步骤(c): 现在参照方案 3，在此步骤中，将 22 g 中间体 2 装入具有机械搅拌器的 500-mL 带夹套的烧瓶中。向其中加入 177.2 mL 33% HBr 的冰乙酸溶液，然后在约 20℃ 的温度搅拌约 20 至 30 小时。将形成的反应混合物透析并冻干，获得中间体 3，其为白色至灰白色固体。



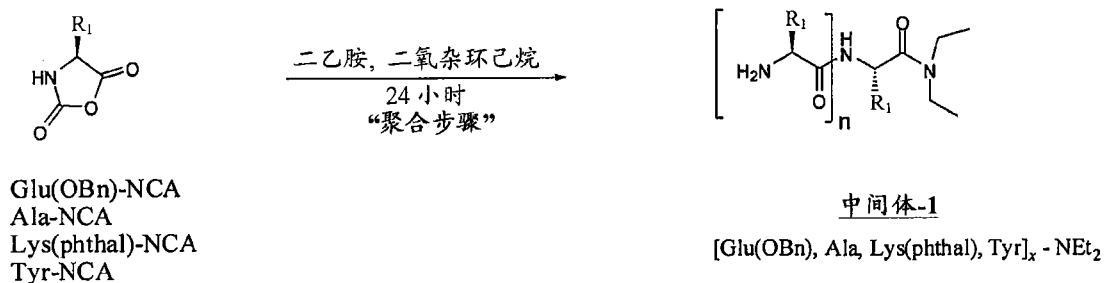
方案 3. 对 Boc-保护的赖氨酸脱保护及对所形成的共聚物-1 纯化

实施例 2

使用苄基-保护的谷氨酸和邻苯二甲酰基-保护的赖氨酸制备共聚物-1

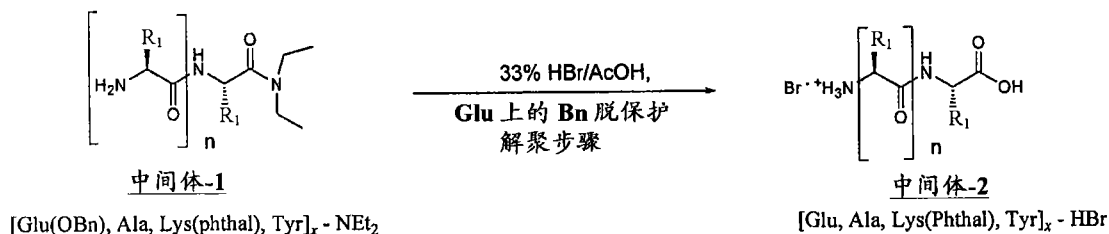
现在参照方案 4，在低速氮气流下，将酪氨酸(3 g, 14.5 mmol, 1.0 当量)、丙氨酸(8.3 g, 72.1 mmol, 5.0 当量)、γ-苄基-谷氨酸 (Glu(OBn)) (5.8 g, 22.2 mmol, 1.5 当量)、ε-N-邻苯二甲酰基-赖氨酸(Lys(phthal))(13.8 g, 51.5 mmol, 3.6 当量)的 N-羧基环内酸酐的混合物装入 1.0-L 带夹套的烧瓶中。所述烧瓶包括机械搅拌器和温度探针。然后将 583.3 mL 二氧杂环己烷加到烧瓶中。将反应混合物搅拌 30 分钟，然后使用移液管将 116 μL (1.1 mmol, 0.08 当量) 二乙胺(聚合引发剂)加到烧瓶中。在第一个小时的期间内反应混合物变得粘稠并非常混浊。约 24 小时后，将反应混合物如下淬灭：在剧烈搅拌下将其

倒入含有水(1.58 L)的另一个烧瓶(3.0 L)中。形成白色固体。沉淀经真空过滤分离,然后用水(6 x 250 mL)洗涤。将形成的产物在真空干燥箱中干燥过夜至恒定的重量,获得中间体 1。



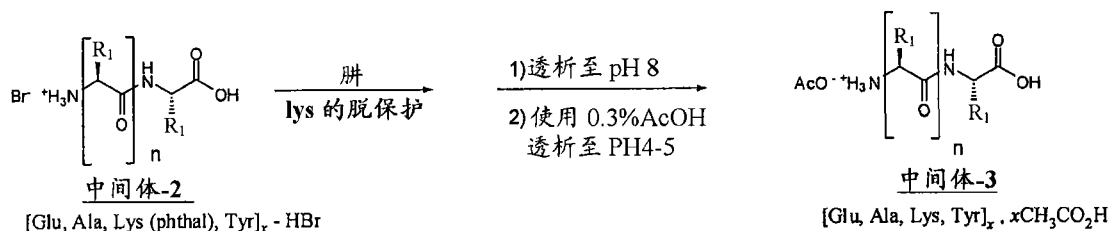
方案 4. 形成共聚物-1 的聚合步骤

现在参照方案 5, 将 22 g 中间体 1 装入具有机械搅拌器的 500-mL 带夹套的烧瓶中。向此混合物中加入 177.2 mL 33% 的 HBr 的冰乙酸溶液, 然后在约 20℃ 的温度搅拌约 20 至 30 小时。将反应如下淬灭: 将反应混合物转移至含有 660 mL 水的烧瓶(用机械搅拌器搅拌)中。将固体真空过滤, 然后用 3 x 40 水和 3 x 40 mL 二异丙醚洗涤。将固体在真空干燥箱(在 37℃)中干燥, 获得中间体 2, 其为白色固体。



方案 5. 对苄基-保护的谷氨酸脱保护

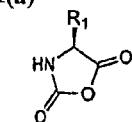
现在参照方案 6, 将 1.8 g 中间体 2 加到 250-mL 烧瓶中。向其中加入胍溶液。将混合物搅拌 15-24 小时之间的一段时间。对反应混合物进行过滤以脱除任何微细的不可溶物质, 然后使滤液经过超滤器(首先使用含有循环水的 1 KD 膜, 直到观测到渗透液中 pH 为 8, 然后用 0.3% 乙酸/水循环, 至保留液中 pH 为 5.5-6.0)。然后将溶液冻干, 获得中间体 3, 其为白色至灰白色固体。



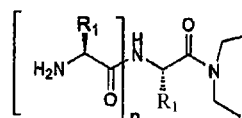
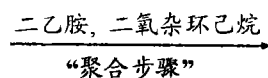
方案 6. 对邻苯二甲酰基-保护的赖氨酸的保护及对共聚物-1 的纯化

受益于前述说明书和相关附图中提出的教导，本发明披露主题所属领域的技术人员会意识到对本申请列出的本发明披露主题的许多修改和其它实施方案。因此，应该理解的是，本发明披露的主题并非局限于所披露的具体实施方案，以及修改和其它实施方案意图包括在所附权利要求的范围内。

步骤(a)

R₁

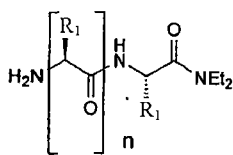
Glu(OMe)-NCA
Ala-NCA
Lys(Boc)-NCA
Tyr-NCA



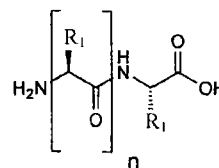
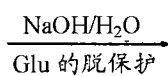
中间体-1

[Glu(OMe), Ala, Lys(Boc), Tyr]_x - NEt₂

步骤(b)



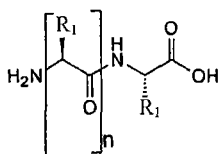
中间体-1

[Glu(OMe), Ala, Lys(Boc), Tyr]_x

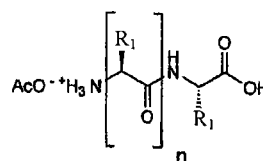
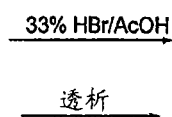
中间体-2

[Glu, Ala, Lys(Boc), Tyr]_x - NEt₂

步骤(c)



中间体-2

[Glu, Ala, Lys(Boc), Tyr]_x

中间体-3

[Glu, Ala, Lys, Tyr]_x · xCH₃CO₂H

图 1

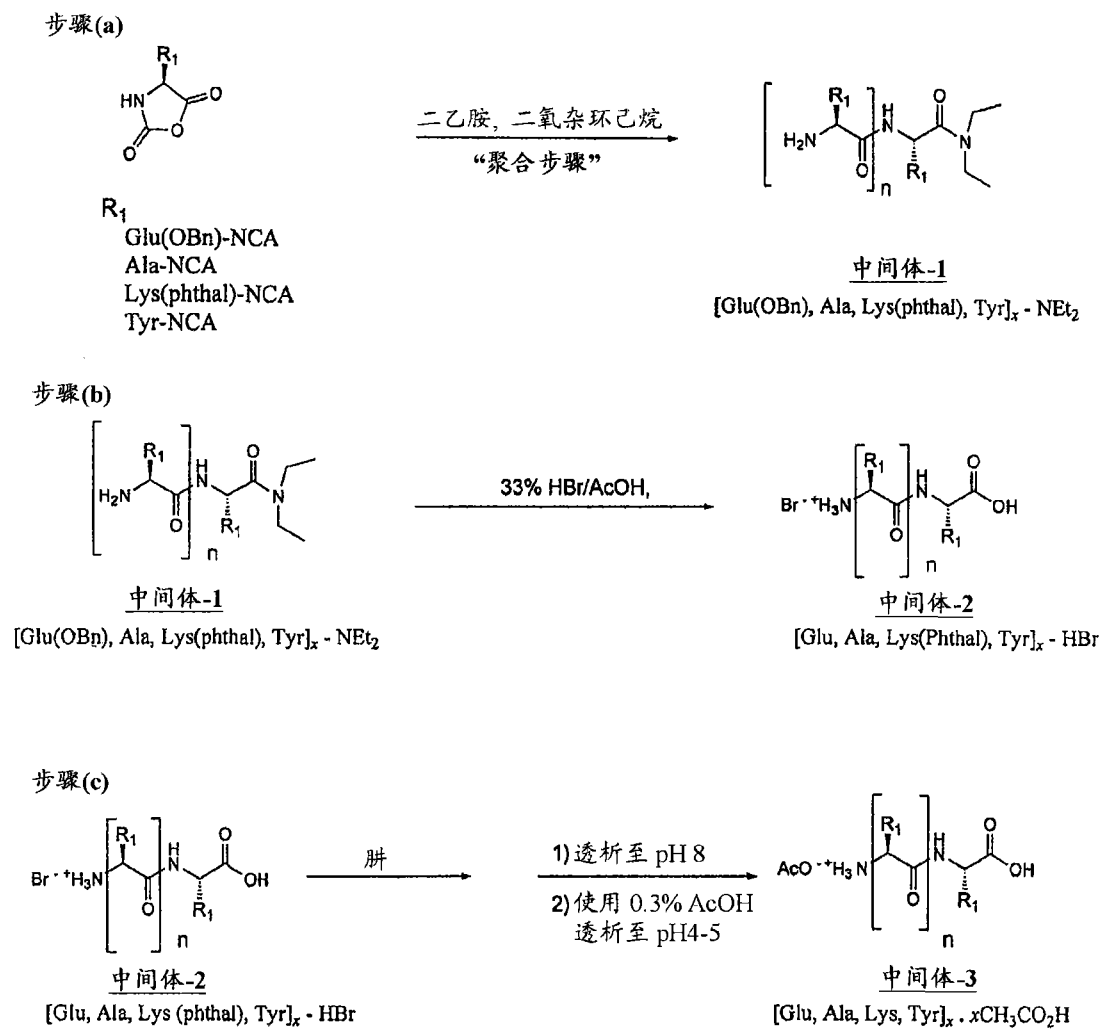


图 2