



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 15 145 T2** 2008.04.30

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 496 076 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 15 145.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CN03/00179**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 709 581.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/076490**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.03.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.09.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.07.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.04.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C08G 65/00** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
PCT/CN02/00147 13.03.2002 WO

(73) Patentinhaber:
Beijing Jiankai Technology Co., Ltd., Beijing, CN

(74) Vertreter:
TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR

(72) Erfinder:
Ji, Shishan, 100084 Beijing, CN; ZHU, Dequan,
100084 Beijing, CN

(54) Bezeichnung: **HYDROPHILES POLYMERDERIVAT MIT Y-VERZWEIGUNG UND HERSTELLUNGSVERFAHREN DAFÜR; OBIGE VERBINDUNG ENTHALTENDER MEDIZINISCHER VERBUNDWERKSTOFF**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIETE DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Y-förmige verzweigte hydrophile Polymer-Derivate, ihre Herstellungsverfahren und Konjugate der Derivate und Arzneimittelmoleküle, insbesondere Proteine und Polypeptide. Diese Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Konjugate umfassen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Natürliche und rekombinante Proteine und Polypeptide sind als Arzneistoffe verwendet worden. Die Produkte nach Reinigung und Trennung können verwendet werden, um spezifische Krankheiten durch parenterale Wege zu behandeln. Wenn parenteral verabreicht, können Proteine jedoch Immunogenität aufweisen oder relativ unlöslich in Wasser sein oder kurze pharmakologische Halbwertszeiten aufweisen. Wie eine hochwirksame Serumkonzentration in vivo zu erreichen und zu halten ist, ist von signifikanter Wichtigkeit.

[0003] Zusätzlich zu Proteinen ist es klinisch notwendig, andere Bestandteile der natürlichen Arzneistoffe, wie beispielsweise Flavonoide, Terpenoide, Anthrachinone, Steroide und Alkaloide, zu modifizieren, um ihre physiologischen Halbwertszeiten zu verlängern, ihre Stabilität und die Möglichkeit zu verbessern, ihre Zielstelle zu erreichen, ihre Löslichkeit in Wasser zu erhöhen, Verabreichungswege zu ändern und die biologische Verfügbarkeit zu verbessern.

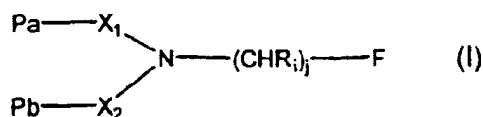
[0004] Unlängst ist PEG weitgehend verwendet worden, um mit Proteinen, Peptiden oder anderen therapeutischen Wirkstoffen zu konjugieren, um ihre physiologischen Halbwertszeiten zu verlängern und ihre Immunogenität und Toxizität zu verringern. Klinisch sind PEG und seine Derivate weitgehend als Träger bei der Herstellung von pharmazeutischen Präparaten aus kommerziellen Arzneimitteln verwendet worden. Die Verfahren zum Konjugieren von PEG mit Arzneimittelmolekülen sind in den letzten 10 Jahren sehr weit fortgeschritten und sind auf viele offiziell zugelassene Arzneimittel angewendet worden. Zum Beispiel zeigt, PEG-intron®, ein Konjugat von PEG mit α -Interferon, eine längere Kreislaufhalbwertszeit und einen besseren therapeutischen Effekt. Das Konjugat von PEG mit Aktivität. Der Metabolismus von PEG ist wohl bekannt, und PEG ist als ein sicheres Arzneimittelformulierungsmittel angenommen.

[0005] Eine PEGylierung genanntes Verfahren wird oft beim Konjugieren von PEG mit Arzneimitteln angewendet. Eine oder zwei der terminalen Gruppen des PEG werden nämlich aktiviert, um eine richtige funktionelle Gruppe zu bilden, die zu mindestens einer funktionellen Gruppe der Arzneimittel reaktiv ist und eine stabile Bindung mit ihr bilden kann.

[0006] Viele PEG-Derivate sind berichtet worden. Lineare PEG-Propionsäure, -Butansäure und ihre NHS-Ester sind in US Patent Nr. 5672662 berichtet worden. Kürzlich ist ein U-förmiges verzweigtes PEG in US Patent Nr. 5643575 berichtet worden. In diesen PEG-Derivaten sind zwei lineare PEGs mit einem Molekül oder einer Struktur durch zwei identische funktionelle Gruppen, wie beispielsweise zwei Aminogruppen oder zwei Carboxylgruppen, verbunden. In einem Beispiel des Patents ist das verzweigte PEG von linearem PEG und Lysin abgeleitet, welches eine Aminosäurenart ist, die zwei Aminogruppen aufweist.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt ein Y-förmiges verzweigtes hydrophiles Polymer-Derivat bereit, welches durch die Formel I dargestellt ist:



worin

P_a und P_b hydrophile Polymere darstellen, die identisch oder unterschiedlich sind;

j eine ganze Zahl von 1 bis 12 darstellt;

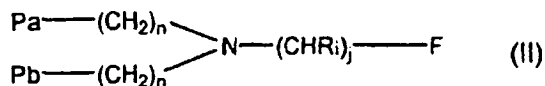
R_i ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, einem C_{1-12} -substituierten oder unsubstituierten Alkyl, einem substituierten Aryl, einem Aalkyl und einem Heteroalkyl;

X_1 und X_2 unabhängig voneinander Verbindungsgruppen sind, worin X_1 $(\text{CH}_2)_n$ darstellt und X_2 ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{OCO}$, $(\text{CH}_2)_n\text{NHCO}$ und $(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, worin n eine ganze Zahl von

1 bis 10 ist; und

F eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Hydroxylgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Estergruppe, Carbonsäurechlorid, Hydrazid, Maleimid und Pyridindisulfid, die zu einer Reaktion mit einer Aminogruppe, einer Hydroxylgruppe oder einer Thiolgruppe eines therapeutischen Wirkstoffs oder eines Substrats unter Bildung einer kovalenten Bindung in der Lage sind.

[0008] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Y-förmiges verzweigtes Poly(ethylenglykol)-Derivat bereitgestellt, welches durch die Formel II dargestellt ist:



worin

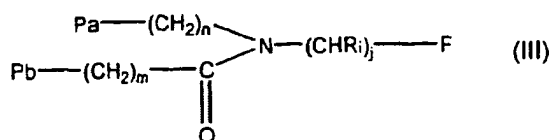
P_a und P_b Polyethylenglykole sind, die identisch oder unterschiedlich sind;

n und j unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 1 bis 12 darstellen;

R_i ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, einem C₁₋₁₂-substituierten oder unsubstituierten Alkyl, einem substituierten Aryl, einem Aralkyl und einem Heteroalkyl; und

F eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Hydroxylgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Estergruppe, Carbonsäurechlorid, Hydrazid, Maleimid und Pyridindisulfid, die zu einer Reaktion mit einer Aminogruppe, einer Hydroxylgruppe oder einer Thiolgruppe eines therapeutischen Wirkstoffs oder eines Substrats unter Bildung einer kovalenten Bindung in der Lage sind.

[0009] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Y-förmiges verzweigtes Poly(ethylenglykol)-Derivat bereitgestellt, welches durch die Formel III dargestellt ist:



worin

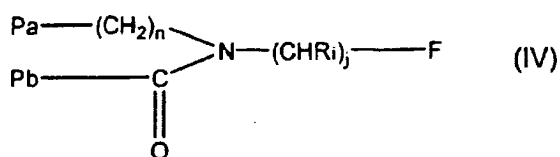
P_a und P_b Polyethylenglykole sind, die identisch oder unterschiedlich sind;

n, m und j unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 1 bis 12 darstellen;

R_i ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, einem C₁₋₁₂-substituierten oder unsubstituierten Alkyl, einem substituierten Aryl, einem Aralkyl und einem Heteroalkyl; und

F eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Hydroxylgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Estergruppe, Carbonsäurechlorid, Hydrazid, Maleimid und Pyridindisulfid, die zu einer Reaktion mit einer Aminogruppe, einer Hydroxylgruppe oder einer Thiolgruppe eines therapeutischen Wirkstoffs oder eines Substrats unter Bildung einer kovalenten Bindung in der Lage sind.

[0010] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Y-förmiges verzweigtes Poly(ethylenglykol)-Derivat bereitgestellt, welches durch die Formel IV dargestellt ist:



worin

P_a und P_b Polyethylenglykole sind, die identisch oder unterschiedlich sind;

n und j unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 1 bis 12 darstellen;

R_i ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, einem C₁₋₁₂-substituierten oder unsubstituierten Alkyl, einem substituierten Aryl, einem Aralkyl und einem Heteroalkyl; und

F eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Hydroxylgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Estergruppe, Carbonsäurechlorid, Hydrazid, Maleimid und Pyridindisulfid, die zu einer Reaktion mit einer Aminogruppe, einer Hydroxylgruppe oder einer Thiolgruppe eines therapeutischen Wirkstoffs oder eines Substrats unter Bildung einer kovalenten Bindung in der Lage sind.

[0011] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung des PEG-Derivats der Formel II bereitgestellt, umfassend:

Initiieren der Polymerisation von Ethylenoxid mit N,N-Di-2-hydroxyethyl-2-benzyloxyethylamin bei 0°C in Ge-

genwart eines Katalysators;
 Alkylieren der terminalen Hydroxylgruppen;
 Entfernen der Benzylgruppen durch katalytische Hydrierung; und
 Derivatisieren der neuen Hydroxylgruppe unter Einfügen der terminalen Gruppe F.

[0012] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung der PEG-Derivate der Formeln (III) und (IV) bereitgestellt, umfassend:

Umsetzung eines Methoxypolyethylenglykolmesylats mit einer Aminosäure unter basischen Bedingungen; und

Umsetzung des oben erhaltenen Produkts mit einem weiteren Methoxypolyethylenglykol-Derivat und weitere Derivatisierung zur Einfügung einer terminalen Gruppe F.

[0013] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der Erfindung werden Konjugate der vorstehenden Polymer-Derivate und Arzneimittelmoleküle durch die funktionale Gruppe F bereitgestellt.

[0014] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der Erfindung werden pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die die vorstehenden Konjugate umfassen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0015] [Fig. 1](#) zeigt die Synthese von Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten (1).

[0016] [Fig. 2](#) zeigt die Synthese von Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten (2) und (7).

[0017] [Fig. 3](#) zeigt die Synthese von Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten (5).

[0018] [Fig. 4](#) zeigt die Synthese von Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten (6).

[0019] [Fig. 5](#) zeigt die Synthese von Konjugaten aus Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten (1) und Arzneimitteln (durch Esterbindungen).

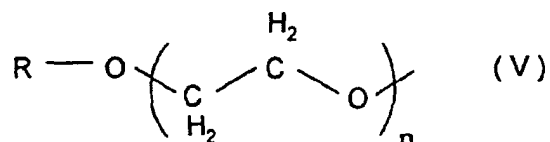
[0020] [Fig. 6](#) zeigt die Synthese von Konjugaten aus Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten und Arzneimitteln (durch andere Bindungen).

[0021] [Fig. 7](#) zeigt die Synthese von Konjugaten aus Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten und Proteinen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0022] In der vorliegenden Erfindung ist das hydrophile Polymer, zum Beispiel, ein Polyethylenglykol, ein Polypropylenglykol, ein Polyvinylalkohol, ein Polyacrylmorpholin oder ein Copolymer davon, besonders bevorzugt sind Polyethylenglykol und Copolymere davon.

[0023] In den PEG-Derivaten der Formeln (II) bis (IV) der vorliegenden Erfindung können Pa und Pb identisch oder unterschiedlich sein und können das durch die folgende Formel (V) dargestellte PEG sein:



worin

R H, ein C1-12 Alkyl, Cycloalkyl oder Aralkyl darstellt; und

n eine ganze Zahl darstellt, die den Polymerisationsgrad angibt, bevorzugt ein Molekulargewicht vom PEG erzeugend, das von 300 bis 60000 reicht.

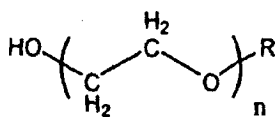
[0024] In Formel (V) stellt R bevorzugt H, Methyl, Ethyl, Isopropyl, Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclohexyl oder Benzyl dar.

[0025] Die Y-förmigen verzweigten hydrophilen Polymer-Derivate der vorliegenden Erfindung werden bevor-

zugt durch Anhängen von zwei linearen PEG-Ketten an eine Aminogruppe eines kleinen Moleküls hergestellt.

[0026] PEG wird hier als ein Beispiel verwendet, um die Herstellung von Y-förmigen verzweigten hydrophilen Polymer-Derivaten der vorliegenden Erfindung zu veranschaulichen.

[0027] Die allgemeine Struktur von PEG ist wie in der nachstehenden Formel:



worin:

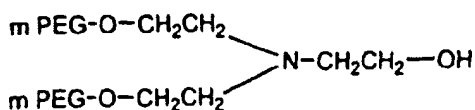
R H, ein C₁₋₁₂ Alkyl, ein Cycloalkyl oder ein Aralkyl darstellt, und n eine ganze Zahl darstellt, die den Polymerisationsgrad angibt.

[0028] Als ein niederes Alkyl kann R irgendeine niedere Alkylgruppe mit 1-6 Kohlenstoffatomen, zum Beispiel, Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, n-Pentyl oder n-Hexyl sein. Als ein Cycloalkyl ist R bevorzugt ein Cycloalkyl, das 3-7 Kohlenstoffatome enthält, zum Beispiel, Cyclopropyl, Cyclobutyl und Cyclohexyl. Unter diesen ist Cyclohexyl bevorzugter. Die typische Verbindung ist methoxy-Polyethylenglykol (mPEG). Andere Analoga und Derivate vom Polyethylenglykol, wie beispielsweise Polypropylenglykole, Polyvinylalkohole und Polyacrylmorpholine und dergleichen, können ebenfalls in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

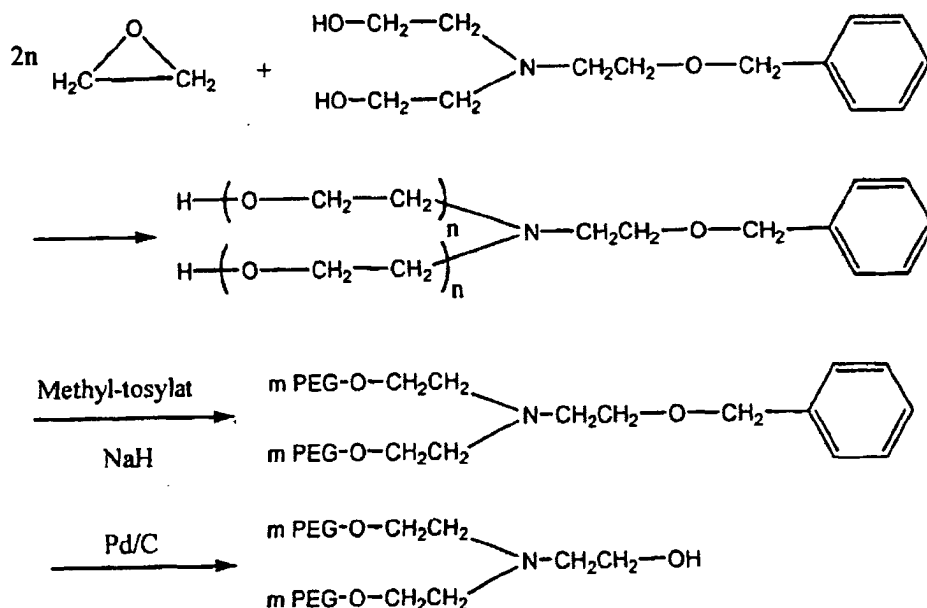
[0029] In Bezug auf PEGs, sie werden üblicherweise durch Molekulargewicht gemessen. Es ist bevorzugt, dass das Molekulargewicht vom PEG, das die Konjugate bildet, in den Bereich von 300 bis 60000 Dalton fällt, was bedeutet, dass n ungefähr 6 bis 1300 darstellt. Es ist bevorzugter, dass n 28, 112 und 450 darstellt, was jeweils einem Molekulargewicht von 1325, 5000 und 20000 entspricht. Aufgrund der möglichen Inhomogenität der Ausgangs-PEGs, die üblicherweise durch ihre Molekulargewichte eher als durch die selbst-wiederholende Einheit n definiert sind, werden PEGs normalerweise mit einem gewichtsmittleren Molekulargewicht eher als ihren selbst-wiederholenden, durch n angegebenen Einheiten charakterisiert. Die Ausgangs-PEG-Verbindungen mit unterschiedlichen Molekulargewichten werden leicht unter Verwendung von Verfahren synthetisiert, die in dem Fachgebiet bekannt sind, oder sie sind kommerziell erhältlich.

[0030] Die Y-förmigen PEG-Derivate der vorliegenden Erfindung können durch allgemeine Verfahren in diesem Gebiet synthetisiert und hergestellt werden. Die in der Erfindung beanspruchten, unterschiedlichen Verbindungen werden durch bekannte Verfahren synthetisiert und hergestellt, die in der technischen Literatur und Patenten in diesem Gebiet gefunden werden können.

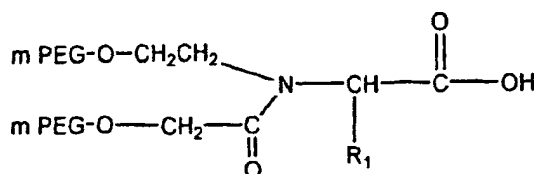
[0031] Wenn Pa und Pb mPEGs sind, X₁ und X₂ ein einfaches verzweigtes Alkyl sind und F eine Hydroxylgruppe ist, ist die mögliche Formel nachstehend:



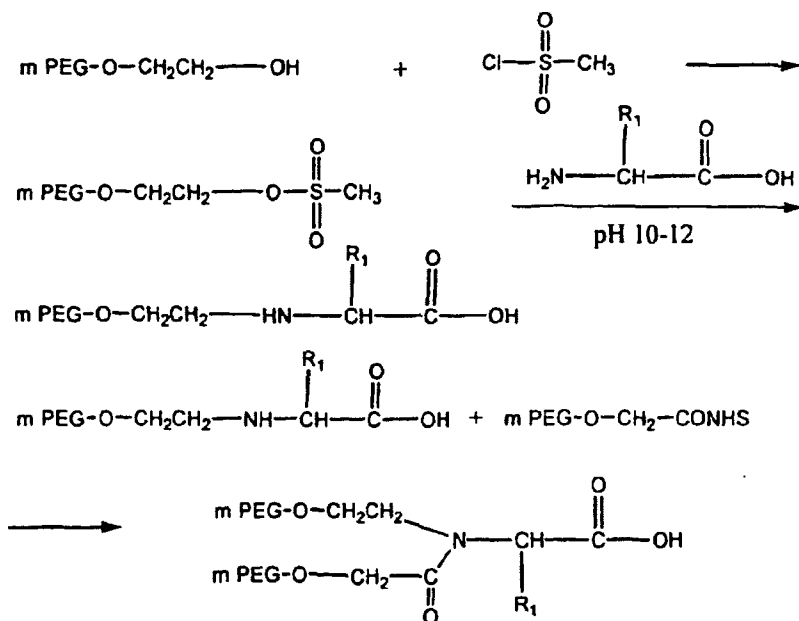
[0032] Diese Verbindung kann unter Verwendung eines Standardpolymerisationsinitiators zur Förderung der Polymerisation von Ethylenoxid oder Ethylenglykol hergestellt werden. Ein Standardverfahren zur Herstellung ist nachstehend gezeigt:



[0033] Wenn P_a und P_b methoxy-Polyethylenglykole (mPEGs) sind, X_1 und X_2 unterschiedlich sind, ist die mögliche Formel nachstehend:



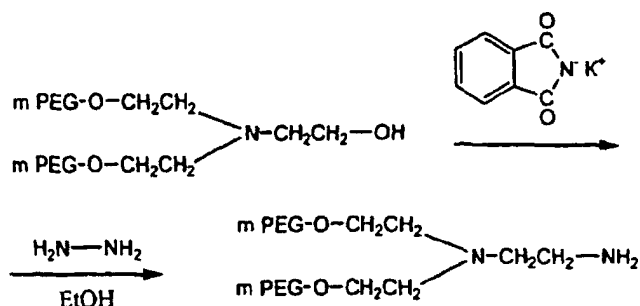
[0034] Diese Verbindung kann aus stufenweisen Reaktionen eines PEG mit einer Verbindung erhalten werden, die eine Aminogruppe enthält. Die ausgewählte Verbindung, die eine Aminogruppe enthält, kann eine Aminosäure, ein Aminoketon oder ein anderes Molekül mit einer Aminogruppe sein. Der Standardherstellungsweg ist nachstehend veranschaulicht. Es gibt jedoch andere Standardverfahren, die zur Herstellung dieses Derivats nützlich sind, die in diesem Gebiet bekannt sind.



[0035] Wenn die hydrophilen Polymer-Derivate der vorliegenden Erfindung verwendet werden, spielt die terminale Gruppe F eine Schlüsselrolle. Derivate mit unterschiedlichen terminalen Gruppen weisen unterschiedliche Verwendungen auf. Die Einfügung dieser funktionellen Gruppen bestimmt die Anwendungsgebiete und Strukturen dieser Derivate. In Bezug auf die gewünschte Verwendung können die folgenden Verfahren verwendet werden, um die terminale funktionelle Gruppe zu modifizieren:

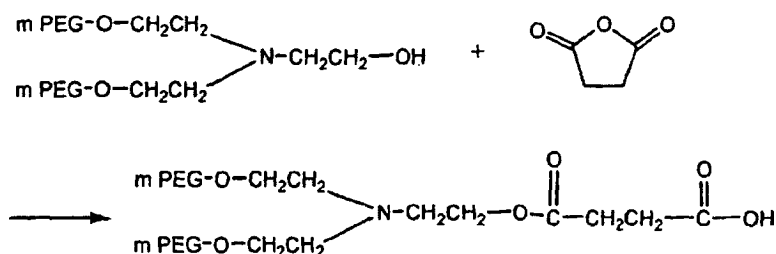
1. Aminierung

[0036] Aufgrund der größeren Reaktivität von Aminogruppen gegenüber Hydroxylgruppen sind die aminierten PEG-Derivate beim Umsetzen mit einem Molekül mit einer Carbonsäuregruppe zum Ergeben eines Konjugats wichtig.



2. Carboxylierung

[0037] Carboxylierung hilft dabei, die Reaktivität des PEG zu verbessern, und versetzt es in die Lage, mit Molekülen mit Amino- oder Hydroxylgruppen zu konjugieren.



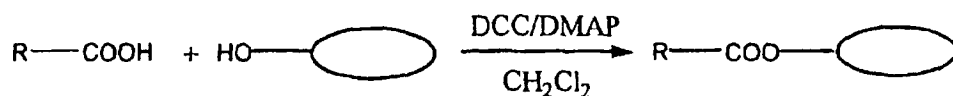
[0038] Wenn eine Aminosäure als ein Ausgangsmaterial verwendet wird, wird die terminale Gruppe des resultierenden Y-förmigen PEG eine Carboxylgruppe aufweisen. Insbesondere, wenn viele Carbonsäuren enthaltende Aminosäuren oder Polymere verwendet werden, werden die terminalen Gruppen einige Carbonsäuregruppen aufweisen. Die Art der Struktur ist nützlich, um die Beladung von kleinen natürlichen Arzneimittel-molekülen zu erhöhen und einen Effekt mit langsamer Freigabe durch stufenweisen Abbau zu erreichen.

3. Andere Modifizierungsverfahren

[0039] Eine andere Modifizierung, zum Beispiel, durch Säurechlorid, Hydrazin, Maleimid, Pyridindisulfid und dergleichen kann ebenfalls geeignet angepasst werden, um entsprechende Derivate zu erhalten. Andere Herstellungsverfahren in diesem Gebiet werden den Fachleuten klar sein.

[0040] Viele Komponenten von natürlichen Arzneimitteln weisen aktive funktionelle Gruppen, wie beispielsweise Amino-, Carboxyl- und Hydroxylgruppen auf, die an Monosaccharide, Polysaccharide, Nucleoside, Polynucleoside, Phosphoryl und dergleichen, in vivo binden, um aktive pharmakologische Strukturen zu bilden.

[0041] Genauso können die PEG-Derivate mit der modifizierten terminalen funktionellen Gruppe mit den Arzneimittelmolekülen auf die gleiche Weise konjugieren, um den Platz eines bioorganischen Moleküls einzunehmen und die Unzulänglichkeiten der kurzen physiologischen Halbwertszeiten und des geringen therapeutischen Effekts zu überwinden. Das folgende Modell ist eine allgemeine Estersynthesereaktion.



[0042] Eine Estergruppe kann durch Bioabbau in vivo eliminiert werden, um den aktiven Bestandteil freizugeben. Eine Amidgruppe ist in vivo relativ stabil.

[0043] Die Y-förmigen hydrophilen Polymer-Derivate der vorliegenden Erfindung können mit Arzneimittelmolekülen durch passende funktionelle Gruppen Konjugate bilden. Diese funktionellen Gruppen können an die freie Amino-, Hydroxyl- oder Thiolgruppe von Proteinen, Polypeptiden und anderen natürlichen Arzneimitteln

mit den Polymer-Derivaten binden. Für Proteine und Peptide mit hohem Molekulargewicht kann ein Molekül an ein oder mehrere PEG-Derivate binden, um die physiologischen Effekte der Arzneimittelmoleküle in vivo zu verbessern. Für die aktiven Komponenten eines natürlichen Arzneimittels mit geringem Molekulargewicht kann ein PEG-Derivat mit einem oder mehreren Arzneimittelmolekülen durch passende funktionelle Gruppen verbunden werden, um eine passende Arzneimittelkonzentration und die Funktion einer unterstützten Freigabe sicherzustellen.

[0044] Die vorstehend beschriebenen Anwendungen bieten einige mögliche Referenzmodelle für die medizinische Anwendung der PEG-Derivate. Die Wahl von passenden Derivaten für tatsächliche Anwendungen kann durch Verwendung von pharmakologischen, toxikologischen, klinischen Tierstudien und anderen Zugängen bestätigt werden.

[0045] Bevorzugt sind die in den Konjugaten der vorliegenden Erfindung enthaltenen Arzneimittelmoleküle die von natürlichen Pflanzen abgetrennten Wirkstoffe, wie beispielsweise Paclitaxel, Camptothecin, Cinobufagin, Glycyrrhetinsäure und Scopoletin. Bevorzugt sind die Arzneimittel die Bestandteile von natürlichen Arzneistoffen, die bei der Behandlung von Tumoren verwendet werden, wie beispielsweise Paclitaxel, Camptothecin und Derivate davon. Bevorzugte Arzneimittel schließen ebenfalls Interferone, wie beispielsweise α - und β -Interferon, ein.

[0046] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung können in der Form von reinen Verbindungen oder geeigneten pharmazeutischen Zusammensetzungen über irgendwelche annehmbaren Wege oder in einem Reagens zur ähnlichen Verwendung enthalten seiend verabreicht werden. Die Konjugate können folglich über orale, nasale, parenterale, topische, transdermale, rektale oder Injektions-Wege in der Form von Feststoff, Halbfeststoff, lyophilisiertem Pulver oder Flüssigkeit, zum Beispiel, Tabletten, Zäpfchen, Pillen, weichen und harten Gelatine kapseln, Pulver, Lösung, Suspension und Aerosolen verabreicht werden. Bevorzugt ist die Einheitsdosierungsform für eine genaue Dosierung und leichte Verabreichung geeignet. Die Zusammensetzung umfasst herkömmliche pharmazeutische Träger oder Hilfsstoffe und das Konjugat(e) der vorliegenden Erfindung als den Wirkstoff(e). Weiterhin kann sie andere Mittel, Träger und Hilfsstoffe einschließen.

[0047] Allgemein gesagt, die pharmazeutisch annehmbaren Zusammensetzungen werden in Abhängigkeit von dem Verabreichungsverfahren ungefähr 1-99 Gew.-% des Konjugats der vorliegenden Erfindung und 99-1 Gew.-% eines geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoffs einschließen. Bevorzugt schließen sie 5-75 Gew.-% des Konjugats ein, und der Rest ist irgendein geeigneter pharmazeutischer Hilfsstoff.

[0048] Der bevorzugte Verabreichungsweg ist eine Injektion mit einem allgemeinen täglichen Dosierschema, das auf der Basis der Ernsthaftigkeit der zu behandelnden Krankheit eingestellt werden kann. Die Konjugate der vorliegenden Erfindung oder ihre pharmazeutisch annehmbaren Salze können in der Dosierung zur Injektion durch, zum Beispiel, Lösen von 0,5-50% des Wirkstoffs in einem flüssigen pharmazeutischen Träger, wie beispielsweise Wasser, Salzlösung, wässrige Glukose, Glycerol, Ethanol und dergleichen formuliert werden, um eine Suspensionslösung zu bilden.

[0049] Die Zusammensetzungen, die als Flüssigkeit verabreicht werden können, wie beispielsweise Lösungen und Suspensionen, können durch Lösen und Dispergieren des Konjugats der vorliegenden Erfindung (ungefähr 0,5-20%) und optional eines pharmazeutischen Hilfsstoffs in einen Träger hergestellt werden. Ein Beispiel von Trägern schließt Wasser, Salzlösung, wässrige Glukose, Glycerol, Ethanol und dergleichen ein.

[0050] Wenn benötigt, kann die pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung weiterhin ein Hilfsmittel in einer kleinen Menge einschließen, wie beispielsweise Feuchthaltemittel, Emulgator, pH-Puffer, Antioxidationsmittel und dergleichen. Zum Beispiel kann Zitronensäure, Sorbitanmonolaurat, Triethanolamino-*leat*, butyliertes Hydroxytoluol und dergleichen zugegeben werden.

[0051] Die praktischen Herstellungsverfahren von solchen Dosierungsformen sind den Fachleuten bekannt oder offensichtlich. Zum Beispiel, siehe Ramington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, (Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1990). In jedem Fall wird die angewendete Zusammensetzung gemäß den Techniken der vorliegenden Erfindung eine wirksame Menge des Konjugats der vorliegenden Erfindung für die Behandlung der entsprechenden Krankheit einschließen.

BEISPIELE

[0052] Die Polymer-Derivate und die Konjugate der vorliegenden Erfindung und ihre Herstellungsverfahren

werden durch die folgenden Beispiele weiterhin beschrieben werden. Diese Beispiele beabsichtigen nicht den Schutzzumfang der Erfindung durch irgendwelche Mittel einzuschränken. Der Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung kann durch die Ansprüche bestimmt werden.

Beispiel 1

Synthese von Y-förmigen verzweigten Polyethylenglykol-Derivaten (1)

[0053] Die Synthese ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Bei 0°C wurden 10 ml trockenes Ethylenoxid in einen strapazierfähigen Behälter gegeben, der 200 mg N,N-Di-2-hydroxyethyl-2-benzyloxyethylamin und 50 mg trockenes NaH enthielt. Die Reaktionsmischung wurde bei der Temperatur gerührt, die langsam erhöht wurde. Nach 28 Stunden wurde die viskose Flüssigkeit mit Wasser gequenchet, und das Polymer wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Ausbeute: 8,2 g (81%), Smp: 56-58°C.

[0054] 5 g (PEG)₂-N-CH₂CH₂O-Bz (Molekulargewicht beträgt 10000, erhalten aus der vorstehenden Stufe) wurden in 50 ml Toluol gelöst. 0,1 g Natriumhydrid und 0,5 g Benzolsulfonsäuremethylester wurden zu der Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 80 °C 24 Stunden lang erhitzt. Dann wurde die Lösung mit 2 ml Isopropylalkohol gequenchet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde zu 200 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 4,6 g, (92%), Smp: 57-59 °C.

[0055] 3 g (MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂O-Bz (Molekulargewicht beträgt 10000, erhalten aus der vorstehenden Stufe) wurden in 30 ml wasserfreiem 1,4-Dioxan gelöst. Dann wurden 0,1 g Pd/C zu der Lösungsmischung als Katalysator zugegeben, und H₂-Gas (40 Psi) wurde in den Reaktor eingeführt. Die Lösung wurde kräftig bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt und mit frischem Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde durch Rotationsverdampfung entfernt, und der Rückstand wurde zu Ethylether zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,4 g (80%). NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 6H), 2,63 (t, 6H).

Beispiel 2

Synthese von Y-förmigem verzweigtem Polyethylenglykolsuccinimidylcarbonat (2)

[0056] Die Synthese ist in [Fig. 2](#) gezeigt. 1 g Y-förmiges verzweigtes PEG-Derivat mit Mw 10000 ((MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂OH, aus Beispiel 1) und 0,1 g Disuccinimidylcarbonat wurden in 20 ml Acetonitril gelöst. 0,1 ml Pyridin wurden zu der Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter dem Schutz von Stickstoff über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Rotationsverdampfung entfernt, und der Rückstand wurde unter Vakuum getrocknet. Der feste Rückstand wurde zu 10 ml trockenem Dichlormethan zugegeben. Der ungelöste Feststoff wurde filtriert. Die organische Phase wurde mit Natriumacetatpuffer (0,1M, pH 5,5) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, durch Rotationsverdampfung konzentriert und in Ethylether präzipitiert. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,9 g (90%), NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 6H), 4,45 (t, 2H), 2,82 (s, 4H).

Beispiel 3

Synthese von mPEG-Glycin (3)

[0057] 5 g mPEG mit Molekulargewicht 5000 wurden in 50 ml Toluol gelöst, 2 Stunden lang unter dem Schutz von Stickstoff azeotrop destilliert, wobei 10 ml Lösung heraus destilliert wurden, und dann auf Raumtemperatur gekühlt. 3 ml trockenes Dichlormethan und 0,08 ml trockenes Triethylamin wurden zu der Reaktion zugegeben. Die Mischung wurde in einem Eis-Wasser-Bad gekühlt, und 0,12 ml trockenes Methansulfonylchlorid wurden tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur unter dem Schutz von Stickstoff über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml absolutem Ethanol gequenchet. Ein Teil des Lösungsmittels wurde durch Rotationsverdampfung entfernt, das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, und dann wurden 150 ml Ethylether zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 4,8 g (96%). NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 3H), 4,32 (t, 2H).

[0058] 2 g Glycinhydrochlorid wurden in 20 ml deionisiertem Wasser gelöst. 1 g NaOH wurde zu der Glycinlösung zugegeben, um den pH auf 10,5 einzustellen. Dann wurden 2 g mPEG-Mesylatester mit Molekularge-

wicht 5000 (erhalten aus der vorstehenden Stufe) zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde bei 37 °C 72 Stunden lang inkubiert und dann durch Salzsäurelösung auf einen pH von ungefähr 7 neutralisiert. Das Polymer wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Ausbeute: 1,7 g (85%), Smp: 55-57 °C. NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 3H), 2,95 (t, 2H), 3,11 (s, 2H).

Beispiel 4

Synthese von mPEG-Alanin (4)

[0059] 5 g mPEG mit Molekulargewicht 5000 wurden in 50 ml Toluol gelöst, 2 Stunden lang unter dem Schutz von Stickstoff azeotrop destilliert, wobei 10 ml Lösungsmittel heraus destilliert wurden, und dann auf Raumtemperatur gekühlt. 3 ml trockenes Dichlormethan und 0,08 ml trockenes Triethylamin wurden zu der Reaktion zugegeben. Die Mischung wurde in einem Eis-Wasser-Bad gekühlt, und 0,12 ml trockenes Methansulfonylchlorid wurden tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur unter dem Schutz von Stickstoff über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugeben von 2 ml absolutem Ethanol gequencht. Das Lösungsmittel wurde durch Rotationsverdampfung entfernt, das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, und dann wurden 150 ml Ethylether zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 4,5 g (90%). NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 3H), 4,32 (t, 2H).

[0060] 2 g Alaninhydrochlorid wurden in 20 ml deionisiertem Wasser gelöst. 1 g NaOH wurde zu der Alaninlösung zugegeben, um den pH auf 10,5 einzustellen. Dann wurden 2 g mPEG-Mesylat mit Molekulargewicht 5000 zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde bei 37 °C 72 Stunden lang inkubiert und dann mit Salzsäurelösung auf einen pH von ungefähr 7 neutralisiert. Das Polymer wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Ausbeute: 1,9 g (94%), Smp: 55-57 °C. NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 3H), 2,94 (m, 1H), 1,24 (d, 3H).

Beispiel 5

Synthese von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten (5), die zu einer Aminogruppe reaktiv sind

[0061] Die Synthese ist in [Fig. 3](#) gezeigt. 1g mPEG-Glycin (3) oder mPEG-Alanin (4) mit Molekulargewicht 5000 (aus Beispiel 3 oder 4) wurde in 20 ml Dichlormethan gelöst. 1 g mPEG-Carboxyethyl-NHS-Ester (mPEG-O-CH₂-CO-NHS, Molekulargewicht 5000) und 0,1 ml Triethylamin wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde zu Ethylether zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Das Produkt (Y-förmige verzweigte PEG-Säure) wurde weiterhin durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Ausbeute: 0,98 g (50%).

[0062] 0,5 g Y-förmige verzweigte mPEG-Säure wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst. 7 mg N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 13 mg Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zu 20 ml Isopropylalkohol (IPA) zugegeben. Das Produkt wurde durch Filtration aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,48 g (96%). NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 6H), 2,81 (s, 4H), 4,15 (s, 2H), 4,07 (t, 2H), 4,48 (t, 2H).

Beispiel 6

Synthese von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten (6), die zu einer Aminogruppe reaktiv sind

[0063] Die Synthese ist in [Fig. 4](#) gezeigt. 1 g mPEG-Glycin (3) oder mPEG-Alanin (4) mit Molekulargewicht 5000 (aus Beispiel 3 oder 4) wurde in 20 ml Dichlormethan gelöst. 1 g mPEG-NHS-Carbonat (mPEG-O-CO-NHS) mit Molekulargewicht von 5000 Dalton und 0,1 ml Triethylamin wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde zu Ethylether zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Das Produkt (Y-förmige verzweigte PEG-Säure) wurde weiterhin durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Ausbeute: 0,98 g (50%).

[0064] 0,5 g Y-förmige verzweigte mPEG-Säure wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst. 7 mg N-Hydroxysuc-

cinimid (NHS) und 13 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zu 20 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,48 g (96%). NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 6H), 2,81 (s, 4H), 4,15 (s, 2H), 4,07 (t, 2H).

Beispiel 7

Synthese von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten (7), die zu einer Thiolgruppe reaktiv sind

[0065] Die Synthese ist in [Fig. 2](#) gezeigt. 1 g Y-förmiges verzweigtes PEG ((MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂OH) mit Molekulargewicht 10000 (erhalten in Beispiel 2) wurde in Toluol gelöst, 2 Stunden lang unter dem Schutz von Stickstoff azeotrop destilliert und dann auf Raumtemperatur gekühlt. 3 ml trockenes Dichlormethan und 0,08 ml trockenes Triethylamin wurden zu der Lösung zugegeben. Die Mischung wurde in einem Eis-Wasser-Bad gekühlt, und trockenes Methansulfonylchlorid wurde tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur unter trockenem Stickstoff über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml absolutem Ethanol gequenchet. Das Lösungsmittel wurde durch Rotationsverdampfung entfernt, das Präzipitat wurde durch Filtration entfernt, und dann wurden 150 ml Ethylether zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,8 g (80%)

[0066] 1 g Y-förmiges verzweigtes PEG-Mesylat ((MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂OMs) mit Molekulargewicht 10000 wurde in 30 ml wässriger Ammoniaklösung mit 5% Ammoniumchlorid gelöst. Die Lösung wurde 72 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zu 50 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,7 g (70%)

[0067] 0,5 g Y-förmiges verzweigtes PEG-Amin ((MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂NH₂) wurden in Acetonitril gelöst. 20 mg NHS-3-Maleimidopropionat wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zu 30 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,42 g (84%). NMR (DMSO): 3,5 (br m, H im PEG), 3,24 (s, 6H), 3,05 (t, 2H), 2,56 (t, 2H), 6,71 (s, 2H im Maleimid).

Beispiel 8

Konjugat von Y-förmigen verzweigten PEG-NHS-Derivaten mit α -Interferon (8)

[0068] Die Synthese ist in [Fig. 7](#) gezeigt. 75 mg Y-förmiger verzweigter Polyethylenglykolsuccinimidylester (aus Beispiel 2, 5 oder 6) wurden in 5 ml gepufferter α -Interferonlösung mit einer Interferonkonzentration von 5 mg/ml (pH 7,4) gelöst. In der Reaktionslösung betrug das PEG- und α -Interferon-Verhältnis 3:1. Die Lösung wurde 1 Stunde lang bei 4 °C und dann 5 Stunden lang bei Raumtemperatur mäßig gerührt. Die Lösung wurde auf eine End-Interferon-Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt und durch HPLC mit Gelsäule gereinigt. Das monosubstituierte Y-förmige verzweigte PEG-Konjugat von α -Interferon wurde aufgefangen. SDS-PAGE zeigte, dass das Produkt kein freies α -Interferon enthielt.

[0069] SDS-PAGE-Analyse: Die Reaktionsmischung und das gereinigte PEG-IFN wurden einer Natriumdozyl-(lauryl)-sulfat/Polyacrylamid (8-16%)-Gelelektrophorese unterzogen und unter Verwendung von Coomassie-Blaufarbstoff auf Protein gefärbt. PEG-Teile in den PEG2-IFN-Konjugaten wurden spezifisch unter Verwendung von Titrisol-Iodlösung (EM Science, Gibbstown, New Jersey) gefärbt. Das SDS-PAGE-Gel wurde mit destilliertem Wasser gespült und in 5% Bariumchloridlösung platziert. Nach 10 Min. wurde das vorstehende Gel mit destilliertem Wasser gewaschen und in 0,1 N Titrisol-Iodlösung für weitere 10 Min. platziert. Titrisol wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen. Das PEG gefärbte (orangebraune Banden) SDS-PAGE-Gel, das Y-PEG-IFN-Proben enthielt, wurde in destilliertem Wasser in einem wärmeverschlossenen Kapak/Scotch-pak-Beutel gelagert.

Beispiel 9

Konjugat von Y-förmigen verzweigten PEG-NHS-Derivaten mit β -Interferon

[0070] Y-förmiger verzweigter Polyethylenglykolsuccinimidylester (Beispiel 5 oder 6) wurde in 5 ml gepufferter

β -Interferonlösung mit einer Interferonkonzentration von 1 mg/ml (pH 7,4) gelöst. In der Reaktionslösung betrug das PEG- und β -Interferon-Verhältnis 3:1. Die Lösung wurde 7 Stunden lang mäßig gerührt. Die Lösung wurde durch HPLC mit Gelsäule gereinigt. Das monosubstituierte Y-förmige verzweigte PEG-Konjugat mit β -Interferon wurde aufgefangen. SDS-PAGE und CE zeigten, dass das Produkt kein freies β -Interferon enthält.

Beispiel 10

Konjugat von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten mit Paclitaxel (10)

[0071] Die Synthese ist in [Fig. 5](#) gezeigt. 1 g Y-förmige verzweigte PEG-Carbonsäure (aus Beispiel 5 oder 6) wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst. 90 mg Paclitaxel, 8 mg Dimethylaminopyridin und 25 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zu 20 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, mit Ether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,8 g (80%), Smp: 55-57 °C.

Beispiel 11

Konjugat von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten mit Camptothecin (11)

[0072] Die Synthese ist in [Fig. 6](#) gezeigt. 1 g Y-förmige verzweigte PEG-Carbonsäure (Beispiel 5 oder 6) wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst. 120 mg Glycin-Camptothecin, 50 mg Dimethylaminopyridin und 95 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 20 ml 1,4-Dioxan gelöst. Das Präzipitat wurde durch Filtration entfernt. Die Lösung wurde konzentriert, und der Rückstand wurde zu 20 ml Ethylether zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, mit Ethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,8 g (80%), Smp: 56-58 °C.

Beispiel 12

Konjugat von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten mit Cinobufagin (12)

[0073] Die Synthese ist in [Fig. 5](#) gezeigt. 1 g Y-förmige verzweigte PEG-Carbonsäure (Beispiel 5 oder 6) wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst. 60 mg Cinobufagin, 12 mg 1-Hydroxybenzotriazol, 16 mg Dimethylaminopyridin und 40 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zu 20 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, mit Ether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,75 g (75%), Smp: 57-59 °C.

Beispiel 13

Konjugat von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten mit Scopoletin (13)

[0074] Die Synthese ist in [Fig. 5](#) gezeigt. 1 g Y-förmige verzweigte PEG-Carbonsäure (Beispiel 5 oder 6) wurde in 20 ml Dichlormethan gelöst. 30 mg Cinobufagin, 20 mg 1-Hydroxybenzotriazol, 20 mg Dimethylaminopyridin und 38 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 12 Stunden lang bei Raumtemperatur unter dem Schutz von Stickstoff gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde zu 20 ml 1,4-Dioxan zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, mit Ether gewaschen und durch Luftabsaugen getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde zu 100 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, mit Ether gewaschen und durch Luftabsaugen getrocknet. Die Präzipitate wurden vereinigt und unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,92 g (92%), Smp: 56-58 °C.

Beispiel 14

Konjugat von Y-förmigen verzweigten PEG-Derivaten mit Clcyrrhetinsäure (14)

[0075] Die Synthese ist in [Fig. 6](#) gezeigt. 1 g Y-förmige verzweigte PEG-Carbonsäure (Beispiel 5 oder 6) wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst. 0,2 ml Thionylchlorid wurden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden lang gerührt. Das Lösungsmittel und Verunreinigungen mit niedrigem Siedepunkt wurden unter Va-

kuum entfernt. 10 ml Dichlormethanolösung mit 70 mg Glycyrrhetinsäure wurden zugegeben und durch Mischen gelöst. Dann wurden 60 mg 4-Dimethylaminopyridin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 12 Stunden lang bei Raumtemperatur unter dem Schutz von Stickstoffgas gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde zu 20 ml Isopropylalkohol zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Filtration aufgefangen, mit Ethylether gewaschen, durch Luftabsaugen getrocknet und weiterhin unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,6 g (60%). Smp: 58~60 °C.

Beispiel 15

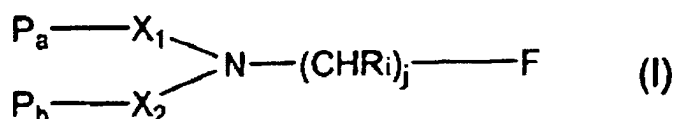
[0076] Dieses Beispiel soll das Herstellungsverfahren einer typischen pharmazeutischen Zusammensetzung veranschaulichen, die parenteral verabreicht wird. Die Zusammensetzung umfasst das Konjugat der vorliegenden Erfindung.

Komponente	
In Beispiel 8 hergestelltes Konjugat	2 g
0,9% Salzlösung	100 ml

[0077] Das in Beispiel 8 hergestellte Konjugat wurde in 0,9% Salzlösung gelöst, um 100 ml Lösung zur intravenösen Injektion zu erhalten, welche durch eine 0,2 µm Membran filtriert und aseptisch verpackt wurde. Das Pulver für die Injektion wurde durch Gefriertrocknen erhalten.

Patentansprüche

1. Y-förmiges verzweigtes hydrophiles Polymer-Derivat, welches durch die Formel I dargestellt ist:



worin

j eine ganze Zahl von 1 bis 12 darstellt;

R_i ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, einem C₁₋₁₂-substituierten oder unsubstituierten Alkyl, einem substituierten Aryl, einem Aralkyl und einem Heteroalkyl;

F eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Hydroxylgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Estergruppe, Carbonsäurechlorid, Hydrazid, Maleimid und Pyridindisulfid, die zu einer Reaktion mit einer Aminogruppe, einer Hydroxylgruppe oder einer Thiolgruppe eines therapeutischen Wirkstoffs oder eines Substrats unter Bildung einer kovalenten Bindung in der Lage sind;

und worin:

P_a und P_b hydrophile Polymere darstellen, die identisch oder unterschiedlich sind;

X₁ und X₂ unabhängig voneinander Verbindungsgruppen sind, worin X₁ (CH₂)_n darstellt und X₂ ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus (CH₂)_n, (CH₂)_nOCO, (CH₂)_nNHCO und (CH₂)_nCO, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist;

oder

P_a und P_b Polyethylenglykole sind, die identisch oder unterschiedlich sind;

X₁ und X₂ unabhängig voneinander Verbindungsgruppen sind, worin X₁ (CH₂)_n ist und X₂ ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus (CH₂)_n, CO und (CH₂)_mCO, worin n und m unabhängig voneinander ganze Zahlen von 1 bis 12 sind.

2. Hydrophiles Polymer-Derivat nach Anspruch 1, worin das hydrophile Polymer ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polyvinylalkohol, Polyacrylmorpholin und Copolymeren davon.

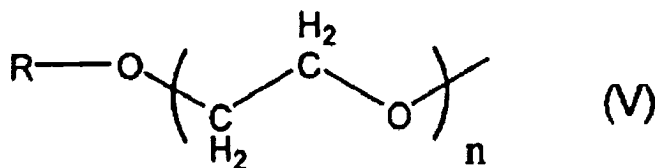
3. Hydrophiles Polymer-Derivat nach Anspruch 2, worin das hydrophile Polymer Polyethylenglykol darstellt.

4. Y-förmiges verzweigtes Polyethylenglykol-Derivat, welches gemäß Anspruch 1 dargestellt ist, worin P_a und P_b Polyethylenglykole sind, welche identisch oder unterschiedlich sind, und X₂ (CH₂)_n ist.

5. Y-förmiges verzweigtes Polyethylenglykol-Derivat nach Anspruch 1, worin P_a und P_b Polyethylenglykole sind, welche identisch oder unterschiedlich sind, und X₂ (CH₂)_nCO darstellt.

6. Y-förmiges verzweigtes Polyethylenglykol-Derivat nach Anspruch 1, worin P_a und P_b Polyethylenglykole darstellen, welche identisch oder unterschiedlich sind, und X_2 CO ist.

7. Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin P_a und P_b identische oder unterschiedliche PEGs der Formel (V) sind:



worin

R H, ein C_{1-12} -Alkyl, ein Cycloalkyl oder ein Aralkyl ist; und
n eine ganze Zahl darstellt, die den Polymerisationsgrad angibt.

8. Derivat nach Anspruch 7, worin R ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus H, Methyl, Ethyl, Isopropyl, Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclohexyl und Benzyl.

9. Derivat nach Anspruch 7, worin das Molekulargewicht von PEG von ungefähr 300 bis 60.000 reicht.

10. Verfahren zur Herstellung des PEG-Derivats nach Anspruch 4, umfassend:

Initiieren der Polymerisation von Ethylenoxid mit N,N-Di-2-hydroxyethyl-2-benzyloxyethylamin bei 0°C in Gegenwart eines Katalysators;

Alkylieren der terminalen Hydroxylgruppen;

Entfernen der Benzylgruppen durch katalytische Hydrierung; und

Derivatisieren der neuen Hydroxylgruppe unter Einfügen der terminalen Gruppe F.

11. Verfahren zur Herstellung des PEG-Derivats nach Anspruch 5 oder 6, umfassend:

Umsetzung eines Methoxypolyethylenglykolmesylats mit einer Aminosäure unter basischen Bedingungen unter Bildung eines reaktiven Produkts; und

Umsetzung des oben erhaltenen reaktiven Produkts mit einem weiteren Methoxypolyethylenglykol-Derivat und weitere Derivatisierung zur Einfügung einer terminalen Gruppe F.

12. Verfahren nach Anspruch 11, worin das weitere Methoxypolyethylenglykol-Derivat mPEG-Carboxylethyl-NHS-Ester ist.

13. Konjugat, welches durch Umsetzung des Derivats nach einem der Ansprüche 1, 4, 5 und 6 mit Arzneimittelmolekülen durch die terminale Gruppe F gebildet ist, vorzugsweise einem Arzneimittelmolekül, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Aminosäuren, Proteinen, Enzymen, Nucleosiden, Sacchariden, organischen Säuren, Glycosiden, Flavonoiden, Anthrachinonen, Terpenoiden, Phenylpropanoidphenolen, Steroiden, Glycosid der Steroide und Alkaloiden.

14. Copolymer der Derivate nach einem der Ansprüche 1, 4, 5 und 6 und anderer Polymere, verbunden durch die terminale Gruppe F.

15. Konjugat nach Anspruch 13, worin das Arzneimittel eine Wirkstoffkomponente eines natürlichen Arzneistoffs, vorzugsweise Cinobufagin, Glycyrrhetinsäure oder Scopoletin darstellt.

16. Konjugat nach Anspruch 13, worin das Arzneimittel ein Antitumormittel darstellt, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Paclitaxel, Camptothecin, Interferon und Derivaten davon.

17. Konjugat nach Anspruch 16, worin das Interferon α -, β - oder γ -Interferon ist.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend das Konjugat nach einem der Ansprüche 13 bis 17 und wahlweise einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Hilfsstoff.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

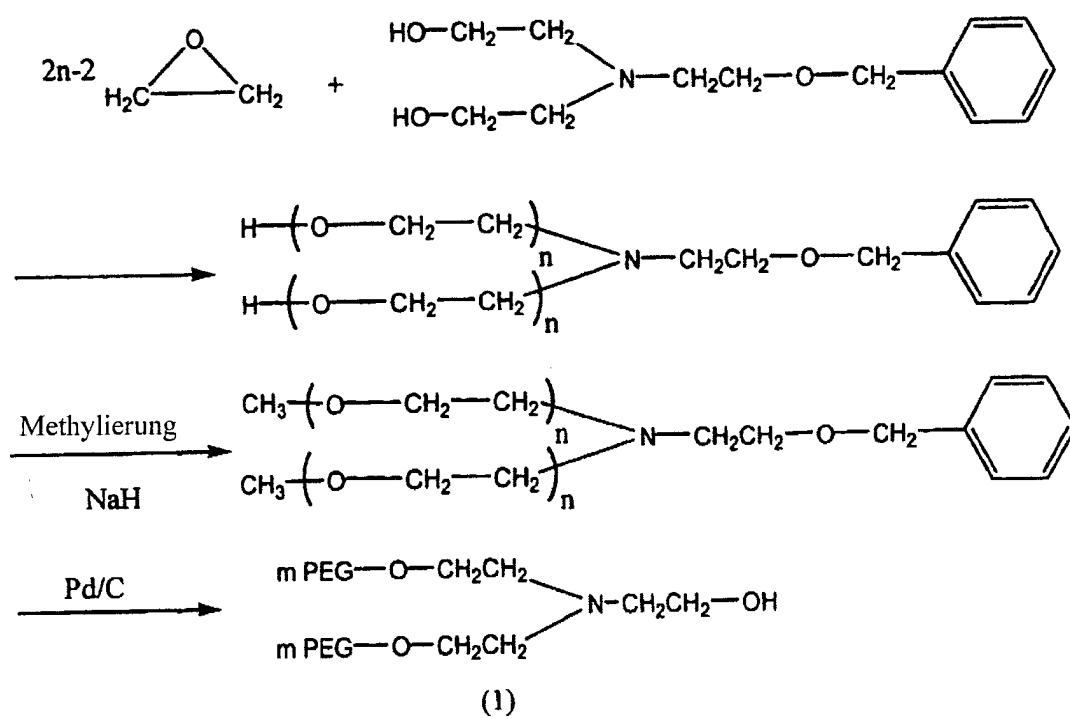


Fig. 1

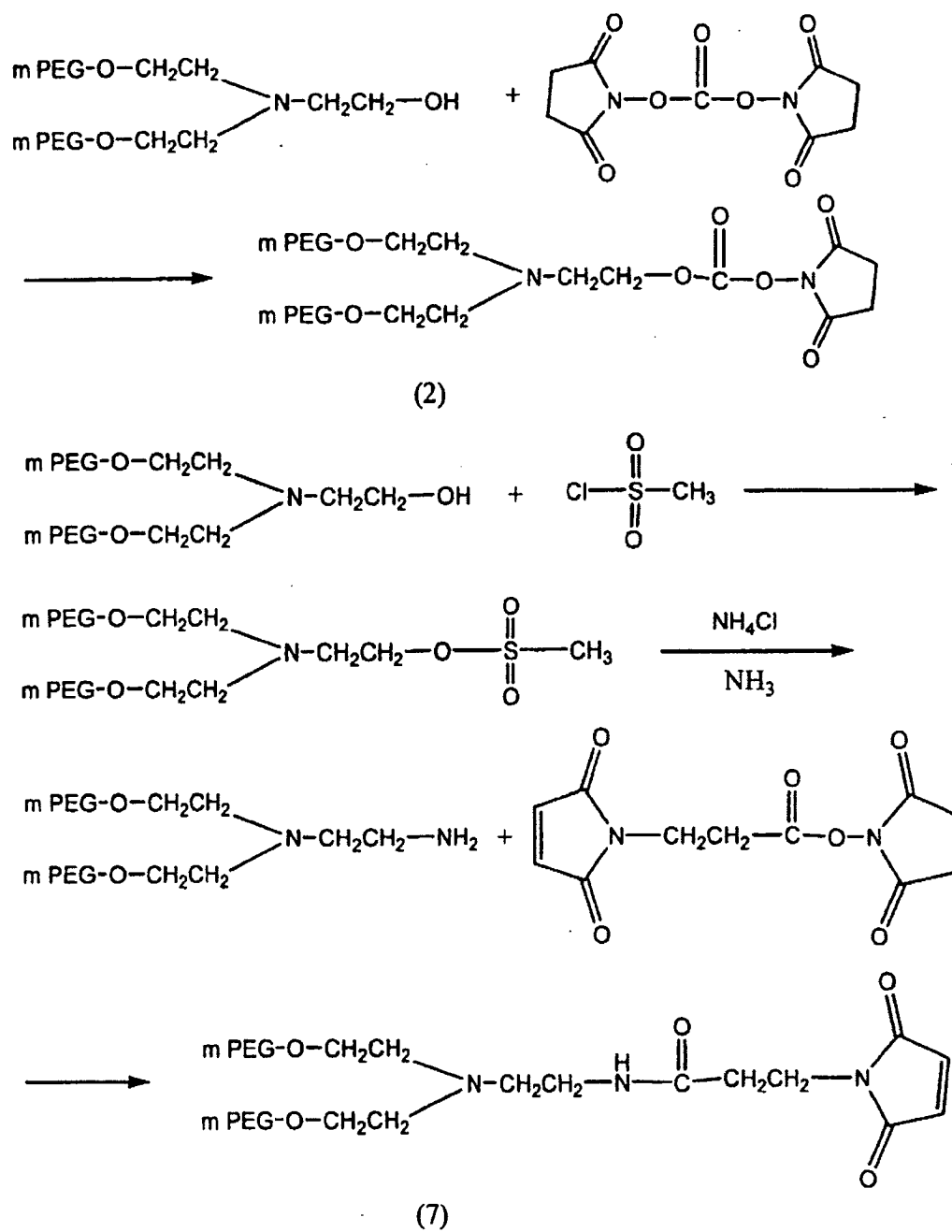


Fig. 2

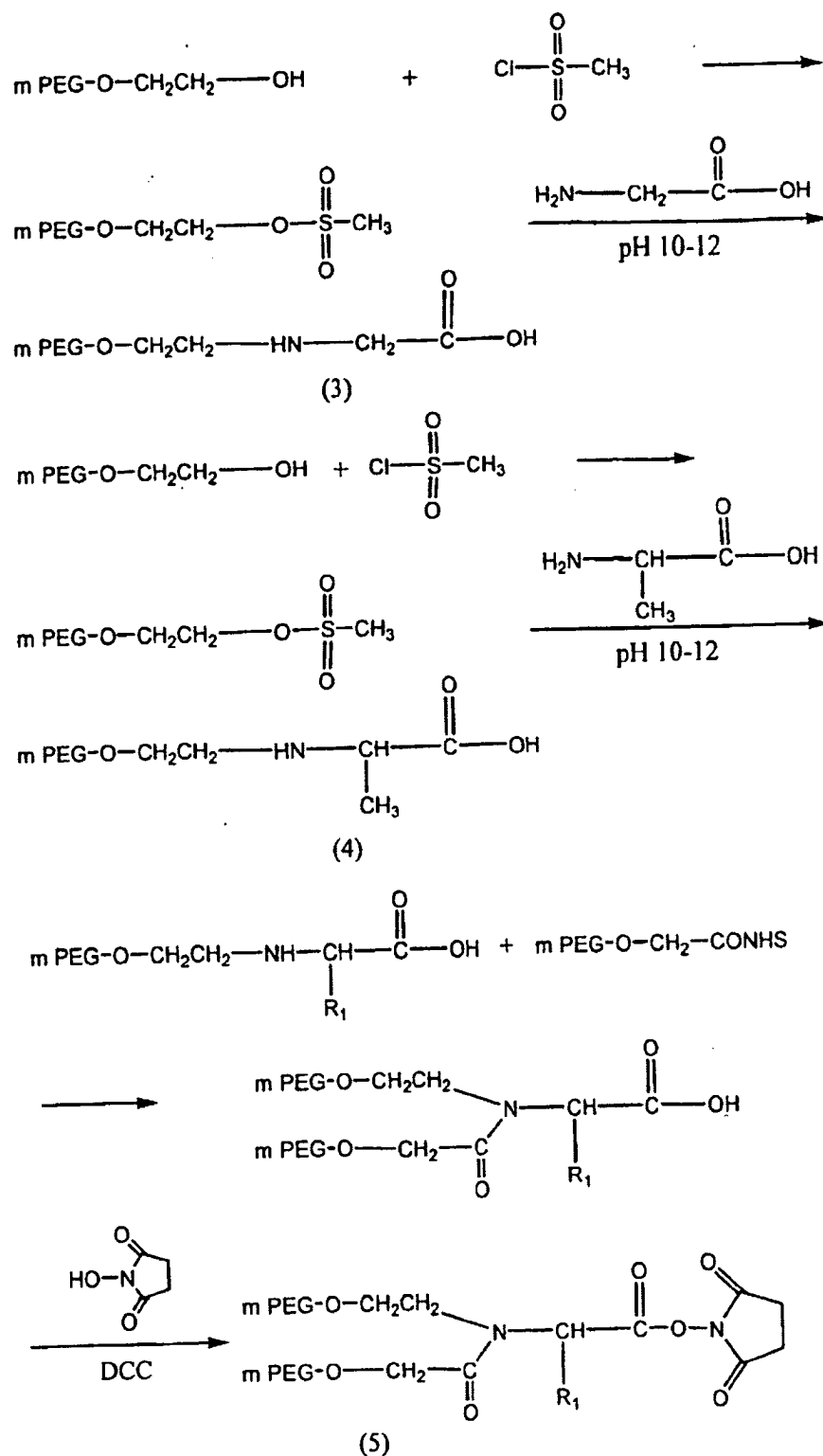


Fig. 3

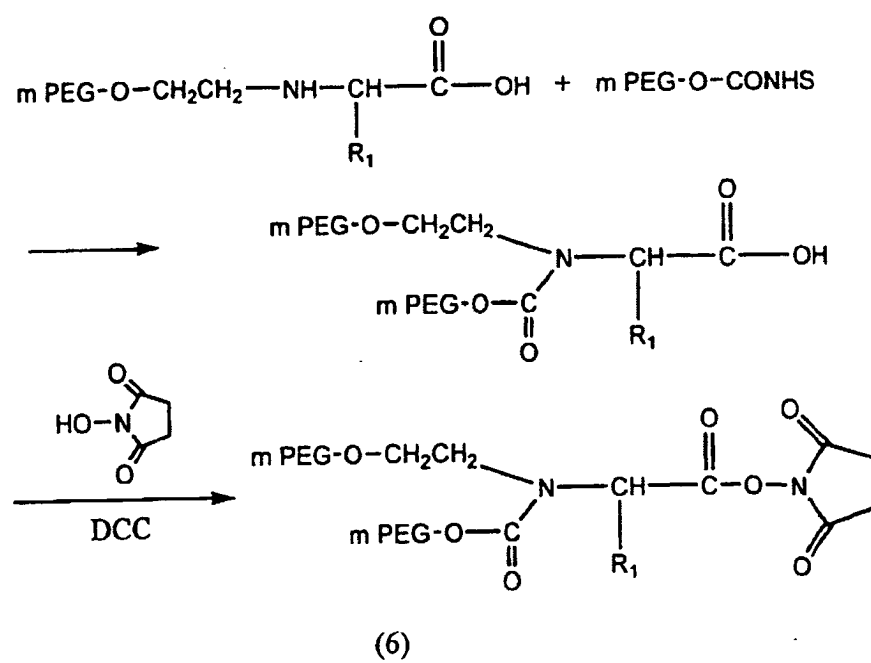


Fig. 4

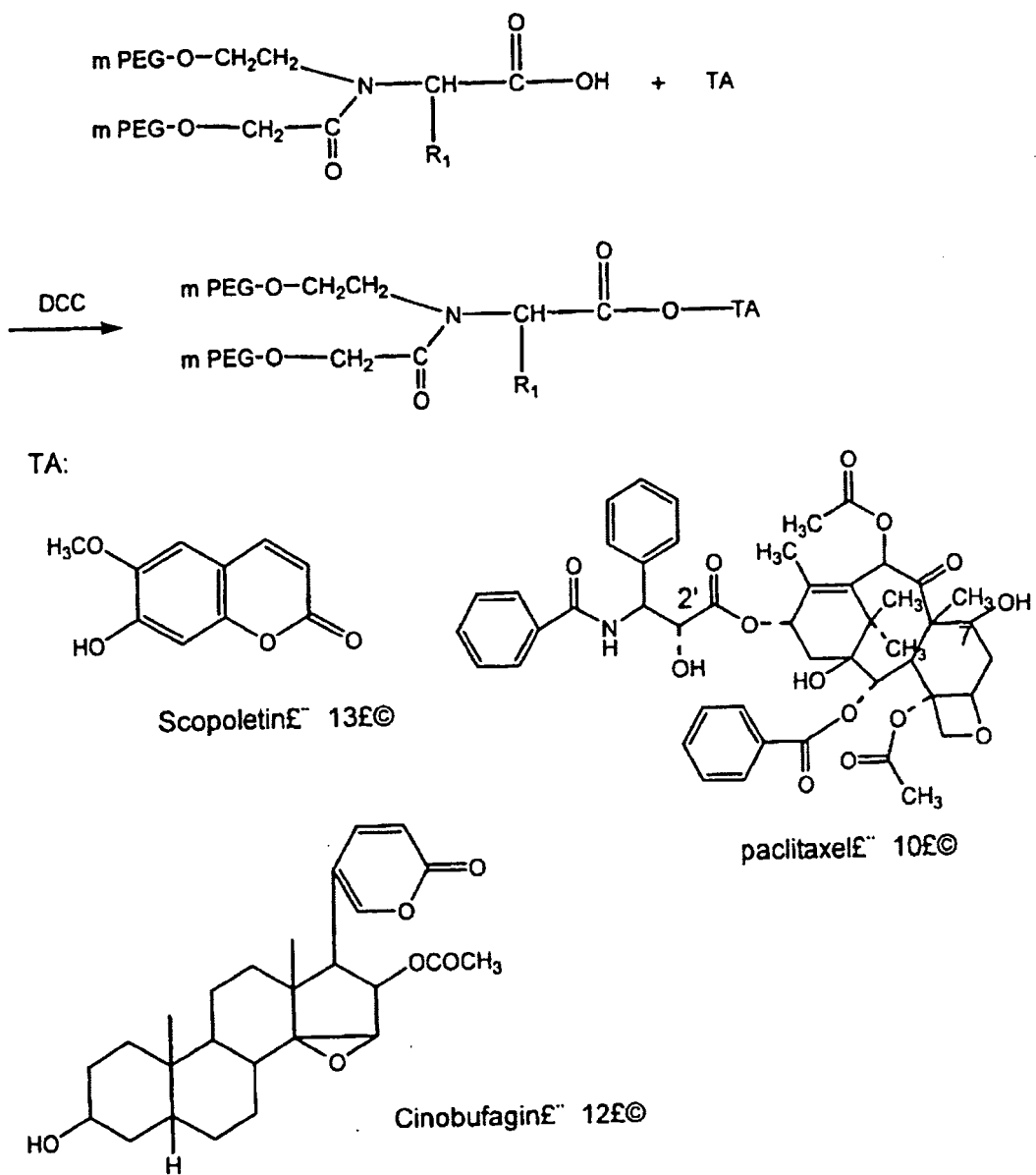


Fig. 5

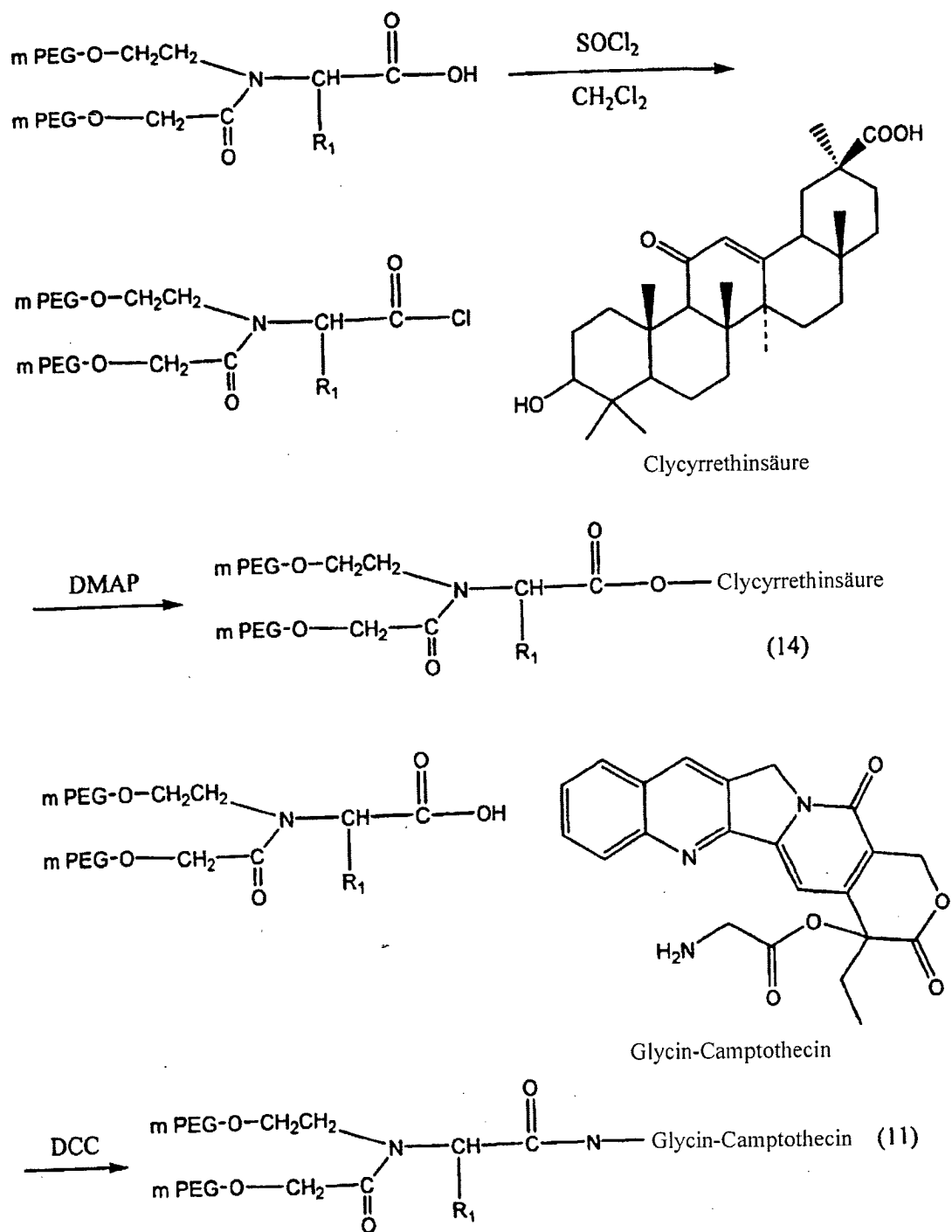
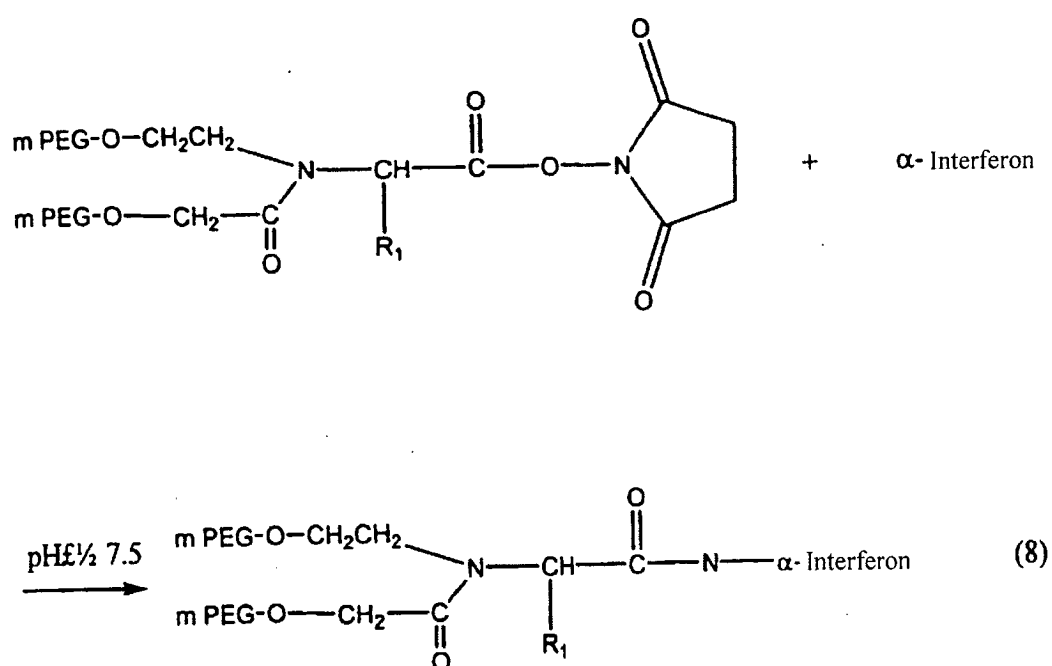


Fig. 6



Figur 7