

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於透明質酸－胺甲蝶呤結合體、及其醫藥用途。

【先前技術】

變形性關節炎（以下亦稱為 OA）會隨著年齡而發病，即所謂退化性疾病的一種。高齡化社會的今天，患者數目逐漸增加中，但對於其診斷法、治療法尚未充分地確立。OA 最初所引起的病態變化被推測為因隨著年齡增加之機械性壓力成為關節軟骨改性與磨耗之原因。此變化以極緩慢的速度徐徐地進行至感到疼痛。

現今的 OA 藥物治療中，作為全身治療法可使用 1) 退燒鎮痛藥劑（乙醯胺酚）、及 2) 非類固醇性消炎藥（以下亦稱為 NSAIDs），作為局部治療法（關節內注入）可使用 3) 透明質酸（以下亦稱為 HA）製劑、及 4) 類固醇製劑。過去既使進行以 NSAIDs 為主的全身治療法，亦無法減輕關節局部疼痛或腫脹的情況時，可進行消炎作用最優良的類固醇製劑之關節內注入法。然而，類固醇製劑有著關節注入症候群（類固醇關節症）或全身性副作用等安全面之問題。因此，取代類固醇製劑的安全關節內注入劑之 HA 製劑的適用性受到重視。

HA 係為 N-乙醯葡萄糖胺與葡萄糖醛酸之重複單位所構成之活體內多醣。HA 作為構成關節液的主成分，可保持

(2)

關節液的黏彈性、荷重吸收作用及潤滑作用。又，對於軟骨基質而言，與軟骨蛋白多醣鍵結後形成稱為蛋白聚醣之聚合物，主要擔任水分保持能與黏彈性之維持的重要角色。

將分子量約 60 萬道爾頓以上的 HA 及其交聯物注入膝關節內時可除去 OA 的疼痛，故 HA 製劑可作為 OA 治療藥劑的一種而廣泛被利用。

又，與正常關節液中的 HA 分子量相近的高分子量型 HA 製劑（商品名 souvenir（註冊商標），製造商：中外製藥股份有限公司）適用於消除日本人的關節風濕（以下亦稱 RA）所引起的膝蓋疼痛。且，HA 的分子量與藥效的強度有關，高分子量型的 HA 比低分子量型的 HA 於持續性上較為優良，而顯示更強的藥效。

一般 HA 製劑係為藉由恢復因 OA（或稱為關節風濕（以下亦簡稱為 RA））症狀所引起的受傷害關節液之黏性與彈性，而消除疼痛。然而，由外部所加入的 HA 製劑於自注入關節液起數日以內雖會消失，但效果可長時間地持續，此可能與上述的關節液之黏彈性改善為相異的機制來除去疼痛。作為如此機制之一，於後述的 OA 滑膜炎具有抑制作用。

且，對於 OA 的疼痛或發炎症狀之發病機制雖有多處未明瞭，但最近對於與軟骨改性所引起的滑膜炎之關連性受到重視。OA 滑膜炎不僅成為關節水症或熱感等疼痛、發炎症之主要原因，亦會促進因細胞素或自由基的產生所

(3)

引起的關節破壞，成爲 OA 發病之主要原因。又，OA 滑膜炎並無如 RA 所見的顯著增殖性變化，但對於滑膜細胞的增殖、血管新生與充血、滑膜下浮腫及纖維化等與 RA 滑膜炎之相通面爲多。如此可有效率地除去 OA 疼痛或發炎，並防止發病的進展來看 OA 滑膜炎之控制極爲重要。

對於滑膜之 HA 作用雖未完全明瞭，但由使用同位素實驗得知，與關節腔比較，HA 較容易長時間聚集於滑膜中。又，已有報告指出構成滑膜組織的滑膜細胞表層具備可辨識 HA 的受體 [CD44 或 RHAMM (receptor for HA-mediated motility)] 存在下，滑膜細胞藉由表層的 CD44 將分子量 200 萬以上的 HA 導入細胞內之機制。由這些得知至少一部份的 HA 疼痛除去作用可能爲藉由對滑膜之作用而表現。然而，HA 製劑的作用並未到達可抑制 OA 滑膜炎所引起的發炎症之程度，對於發炎症狀較強的 OA 或 RA 而言並無決定性之充分效果。

另一方面，作爲抑制滑膜炎之藥物，已知有使用於 RA 治療上稱爲修飾性抗風濕藥劑（以下稱爲 DMARD）之藥物群。其中特別以胺甲蝶呤（以下稱爲 MTX）具有優良的藥效。然而，MTX 僅可使用於全身投予上（現今於日本以醫藥品形式被承認的 RA 治療藥劑僅爲膠囊劑。於日本以外的國家，錠劑與注射劑已被接受），故已知對於治療目的部位之關節以外的部位，其作用機制會引起嚴重的副作用（肝障礙、造血障礙、肺障礙、消化管障礙等）。其結果，對於使用時對於副作用之監視與副作用發病時

(4)

的對策不可或缺。因存在如此副作用之大問題，故對於 MTX 爲主的滑膜炎抑制藥劑，並未確定其可適用於比 RA 輕症狀之 OA 等其他關節疾病上。換言之，若發現可減輕 MTX 的全身性副作用之方法、或僅於藥效表現之必要部位上表現 MTX 作用之方法，其不僅提供一種安全的 RA 治療法，對於廣範圍之關節疾病可使用 MTX。

作爲可減輕 MTX 的副作用，僅可發揮其藥效的方法，至今已嘗試過種種僅將 MTX 作用侷限於關節內或滑膜之方法。例如已有單獨以 MTX 進行局部投予（關節內投予）的方法，MTX 快速由關節消失，故無法充分地揮發其藥效。又，亦有報告記載可藉由脂質體化 MTX，利用經巨噬細胞之吞噬能力而提高關節內貯藏性之方法，但並未確定其臨床上的有用性。如此可減輕關節疾病治療藥的 MTX 之副作用，且可發揮所望藥效的技術性改良爲必須的。

如上述滑膜爲容易聚集 HA 的組織。又，滑膜細胞具備著介由 CD44 等 HA 受體將 HA 導入細胞內之機構。因此，HA 可能作爲將藥物聚集於滑膜之載體。至今，已有報告指出利用 HA 作爲藥物之活體內載體的技術。然而，至今幾乎無以 MTX 作爲代表例的關節疾病治療藥、特別爲適用於控制滑膜炎之藥物運送系統（drug delivery system，以下簡稱爲 DDS）之開創相關技術的應用例。

作爲至今的報告例，例如已知含 HA 的多醣體中藉由肽鏈結合藥物的多醣體－藥物結合體（專利文獻 1：特開

(5)

平 5-39306 號，專利文獻 2：國際公開 WO 94/19376 號等）。這些皆為限定癌組織移動性之抗癌劑的 DDS 技術。

特開平 5-39306 號中以作為抗癌劑之目的使用 MTX，然而由缺乏對癌組織的移動性與長期體內殘留性之特徵來看，欲提高抗癌作用必須提高 MTX 的結合率（實施例為 6.4~19%），且 HA 的分子量為低（實施例中為 10 道爾頓）。又，於 HA 的羧基上以異尿基鍵結合肽鏈，故於水溶液中的安定性較低。

另一方面，已有結合 HA 與藥物之結合體（conjugate）利用於關節疾病治療藥劑之報告。例如，國際公開 WO 99/59603 號（專利文獻 3）中，揭示介由伸丁基胺基（ $-C_4H_8NH-$ ）及伸辛基胺基（ $-C_8H_{16}NH-$ ）等間隔物質（spacer）結合之 HA 與藥物的結合體。該專利文獻中記載，該結合體被設定為細胞外的藥效，藥物以結合狀態下表現藥效者。實際上該結合體中介由間隔物質的藥物與 HA 的結合較為強固，故難適用於如 MTX 無法由結合體游離時則無法發揮其藥效之藥物上。

另外，該專利文獻係關於使用基質金屬蛋白酶阻礙劑（以下亦稱為 MMPI）作為藥物的結合體，所揭示的實施例亦關於與 MMPI 的結合體者。對於使用 MTX 作為藥物之結合體並無具體揭示，亦無記載有關該醫藥的有用性。

國際公開 WO 02/44218（專利文獻 4）中揭示使用 13-胺基-4,7,10-三氧雜十三烯基上更與特殊基（原菠烯）結合的間隔物質，藉由原菠烯與 HA 的羧基之酸酐胺

(6)

鍵結的形成所生成的 HA-藥物結合體。然而，該結合體亦與專利文獻 2 相同，設定為細胞外的藥效者，藥物為結合狀態下表現藥效。因此，故難適用於如 MTX 無法由結合體游離時則無法發揮其藥效之藥物，例如難適用於 MTX 上。且，專利文獻 3 係關於使用 MMPI 作為藥物的結合體者，對於使用 MTX 作為藥物的結合體則完全無記載。

如上所述，上述文獻中對於使用 MTX 的 HA-MTX 結合體完全無記載，對於使用 HA-MTX 結合體作為關節疾病治療藥使用之內容亦無揭示。

又，本發明者已確認作為先前技術已知的 HA-藥物結合物之合成方法，其合成過程中 HA 的分子量會大幅度地降低，而損害到 HA 的藥效。過去的 HA-藥物結合體之合成方法中一般使用有機合成反應條件或後處理條件，但調製高分子量的 HA 與藥物之結合體時必須進一步地改良。

如此作為醫藥品所使用的 HA-藥物結合體，特別適用於關節疾病治療上的高分子量 HA-藥物結合體、使用其之製劑、及該結合體的合成方法至今為未知。

【專利文獻 1】特開平 5-39306 號

【專利文獻 2】國際公開 WO 94/19376 號文獻

【專利文獻 3】國際公開 WO 99/59603 號文獻

【專利文獻 4】國際公開 WO 02/44218 號文獻

(7)

【發明內容】

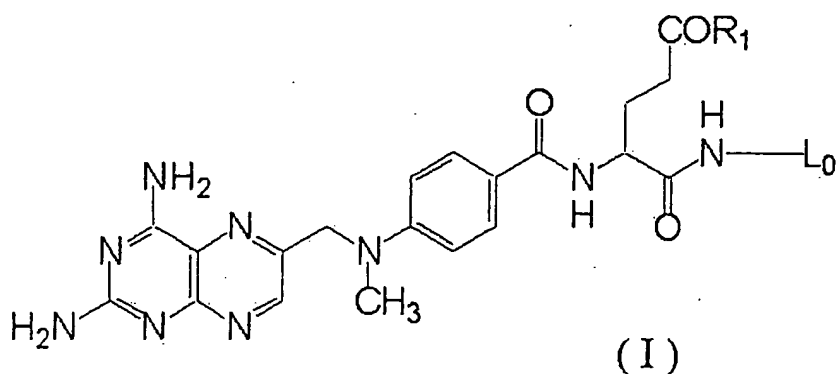
發明所要解決的課題為提供一種適用於關節疾病治療藥劑上的透明質酸－胺甲蝶呤結合體。

本發明者發現於透明質酸的羧基上，介由含有肽鏈連接體與胺甲蝶呤結合，透明質酸－胺甲蝶呤結合體作為關節疾病治療藥時具有卓越的效果，而完成本發明。

即本發明提供一種透明質酸－胺甲蝶呤結合體，其為於透明質酸之羧基上，藉由含有 1~8 個胺基酸所成的肽鏈之連接體 (linker) 與胺甲蝶呤結合者。本發明的另一實施型態為，該連接體為含有 1~8 個胺基酸所成之肽鏈、及可插入 1~5 個氧原子及 / 或可由羧基或 C₁₋₆ 烷氧基羰基取代之 C₂₋₂₀ 伸烷基二胺鏈者。

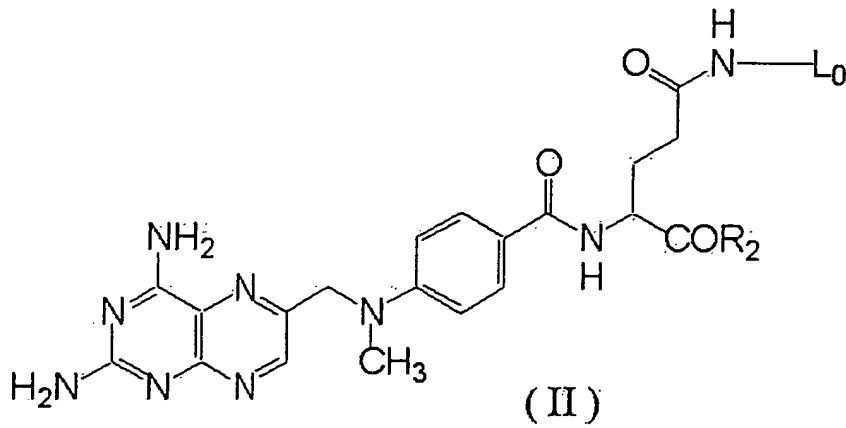
本發明的另一發明為提供一種上述的透明質酸－胺甲蝶呤結合體，其中結合於連接體的胺甲蝶呤為式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 表示者；

〔化 1〕

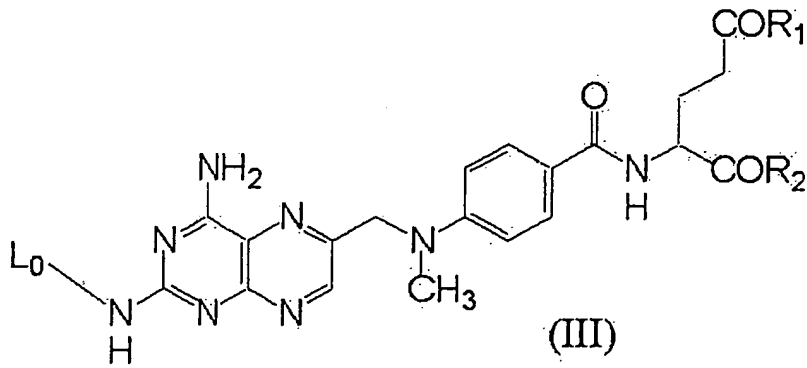


(8)

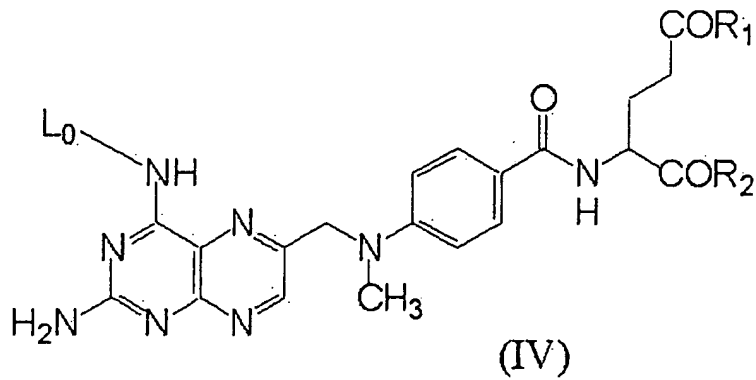
〔化 2〕



〔化 3〕



〔化 4〕



〔式中， R_1 及 R_2 表示各自獨立的羥基、胺基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基胺基、或二- C_{1-6} 烷基胺基；

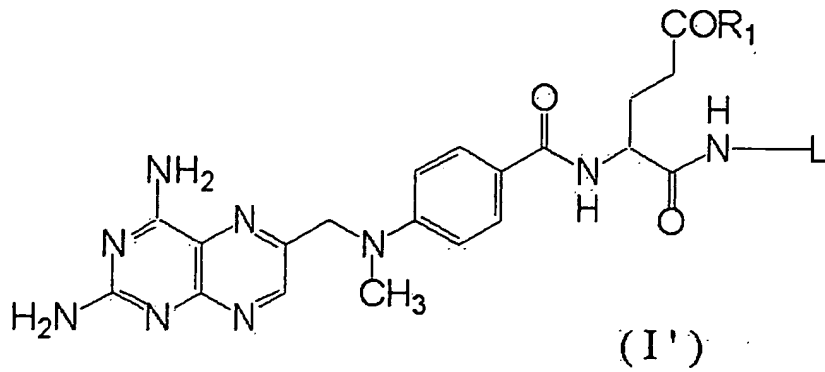
L_0 表示連接體的結合位置〕。

本發明的另一發明為提供上述的之透明質酸-胺甲蝶

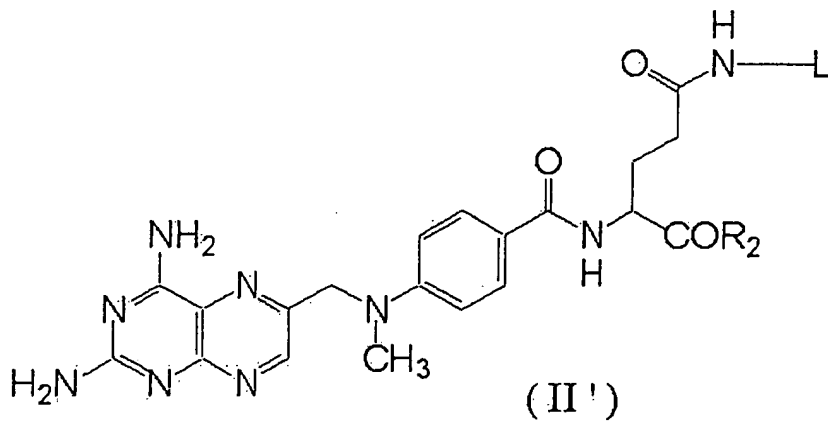
(9)

呤結合體，其中含有肽鏈之連接體及於該連接體所結合的
胺甲蝶呤為，式 (I') 或 (II') 所示者；

〔化 5〕



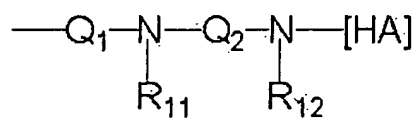
〔化 6〕



〔式中， R_1 及 R_2 表示各自獨立的羥基、胺基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基胺基、或二- C_{1-6} 烷基胺基；

L 表示式 (X)

〔化 7〕



(X)

〔式中， Q_1 與所結合的 —NH— 一起形成 1~8 個胺基酸所
成之肽鏈，含於該肽鏈的胺基酸之各殘基可獨立由 1 個以

(10)

上選自 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基羰基、C₁₋₆ 烷氧基羰基、甲醯基、C₁₋₆ 烷基磺醯基、及可被取代之 C₆₋₁₀ 芳基磺醯基所成群之基取代或保護，含於該肽鏈之各醯胺鍵可獨立由 1 個以上選自 C₁₋₆ 烷基及 / 或 C₁₋₆ 烷基羰基於氮原子上取代，含於該殘基的各羧基可獨立由 1 或 2 個 C₁₋₆ 烷基取代或亦可轉換成醯胺基；

R₁₁ 及 R₁₂ 表示各自獨立的氫原子或 C₁₋₆ 烷基；

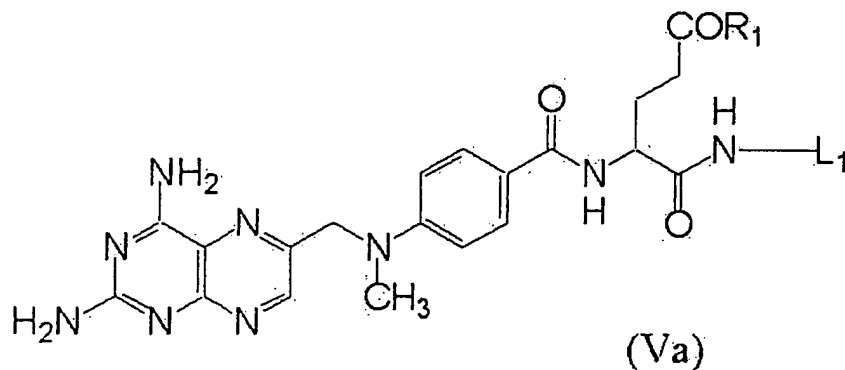
Q₂ 表示 C₂₋₂₀ 伸烷基，該伸烷基可插入 1~5 個氧原子、及 / 或可由羧基或 C₁₋₆ 烷氧基羰基取代；

[HA] 表示與透明質酸之結合位置，該連接體與含於該透明質酸的羧基形成醯胺鍵結) 所表示的連接體]。

本發明的另一發明為提供一種醫藥組成物、及關節疾病治療藥，其為含有上述透明質酸-胺甲蝶呤結合體作為有效成分者。

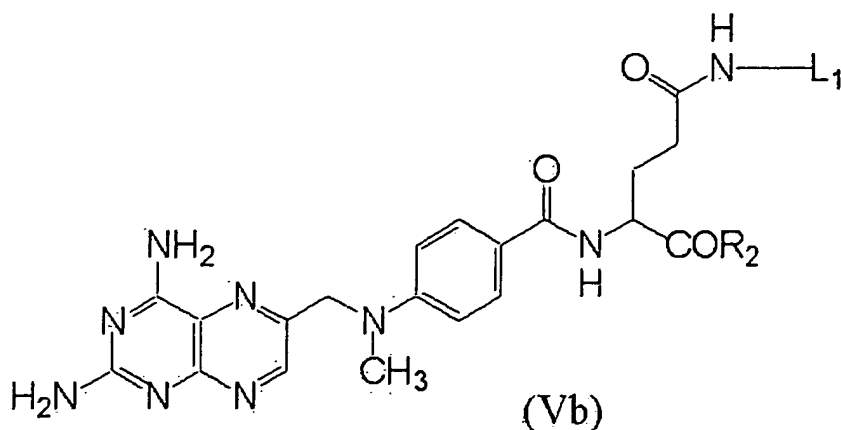
本發明的另一發明為提供一種化合物或其鹽，其徵為式 (Va) 或 (Vb) 所示者；

[化 8]



(11)

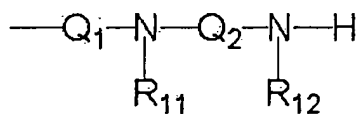
〔化 9〕



〔式中， R_1 及 R_2 表示各自獨立的羥基、胺基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基胺基、或二- C_{1-6} 烷基胺基；

L_1 表示式 (X')

〔化 10〕



(X')

〔式中， Q_1 與所結合的 $-NH-$ 一起形成 1~8 個胺基酸所成之肽鏈，含於該肽鏈的胺基酸之各殘基可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、甲醯基、 C_{1-6} 烷基磺醯基、及可被取代之 C_{6-10} 芳基磺醯基所成群之基取代或保護，含於該肽鏈之各醯胺鍵可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基及 / 或 C_{1-6} 烷基羰基於氮原子上取代，含於該殘基的各羧基可獨立由 1 或 2 個 C_{1-6} 烷基取代或亦可轉換成醯胺基；

R_{11} 及 R_{12} 表示各自獨立的示氫原子或 C_{1-6} 烷基；

Q_2 表示 C_{2-20} 伸烷基，該伸烷基可插入 1~5 個氧原子、

(12)

及 / 或可由羧基或 C₁₋₆ 烷氧基羰基取代)] 。

本發明的另一發明為提供一種上述透明質酸 - 胺甲蝶呤結合體之製造方法，其為含有將式 (Va) 或 (Vb) 所表示的化合物與透明質酸進行反應，該透明質酸的羧基轉換成 N- 取代醯胺基之步驟。

以下對本發明做詳細說明。

本發明的透明質酸 - 胺甲蝶呤結合體 (HA - MTX 結合體) 係為新穎化合物。本發明中作為透明質酸 (HA) 與胺甲蝶呤 (MTX) 結合之方法，可藉由採用於 HA 的羧基上，介由含有肽鏈之連接體與 MTX 結合的結構，得到可保持 HA 的疼痛去除作用，且同時具有 MTX 的滑膜減輕作用之 HA - MTX 結合體。即，本發明的 HA - MTX 結合體於滑膜聚集後，導入滑膜細胞內，於細胞內表現 MTX 的藥效。

因此，將本發明的 HA - MTX 結合體投予於 OA 或 RA 患者之關節內時，與過去的 HA 製劑一樣，可表現 HA 所具有特有疼痛除去作用下，可一邊聚集於滑膜組織，一邊徐徐地導入滑膜細胞內，藉由解離 MTX 可持續地表現滑膜炎抑制作用。因此，與經口投予相比 MTX 的投予量可大幅度地減少，減輕因經口投予產生問題之全身性副作用。又，對於投予部位，HA 製劑與 MTX 兩者為表現相異作用機制之藥理效果，故期待兩者之間的相乘藥效。

即，可藉由本發明的 HA - MTX 結合體，不僅具有作為關節注入劑的 HA 之作用，且僅投予於關節內時可安全

(13)

下表現 MTX 之滑膜炎抑制作用，故提供一種過去未有的優良關節疾病治療藥。

本發明的透明質酸 - 胺甲蝶呤結合體 (HA - MTX 結合體) 係為，於透明質酸之羧基上，藉由含有肽鏈之連接體與胺甲蝶呤結合者。

本發明所謂的「透明質酸 (HA)」，並無特別限定，但例如可具有平均分子量為 5 萬 ~ 1000 萬道爾頓之葡糖醛酸與 N - 乙醯葡糖胺所成之二醣聚合物。透明質酸的鹽雖無特別限定，例如含有鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鋁鹽、鋅鹽、鐵鹽、銨鹽、四丁銨鹽等。透明質酸及其鹽、與這些混合物之具體例子，例如可舉出商品名 斯貝尼路 (註冊商標：製造販賣商 中外製藥股份有限公司)；商品名 愛路茲 (註冊商標：製造 生化學工業股份有限公司，販賣商 科研製藥股份有限公司)；商品名 歐貝剛 (註冊商標：製造 生化學工業股份有限公司，販賣商 科研製藥股份有限公司) 等。本發明的「透明質酸衍生物」係為具有由 HA 衍生之 HA 骨架的物質。作為透明質酸衍生物，雖無特別限定，可舉出 HA 中一個以上之羧基被酯化的物質 (例如，苯甲基酯化 HA (商品名 Hyaff (註冊商標)、Fidia Advanced Biopolymers))、HA 以甲醛交聯且高分子化的物質 (例如，商品名 Synvise (註冊商標)、Biomatrix))、HA 中 1 個以上的羥基被乙醯化之乙醯化 HA 等。

本發明的 HA - MTX 結合體為欲不損害 HA 的疼痛除

(14)

去作用，作為 HA-MTX 結合體，其可保持於臨床上疼痛除去作用已被確認的 HA 同等之分子量尺寸與黏彈性者為佳。又，分子量若過大則黏彈性會提高使得處理操作難以進行，及若考慮到作為活體內載體之 HA 的效果，具體而言以作為 HA-MTX 結合體之分子量為 60 萬～600 萬道爾頓為佳，作為 HA-MTX 結合體之分子量為 80 萬～600 萬道爾頓為較佳，作為 HA-MTX 結合體之分子量為 100 萬～500 萬道爾頓為特佳。

其中，上述的原料 HA 的分子量、及 HA-MTX 結合體的分子量係由極限黏度算出黏度平均分子量之方法進行測定所得者。由極限黏度 ($[\eta]$) 算出黏度平均分子量 (M_w) 時可使用下述算式。

$$M_w = ([\eta] / 0.00036)^{1.282}$$

本發明的含肽鏈之連接體的肽鏈係由胺基酸所構成。該胺基酸係含有甘胺酸、丙胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、蘇胺酸、胱胺酸、亮胺酸、異亮胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、離胺酸、麩醯胺、麩胺酸、蛋胺酸、組胺酸、苯基丙胺酸、精胺酸、酪胺酸、色胺酸等天然 α -胺基酸等，其他亦含有具有烷基側鏈的 α -胺基酸（例如戊胺酸、己胺酸、第三亮胺酸等）、以環烷基取代之丙胺酸或甘胺酸（例如環戊基丙胺酸、環己基丙胺酸、環己基甘胺酸等）、或以芳基取代之丙胺酸或甘胺酸（例如吡啶丙胺酸、噻吩基丙胺酸、萘基丙胺酸、取代苯基丙胺酸、苯基甘胺酸等）等非天然 α -胺基酸、 β -丙胺酸等之 β -胺基酸

(15)

、 γ -氨基丁酸等 γ -胺基酸、及牛磺酸等胺基磺酸等。本發明的連接體肽之胺基酸亦包含殘基受到適當取代或保護者。例如該殘基上的官能基為使用保護基所保護者。其目的所使用的保護基為該技術領域中公知者，其一部份的例子記載於本說明書其他段落中。各取代基及保護基、特別為保護基的導入方法，可使用於該技術領域中為公知者。

該連接體可僅由胺基酸所構成、或亦可包含來自肽鏈中或末端上來自胺基酸以外的部份。例如伸烷基二胺、嗎伸烷基二胺之二胺化合物或如琥珀酸之二羧酸化合物於肽鏈中或末端結合者等亦含於該連接體中。肽鏈之中或末端上含有胺基酸以外的化合物下，該連接體結合於 MTX 之羧基與透明酸的羥基時，如伸烷基二胺、嗎伸烷基二胺之二胺化合物存在於肽鏈的末端為佳，特別為 4, 7, 10-三嗎-1, 13-三癸基二胺存在於肽鏈的末端為佳。又，構成肽鏈的胺基酸雖無特別限定，但由對蛋白酶的親合性觀點來看， α -胺基酸為佳，結合於含有肽鏈的連接體之 MTX 的末端為 α -胺基酸為佳。

構成該肽鏈的胺基酸數目，雖無特別限定，但典型為 1~8，較佳為 1~6，特佳為 1~4。構成該肽鏈之胺基酸各殘基可獨立地由 1 個以上的基進行適當的取代或保護。如此基可舉出 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷氧基羰基（例如甲氧基羰基、乙氧基羰基、（正或異）丙基氧基羰基、及（正、第二或第三）丁氧基羰基）、甲醯基、

(16)

C_{1-6} 烷基磺醯基（例如甲磺醯基、乙磺醯基、及（正或異）丙磺醯基）、可被取代之 C_{6-10} 芳基磺醯基（例如，苯磺醯基、（鄰、間或對）甲苯磺醯基、及（1-或2-）萘磺醯基），但不僅限定於此。例如藉由取代或保護，含於該殘基的羧基可轉換成 C_{1-6} 烷氧基羰基、羥基可轉換成 C_{1-6} 烷氧基或 C_{1-6} 烷基羰基氧基、胺基可轉換成 C_{1-6} 烷基胺基、二 C_{1-6} 烷基胺基、 C_{1-6} 烷基羰基或 $N-C_{1-6}$ 烷基 - C_{1-6} 烷基羰基胺基。又，含於該殘基的羧基可轉換成可由 1 或 2 個 C_{1-6} 烷基所取代之醯胺。該殘基中含有如吡啶環或咪唑環等含氮雜環時，該環上的氮原子亦可各自獨立由 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基羰基保護。該殘基中存在脈基時，含於其中的氮原子亦可由 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基羰基保護。作為對氮原子的其他保護基，雖無特別限定但亦可選自如上述的 C_{1-6} 烷氧基羰基、甲醯基、 C_{1-6} 烷基磺醯基、可被取代之 C_{6-10} 芳基磺醯基之一般使用者。硫醇基含於該殘基時，可由 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基羰基保護。又，含於該肽鏈的醯胺鍵或肽鍵，其氮原子上亦可由 C_{1-6} 烷基及 / 或 C_{1-6} 烷基羰基取代，例如亦可轉換成 $-CON(C_{1-6} \text{ 烷基})-$ 。

構成肽鏈的胺基酸序列雖無特別限定，但例如可舉出以下者。且存在著作為標的之活體內蛋白酶，其基質辨識胺基酸為已知時，亦可使用含有其辨識部位及 / 或切斷部位之胺基酸。

1 個胺基酸所成的肽鏈：Ala、Arg、Asn、Asp、Cys

(17)

、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、等。較佳爲、Phe、Tyr、Ile、Glu。

2 個胺基酸所成的肽鏈：PhePhe、PheGly、PheLeu、TyrPhe、TrpPhe、PheTrp、PheTyr、GlyPhe、GlyGly、等。較佳爲、PhePhe、PheGly。

3 個胺基酸所成的肽鏈：PheGlyGly、PheLeuGly、PhePheGly、AsnPhePhe、GlyPhePhe、LeuPhePhe、LeuAlaLeu、AlaValAla、GlyAlaPhe、GlyPheAla、GlyIleAla、GlyIlePhe、GlyLeuAla、GlyValAla、GlyValPhe、GlyGlyGly、等。較佳爲、AsnPhePhe。

4 個胺基酸所成的肽鏈：GlyPheLeuGly、GlyPhePheLeu、GlyPhePheAla、GlyPheTyrAla、GlyPheGlyPhe、GlyPheGlyGly、GlyGlyPheGly、GlyGlyPheTyr、GlyGlyGlyGly、LeuAlaLeuAla、AlaLeuAlaLeu、AlaGlyValPhe、GluAsnPhePhe、等。較佳爲、GlyPheLeuGly。

本發明的連接體例如亦可具有上述式 (X) 所示的結構，此時 Q1 與所結合的 -NH- 一起形成如上述的 1~8 的胺基酸所成的肽鏈。又，Q2 可插入 1~5 個氧原子，或可由羧基或 C₁₋₆ 烷氧基羰基所取代之 C₂₋₂₀ 伸烷基。Q2 的具體例子爲乙 - 1，2 - 二基、丙 - 1，3 - 二基、丁 - 1，4 - 二基、戊 - 1，5 - 二基、己 - 1，6 - 二基、庚 - 1，7 - 二基、辛 - 1，8 - 二基、壬 - 1，9 - 二基、癸 - 1，10

(18)

—二基、2-甲基丙-1, 3-二基、2-甲基丁-1, 4-二基、3-甲基丁-1, 4-二基、3-甲基戊-1, 5-二基、3-乙基戊-1, 5-二基、2-甲基己-1, 6-二基、3-甲基己-1, 6-二基、4-甲基庚-1, 7-二基、3-噶庚-1, 5-二基、3-噶己-1, 6-二基、4-噶己-1, 6-二基、3-噶庚-1, 7-二基、4-噶庚-1, 7-二基、4-噶辛-1, 8-二基、3, 6-二噶辛-1, 8-二基、3, 6-二噶壬-1, 9-二基、3, 6-二噶-4-甲基壬-1, 9-二基、4, 7-二噶癸-1, 10-二基、4, 9-二噶十二烷-1, 12-二基、4, 7, 10-三噶三癸-1, 13-二基等，較佳爲乙-1, 2-二基、戊-1, 5-二基、3-噶戊-1, 5-二基、3, 6-二噶辛-1, 8-基、4, 7-二噶癸-1, 10-二基、4, 9-二噶十二烷-1, 12-二基、4, 7, 10-三噶十三烷-1, 13-二基等。

本發明的 HA-MTX 結合體僅爲於 HA 之羧基上介由含有肽鏈的連接體結合 MTX，該連接體與該透明質酸以酸醯胺鍵結合者，任意結合方式皆可。即，含有肽鏈的連接體爲

1) MTX 的 α 位羧基；

2) MTX 的 γ 位羧基；及

3) MTX 的與胺基結合者，且這些結合方式爲複數混合存在（例如，MTX 的 α 位之羧基所鍵結的結合體，與 MTX 的 γ 位羧基所鍵結的結合體混合存在）亦可。對於蛋白酶之親合性與合成上的觀點來看，與含有肽鏈的連接

(19)

體 MTX 的 α 位之羧基及 / 或 γ 位的羧基結合為佳，該連接體與 MTX 的 α 位之羧基結合為較佳。

本發明的 HA - MTX 結合體中，含有肽鏈的連接體及其結合形式之特佳者為，含有肽鏈的連接體中 α - 胺基所成之肽鏈末端存在著二胺化合物者，該肽鏈的 N 末端為 MTX 的 α 位之羧基上由酸醯胺鍵結合，該肽鏈 C 末端為介由二胺化合物由 HA 的羧基與酸醯胺鍵結結合者。

本發明的透明質酸 - 胺甲蝶呤結合體中胺甲蝶呤 (MTX) 部分為，經由連接體修飾以外，亦可介由公知方法進行前驅藥物化。

本發明的 C_{1-6} 烷基為，碳數 1~6 的直鏈或支鏈狀烷基，例如包含甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、3-甲基丁基、2-甲基丁基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、及正戊基等。

本發明的 C_{1-6} 烷基羰基為，碳數 1~6 的直鏈或支鏈狀烷基的烷基羰基，例如含有具有乙醯基、丙醯基、2-甲基丙醯基、2,2-二甲基丙醯基等已定義的烷基作為烷基部分者。

本說明書中， C_{1-6} 烷氧基表示碳數 1~6 的直鏈或支鏈狀的烷氧基，例如含有具有甲氧基、乙氧基、正丙氧基等已定義的烷基作為烷基部分者。

本說明書中， C_{1-6} 烷基胺基表示碳數 1~6 的直鏈或支鏈狀之烷基胺基，例如含有具有甲胺基、乙胺基、正丙胺基等已定義的烷基作為烷基部分者。

(20)

本說明書中，二 C₁₋₆ 烷基胺基表示碳數 1~6 的直鏈或支鏈狀之二烷基胺基，例如含有具有二甲胺基、乙基甲胺基、二乙基胺基、乙基正丙胺基等，可相同或相異之已定義的烷基作為烷基部分者。

本說明書中，C₂₋₂₀ 伸烷基表示碳數 2~20 的直鏈或支鏈狀之伸烷基，例如含有伸乙基、伸丙基、伸丙基、伸丁基、伸辛基、伸癸基等。

本說明書中，C₁₋₆ 烷氧基羰基表示碳數 1~6 的直鏈或支鏈狀的烷氧基羰基，例如含有具有甲氧基羰基、乙氧基羰基、正丙氧基羰基等已定義的烷基作為烷基部分者。

本說明書中，C₁₋₆ 烷基磺醯基表示碳數 1~6 的直鏈或支鏈狀之烷基磺醯基，例如含有具有甲磺醯基、乙磺醯基、正丙磺醯基等已定義的烷基作為烷基部分者。

本發明中醯化表示含有 C₁₋₆ 烷基羰基化；及苯醯化，該苯醯基可由 C₁₋₆ 烷基、鹵素原子、C₁₋₆ 烷氧基等所取代。

本發明的 HA-MTX 結合體之 MTX 的結合率以可發揮藥效且可減輕副作用之範圍為佳。本說明書中的 MTX 結合率如下式：

〔化 11〕

$$(\text{MTX 的結合率}(\%)) = \frac{(\text{結合於分子中的MTX部分之數})}{(\text{分子中的N-乙醯葡萄糖胺部分之數})} \times 100$$

所算出。MTX 的結合率雖無特別限定，由藥效表現的觀點來看以 0.5% 以上為佳，1.0% 以上為較佳。另一方面，欲將 MTX 作用侷限於投予部分，減低 MTX 對於全身的副

(21)

作用時，結合率比 10% 小時為佳，又，考慮到本發明的 HA-MTX 結合體的分子量較為大，且 MTX 的結合率若高時會引起不溶化，而對合成產生不良影響時，MTX 的結合率為 0.5% 以上且小於 4.5% 為佳，以 1.0% 以上且 4.5% 以下時為特佳。

本發明的 HA-MTX 結合體可作為鹽類方式存在，但若考慮到其用途以藥學上可被接受的鹽類為佳。例如可舉出鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鋁鹽、鋅鹽、鐵鹽、銨鹽、四丁基銨鹽等。

本發明的 HA-MTX 結合體之合成為，HA、含有肽鏈的連接體、MTX 以適當的順序結合所得。例如構築含有 HA-肽鏈的連接體後導入 MTX 之製程、或構築含有 MTX-肽鏈的連接體後導入 HA 的製程。該各結合反應為使用用於一般酸醯胺鍵結反應之溶劑、與縮合劑、若必須之反應促進性的添加劑，於 $-20^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 的溫度下，經數分鐘～數天反應而進行。作為溶劑例如可舉出水、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、二甲基亞砷、四氫呋喃、二噁烷、甲醇、乙醇、二氯甲烷、氯仿等及這些混合液體。作為縮合劑例如可舉出 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺、二環己基碳化二亞胺、二異丙基碳化二亞胺等碳化二亞胺化合物或苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲胺)磷六氟磷酸酯、O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基糖醛鎗六氟磷酸酯、1-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氫喹啉等。作為

(22)

反應促進性的添加劑，例如可舉出 N-羥基琥珀銑醯亞胺基、N-羥基-5-原菠稀-2,3-羧基亞胺基、1-羥基苯并三唑基、1-羥基-7-氮雜苯并三唑、3,4-二氫-3-羥基-4-氧代-1,2,3-苯并三唑等活性酯劑、或三乙胺、N-甲基嗎啉、N,N-二異丙基乙胺、三〔2-(2-甲氧基乙氧基)乙基〕胺等 pH 調整劑。反應時胺基側鏈等官能基，例如羥基、羧基、胺基等因應必須可使用一般泛用於有機合成的保護基。

於此預防止 HA 分子量的降低，由可容易控制複合化反應之觀點來看，構築含有 MTX-肽鏈之連接體後導入 HA 的製程為佳，溶劑可為水、N,N-二甲基甲醯胺、四氫呋喃、乙醇、及這些混合液為佳，水與四氫呋喃的混合液為最佳，其混合比率為 1:1 為最佳。縮合劑為水溶性者為佳，以 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺為最佳，其添加量為對 HA 中的羧基而言為 0.1 當量為最佳。反應促進性添加劑為，作為活性酯劑以 3,4-二氫-3-羥基-4-氧代-1,2,3-苯并三唑為最佳，其添加量為對 HA 中的羧基而言為 0.1 當量為最佳。作為 pH 調整劑，以三〔2-(2-甲氧基乙氧基)乙基〕胺為最佳，反應時的 pH 為 6~7 為最佳。又，反應溫度為 -10°C ~ 30°C 為佳，0°C ~ 15°C 為最佳。反應時間為 1 小時 ~ 48 小時為佳，12 小時 ~ 24 小時為最佳。

本發明中所謂「關節疾病」具體而言為關節軟骨損害、變形性關節症（含有原因不明的一次性疾病、與原因已

(23)

確認的二次性疾病)、肩關節周圍炎、風濕性關節炎、反應性關節炎、病毒性關節炎、化膿性關節炎、結核性關節炎、神經性關節炎等疾病，且包含這些疾病所引起的關節痛(例如關節風濕之膝關節疼痛等)。又，「關節疾病治療藥」不僅為前述關節疾病的治療所使用的藥劑，亦包含使用於預防的藥劑、疾病狀態進展抑制(惡化的防止或現狀維持)等之藥劑。

本發明的 HA-MTX 結合體系為，該有效量中添加適宜且製藥上可被接受的載體、賦形劑、崩壞劑、滑澤劑、結合劑、香料、著色劑等作為醫藥組成物使用。本發明的 HA-MTX 結合體作為有效成分的醫藥組成物作為關節疾病治療藥使用為佳，其中以作為關節局部投予製劑使用為特佳。

本發明的 HA-MTX 結合體作為關節疾病治療藥劑進行製劑化時，雖無特別限定，但可舉出生理食鹽水或磷酸生理食鹽水等中溶解至所望濃度，作為注射用製劑而製劑化者。此時，若必要可藉由添加酸或鹼而使溶劑調整至所望酸鹼度。又，添加如鈉鹽、鉀鹽等 1 價金屬鹽、鎂鹽、鈣鹽、錳鹽等 2 價金屬鹽等無機鹽類，調整溶液至所望的鹽濃度。且，若必要可添加安定化劑等。亦可將如此經調整之溶解本發明 HA-MTX 結合體之溶液，預先填充於定量注射筒等注射器之形式下流通。將以本發明 HA-MTX 結合體作為有效成分之關節疾病治療藥劑進行投予時，本發明 HA-MTX 結合體為 0.01% ~ 10% w/v 的溶液濃度

(24)

，較佳為 0.1% ~ 2.0% w/v 的溶液濃度，特佳為 0.5% ~ 1.5% w/v 的溶液濃度者，可以 1 次 1~3 ml 的量投予於患者。但該投予量依據醫師指示、投予對象之患者、或疾病種類或其嚴重度、或 HA-MTX 結合體的分子量等，適宜地增減各最適的投予量。

本發明的 HA-MTX 結合體如下的實施例所說明，於膝關節發病之關節炎模型進行關節內投予時，可表現未於 HA 所見到的滑膜炎減輕作用。且本發明者發現，將此滑膜炎症狀的減輕作用與低分子（分子量為 30 萬道爾頓）的 HA-MTX 結合體比較時，發現於 60 萬道爾頓以上，特別為分子量為 80 萬道爾頓以上之 HA-MTX 結合體可表現極高效果。

【實施方式】

〔實施例〕

本發明由下述實施例作更詳細說明，但本發明未僅限定於這些實施例。

〔實施例 1-1〕

2 - [N - [N - [N - [4 - [[(2, 4 - 二胺基 - 6 - 蝶啶基) 甲基] 甲基胺基] 苯甲醯基] - α - (O5 - 甲基谷胺醯基)] 苯基丙氫醯基] 苯基丙氫醯基胺基] 乙基胺
 : MTX - α - PhePhe - NH - C₂H₄ - NH₂ (化合物 1) 的製造

(25)

(a) Cbz-Phe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物 1a) 的製造

將 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸 (Cbz-Phe: 7.16 g, 25.4 mmol) 與 N-第三丁氧基羰基-仲乙基二胺鹽酸鹽 (5.00 g, 25.4 mmol) 與 1-羥基苯并三唑基水合物 (HOBT: 4.28 g, 28.0 mmol) 與 N-甲基嗎啉 (NMM: 3.07 mL, 28.0 mmol) 溶解於 100 mL 的二甲基甲醯胺 (DMF), 冰浴攪拌下加入 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC: 5.36 g, 28.0 mmol), 室溫下攪拌 1 天。反應液中加入 10% 檸檬酸水溶液, 將析出的固體溶解於氯仿與少量的甲醇中, 以飽和碳酸氫鈉水、飽和食鹽水洗淨後, 以硫酸鈉乾燥。經減壓濃縮所得之殘渣以矽膠管柱層析法 (溶離溶劑 氯仿: 甲醇 = 95:5) 純化, 得到 9.69 g 的白色固體的標題化合物。

¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆): δ 1.37 (9H, s), 2.69–3.19 (6H, m), 4.12–4.22 (1H, m), 4.93 (2H, dd, J = 12.9 Hz, J = 15.1 Hz), 6.75 (1H, br.t), 7.22–7.33 (10H, m), 7.48 (1H, d, J = 8.6 Hz), 8.05 (1H, br.t)

LC/MS: 441.9 (M + H⁺) 464.1 (M + Na⁺)

(b) Cbz-PhePhe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物 1b) 的製造

將化合物 1a (9.69 g, 21.9 mmol) 溶解於 200 mL 的

(26)

甲醇，加入 500 mg 的 10% 鈀碳素，於氫氣環境下室溫中攪拌 1 天。過濾反應混合物除去觸媒後減壓濃縮。將該殘渣與 Cbz-Phe (6.92 g, 23.1 mmol) 與 HOBT (3.17 g, 24.2 mmol) 與 NMM (2.66 mL, 24.2 mmol) 溶解於 50 mL 的二甲基甲醯胺 (DMF)，冰浴攪拌下加入 EDC (4.64 g, 24.2 mmol)，室溫下攪拌 1 天。反應液中加入水，以 10% 檸檬酸水溶液、飽和碳酸氫鈉水、水洗淨後乾燥。所得之殘渣以矽膠管柱層析法 (溶離溶劑 氯仿：甲醇 = 90：10) 純化，得到 12.8 g 的白色固體的標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) : δ 1.37 (9H, s), 2.62 - 3.18 (8H, m), 4.18 - 4.29 (1H, m), 4.40 - 4.51 (1H, m), 4.93 (2H, s), 6.72 (1H, br.t), 7.10 - 7.32 (15H, m), 7.46 (1H, d, $J = 8.6\text{Hz}$), 7.97 (1H, br.t), 8.11 (1H, d, $J = 7.9\text{Hz}$)

LC/MS : 588.8 ($M + H^+$) 611.1 ($M + Na^+$)

(c) Cbz-Glu(OMe)PhePhe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物 1c) 的製造

將化合物 1b (11.1 g, 18.9 mmol) 溶解於 800 mL 的甲醇與 50 mL 的 DMF 與 500 mL 的 THF，加入 1.00 g 的 10% 鈀碳素，氫氣環境下室溫中攪拌 1 天。由反應混合過濾觸媒後，減壓濃縮。將該殘渣與 N-碳化苯甲酯基-L-谷胺酸- γ -甲酯 (Cbz-Glu(OMe) : 5.58 g, 18.9

(27)

mmol) 與 HOBt (3.18 g, 20.8 mmol) 與 NMM (2.29 mL, 20.8 mmol) 溶解於 100 mL 的 DMF, 冰浴攪拌下 EDC (3.99 g, 20.8 mmol), 於室溫中攪拌 2 天。冰浴攪拌下反應液中加入 10% 檸檬酸所產生的沈澱以 5% 碳酸氫鈉、水洗淨後, 以矽膠管柱層析法 (溶離溶劑 氯仿: 甲醇 = 10:1) 純化, 加入甲醇後產生沈澱, 得到 11.1 g 的白色粉末的標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) : δ 1.36 (9H, s)、1.64 – 1.80 (2H, m)、2.17 – 2.23 (2H, m)、2.76 – 3.12 (8H, m)、3.56 (3H, s)、3.93 – 4.03 (1H, m)、4.40 – 4.58 (2H, m)、5.00 (2H, s)、6.68 (1H, br.t)、7.18 – 7.44 (16H, m)、7.84 – 7.90 (2H, m)、8.19 (1H, d, $J = 7.7\text{Hz}$)

LC/MS : 732.4 ($M + H^+$)、754.4 ($M + Na^+$)

(d) MTX- α -PhePhe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物 1d) 的製造

將化合物 1c (348 mg, 0.476 mmol) 懸浮於 10 mL 的甲醇與 10 mL 的四氫呋喃, 加入 33 mg 的 10% 鈀碳素, 於氫氣環境下室溫中攪拌 1.5 小時。由反應混合物過濾觸媒後減壓濃縮。將該殘渣與 4-[N-(2,4-二胺基-6-蝶啶基)-N-甲胺]安息香酸 (197 mg, 0.547 mmol) 與 HOBt (76 mg, 0.499 mmol) 溶解於 4 mL 的 N-甲基吡咯烷酮 (NMP), 冰浴攪拌下加入 N-甲基嗎啉

(28)

(MM, 55 μ L, 0.499 mmol) 與 EDC (105 mg, 0.547 mmol), 室溫中攪拌 4 天。反應液中加入 5% 碳酸氫鈉所產生的沈澱以矽膠管柱層析法 (溶離溶劑 氯仿 : 甲醇 = 10 : 1) 純化, 再以胺矽膠 (NH-DM100, 100-200 mesh, 富士西里西亞化學股份有限公司製) 管柱層析法 (溶離溶劑 氯仿 : 甲醇 = 10 : 1) 純化, 得到 362 mg 的黃色粉末之標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) : δ 1.35 (9H, s), 1.78-1.94 (2H, m), 2.23 (2H, m), 2.69-3.10 (8H, m), 3.22 (3H, s), 3.55 (3H, s), 4.27-4.52 (3H, m), 4.79 (2H, s), 6.63 (2H, br.s), 6.70 (1H, br.t), 6.82 (2H, d, $J = 8.9\text{Hz}$), 7.06-7.25 (10H, m), 7.46 (1H, br.s), 7.66-7.88 (5H, m), 8.06-8.17 (2H, m), 8.56 (1H, s)

LC/MS : 905.5 (M + H⁺)

(e) MTX- α -PhePhe-NH-C₂H₄-NH₂ (化合物 1)

的製造

化合物 1d (360mg, 0.398 mmol) 中冰浴下加入 5 mL 的三氟乙酸後攪拌 1 小時。反應亦經減壓濃縮後, 將殘渣以胺矽膠管柱層析法 (溶離溶劑 氯仿 : 甲醇 = 10 : 10, 2 次) 進行純化, 得到 275 mg 的黃色粉末的標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) : δ 1.80-1.96 (2H

(29)

、 m) 、 2.20 - 2.28 (2H 、 m) 、 2.45 (2H 、 t 、 J = 6.6 Hz) 、 2.70 - 3.10 (6H 、 m) 、 3.22 (3H 、 s) 、 3.55 (3H 、 s) 、 4.26 - 4.52 (3H 、 m) 、 4.79 (2H 、 s) 、 6.61 (2H 、 br.s) 、 6.82 (2H 、 d 、 J = 8.7 Hz) 、 7.06 - 7.21 (10H 、 m) 、 7.46 (1H 、 br.s) 、 7.65 - 7.73 (3H 、 m) 、 7.85 (1H 、 d 、 J = 8.1 Hz) 、 8.08 - 8.16 (2H 、 m) 、 8.56 (1H 、 s)

LC / MS : 805.3 (M + H⁺)

[實施例 1 - 2]

4, 7, 10 - 三 嘮 - 13 - [N - [N - [N - [4 - { [(2, 4 - 二 胺 基 - 6 - 蝶 啶 基) 甲 基] 甲 基 胺 基] 苯 甲 醯 基] - α - (鄰 5 - 甲 基 谷 胺 醯 基)] 苯 基 丙 氫 醯 基] 苯 基 丙 氫 醯 基 胺 基] 十 三 烯 胺 : MTX - α - PhePhe - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH₂ (化 合 物 2) 的 製 造

(a) Cbz - Phe - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH - Boc (化 合 物 2a)

的 製 造

將 N - 苯 甲 酯 - L - 苯 基 丙 胺 酸 (Cbz - Phe : 852 mg , 2.85 mmol) 與 N - 第 三 丁 氧 基 羰 基 - 4, 7, 10 - 三 嘮 - 1, 13 - 十 三 烷 二 胺 (760 mg , 2.37 mmol) 與 1 - 羥 基 苯 并 三 唑 基 水 合 物 (HOBT : 363 mg , 2.37 mmol) 與 6 mL 的 二 甲 基 甲 醯 胺 (DMF) , 冰 浴 攪 拌 下 加 入 1 - 乙 基 - 3 - (3 - 二 甲 基 胺 基 丙 基) 碳 化 二 亞 胺 鹽 酸 鹽 (EDC : 546 mg , 2.85 mmol) , 室 溫 下 攪 拌 2 天 。 反 應 液 中 加 入

(30)

乙酸乙酯、10%檸檬酸水溶液、5%碳酸氫鈉、飽和食鹽水洗淨後以硫酸鈉乾燥。經減壓濃縮所得之殘渣以矽膠管柱層析法（溶離溶劑 二氯甲烷：甲醇 = 100：3）純化，得到 1.35 g 的油狀標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) : δ 1.43 (9H, s)、1.56 – 1.74 (4H, m)、3.06 (2H, d, $J = 6.8\text{ Hz}$)、3.17 – 3.58 (16H, m)、4.30 – 4.39 (1H, m)、4.98 (1H, br)、5.08 (2H, s)、5.50 (1H, br)、6.40 (1H, br)、7.16 – 7.32 (10H, m)

LC/MS : 624.3 ($\text{M} + \text{Na}^+$)

(b) $\text{Cbz-PhePhe-NH-C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{-NH-Boc}$ (化合物 2b) 的製造

將化合物 2a (1.35 g, 2.24 mmol) 溶解於 12 mL 的甲醇，加入 200 mg 的 10% 鈀碳素，於氫氣環境下室溫中攪拌 4 小時。過濾反應混合物除去觸媒後減壓濃縮。將該殘渣與 Cbz-Phe (1.07 g, 3.57 mmol) 與 HOBT (514 mg, 3.36 mmol) 溶解於 10 mL 的 DMF ，冰浴攪拌下加入 EDC (688 mg, 3.59 mmol)，室溫下攪拌 2 天。反應液中加入乙酸乙酯，以 10% 檸檬酸水溶液、5% 飽和碳酸氫鈉水、飽和食鹽水洗淨後以硫酸鈉乾燥。減壓濃縮所得之殘渣以矽膠管柱層析法（溶離溶劑 二氯甲烷：甲醇 = 100：3）純化。加入正己烷後產生白色沈澱物，過濾後得到 1.56 g 的標題化合物。

(31)

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) : δ 1.43 (9H, s) 、 1.60 – 1.78 (4H, m) 、 2.96 – 3.60 (20H, m) 、 4.42 – 4.59 (2H, m) 、 4.96 – 5.07 (3H, m) 、 5.41 (1H, br.d) 、 6.39 (1H, br) 、 6.73 (1H, br.d) 、 7.08 – 7.31 (15H, m)

LC/MS : 771.3 (M + Na⁺)

(c) Cbz-Glu(OMe)PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH-

Boc (化合物 2c) 的製造

將化合物 2b (500 mg, 0.668 mmol) 溶解於 10 mL 的甲醇，加入 150 mg 的 10% 鈀碳素，氫氣環境下室溫中攪拌 1 天。由反應混合過濾觸媒後，減壓濃縮。將該殘渣與 N-碳化苯甲酯基-L-谷胺酸- γ -甲酯 (Cbz-Glu(OMe) : 217 mg, 0.734 mmol) 與 HOBt (102 mg, 0.668 mmol) 與溶解於 5 mL 的 DMF，冰浴攪拌下 EDC (141 mg, 0.734 mmol)，於室溫中攪拌 16 小時。反應液中加入乙酸乙酯，以 10% 檸檬酸水溶液、5% 碳酸氫鈉、飽和食鹽水洗淨後，以硫酸鈉乾燥。減壓濃縮後所得之殘渣以矽膠管柱層析法 (溶離溶劑 二氯甲烷 : 甲醇 = 100 : 5) 純化，加入正己烷後產生白色沈澱，過濾得到 529 mg 的標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6) : δ 1.36 (9H, s) 、 1.50 – 1.85 (6H, m) 、 2.20 (2H, t, J = 7.9Hz) 、 2.70 – 3.10 (8H, m) 、 3.25 – 3.48 (12H, m) 、 3.56 (3H, s

(32)

)、3.93–4.02 (1H、m)、4.20–4.60 (2H、m)、5.00 (2H、s)、6.77 (1H、br.t)、7.10–7.45 (16H、m)、7.82 (1H、br.t、 $J = 6.1\text{Hz}$)、7.91 (1H、d、 $J = 7.9\text{Hz}$)、8.22 (1H、d、 $J = 7.9\text{Hz}$)

LC/MS: 914.3 ($M + \text{Na}^+$)

(d) MTX- α -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH-Boc (化合物 2d) 的製造

將化合物 2c (514 mg, 0.576 mmol) 懸浮於 30 mL 的甲醇，加入 100 mg 的 10% 鈦碳素，於氫氣環境下室溫中攪拌 1.5 小時。由反應混合物過濾觸媒後減壓濃縮。將該殘渣與 4-[N-(2,4-二氨基-6-蝶啶基)-N-甲胺]安息香酸 (281 mg, 0.864 mmol) 與 HOBt (132 mg, 0.864 mmol) 溶解於 5 mL 的 DMF，冰浴攪拌下加入 EDC (166 mg, 0.864 mmol)，室溫中攪拌 2 天。反應液中加入 5% 碳酸氫鈉所產生的沈澱以胺矽膠 (NH-DM1020, 100–200 mesh, 富士西里西亞化學股份有限公司製) 管柱層析法 (溶離溶劑 第 1 次, 二氯甲烷: 甲醇 = 100:7, 第 2 次, 氯仿: 甲醇 = 100:4) 純化, 得到 415 mg 的黃色粉末之標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1.36 (9H、s)、1.48–1.61 (4H、m)、1.81–1.92 (2H、m)、2.24 (2H、t、 $J = 7.9\text{Hz}$)、2.70–3.10 (8H、m)、3.22 (3H、s)、3.25–3.47 (12H、m)、3.54 (3H、s)、4.25–4.50 (

(33)

3H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、br.s)、6.76 – 6.83 (3H、m)、7.06 – 7.24 (10H、m)、7.45 (1H、br.s)、7.67 – 7.80 (4H、m)、7.86 (1H、d、 $J = 8.1\text{Hz}$)、8.09 (1H、d、 $J = 7.4\text{Hz}$)、8.15 (1H、d、 $J = 8.1\text{Hz}$)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 1087.5 ($M + \text{Na}^+$)

(e) MTX- α -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 2) 的製造

化合物 2d (413 mg, 0.388 mmol) 中冰浴下加入 3 mL 的三氟乙酸後攪拌 40 分鐘。反應亦經減壓濃縮後，將殘渣以胺矽膠管柱層析法 (溶離溶劑 二氯甲烷: 甲醇 = 100:7, 2 次) 進行純化，得到 344 mg 的黃色粉末的標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO-d₆) : δ 1.49 – 1.95 (4H、m)、1.81 – 1.92 (2H、m)、2.24 (2H、t、 $J = 7.9\text{Hz}$)、2.70 – 3.10 (8H、m)、3.22 (3H、s)、3.25 – 3.47 (12H、m)、3.54 (3H、s)、4.25 – 4.50 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、br.s)、6.76 – 6.83 (3H、m)、7.06 – 7.24 (10H、m)、7.45 (1H、br.s)、7.83 (1H、br.t、 $J = 5.8\text{Hz}$)、8.01 (1H、d、 $J = 7.9\text{Hz}$)、8.09 (1H、d、 $J = 7.1\text{Hz}$)、8.15 (1H、d、 $J = 7.8\text{Hz}$)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 965.5 ($M + \text{H}^+$)

(34)

〔實施例 1-3〕

MTX- α -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 3) 的製造

與實施例 1-2 相同方法下，取代 N-第三丁氧基羰基-4,7,10-三噁-1,13-十三烷二胺使用 N-第三丁氧基羰基-4,9-二噁-1,12-十二烷二胺得到 221mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ 1.47-1.60 (8H, m)、1.80-1.95 (2H, m)、2.20-2.29 (2H, m)、2.60 (2H, t)、2.70-3.10 (6H, m)、3.22 (3H, s)、3.25-3.50 (8H, m)、3.54 (3H, s)、4.25-4.49 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br.s)、6.81 (2H, d, J = 8.4Hz)、7.06-7.20 (10H, m)、7.45 (1H, br.s)、7.65 (1H, br.s)、7.70 (2H, d)、7.73 (1H, br.t)、7.83 (1H, d)、8.10 (1H, d)、8.11 (1H, d)、8.55 (1H, s)

LC/MS : 949.5 (M+H⁺)

〔實施例 1-4〕

MTX- α -PhePhe-NH-C₈H₁₆O₂-NH₂ (化合物 4) 的製造

與實施例 1-2 相同方法下，取代 N-第三丁氧基羰基-4,7,10-三噁-1,13-十三烷二胺使用 N-第三

(35)

丁氧基羰基 - 4, 7 - 二喹 - 1, 10 - 癸二胺得到 407 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO - d_6) : δ 1.50 - 1.57 (4H, m)、1.85 - 1.91 (2H, m)、2.21 - 2.28 (2H, m)、2.60 (2H, t)、2.70 - 3.13 (6H, m)、3.22 (3H, s)、3.25 - 3.45 (8H, m)、3.55 (3H, s)、4.27 - 4.49 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br.s)、6.82 (2H, d, $J = 8.8\text{Hz}$)、7.07 - 7.21 (10H, m)、7.43 (1H, br.s)、7.69 (1H, br.s)、7.71 (2H, d, $J = 8.8\text{Hz}$)、7.75 (1H, br.t)、7.85 (1H, d)、8.08 (1H, d)、8.13 (1H, d)、8.56 (1H, s)

LC / MS : 921.4 ($M + H^+$)

[實施例 1 - 5]

MTX - α - PhePhe - NH - $C_6H_{12}O_2$ - NH_2 (化合物 5) 的製造

與實施例 1 - 2 相同方法下，取代 N - 第三丁氧基羰基 - 4, 7, 10 - 三喹 - 1, 13 - 十三烷二胺使用 N - 第三丁氧基羰基 - 3, 6 - 二喹 - 1, 8 - 辛二胺得到 148mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO - d_6) : δ 1.81 - 1.91 (2H, m)、2.20 - 2.25 (2H, m)、2.61 - 2.64 (2H, t)、2.70 - 2.97 (6H, m)、3.22 (3H, s)、3.27 - 3.47 (8H, m)、3.55 (3H, s)、4.27 - 4.47 (3H, m)、4.79 (

(36)

2H、s)、6.62 (2H、br.s)、6.82 (2H、d、 $J = 8.7\text{Hz}$)
 、7.06 – 7.25 (10H、m)、7.46 (1H、br.s)、7.67 (1H
 、br.s)、7.71 (2H、d、 $J = 8.6\text{Hz}$)、7.85 (1H、d)、
 7.92 (1H、br.t)、8.07 (1H、d)、8.15 (1H、d)、
 8.56 (1H、s)

LC/MS: 893.6 ($M + H^+$)

[實施例 1 – 6]

MTX – α – PhePhe – NH – C₄H₈O – NH₂ (化合物 6) 的製
 造

與實施例 1 – 2 相同方法下，取代 N – 第三丁氧基羰
 基 – 4, 7, 10 – 三嗎 – 1, 13 – 十三烷二胺使用 N – 第三
 丁氧基羰基 – 3 – 嗎 – 1, 5 – 戊二胺得到 52 mg 的黃色粉
 末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO – d₆) : δ 1.84 – 1.92 (2H
 、m)、2.20 – 2.27 (2H、m)、2.60 – 2.64 (2H、t)、
 2.71 – 2.96 (6H、m)、3.22 (3H、s)、3.25 – 3.45 (4H
 、m)、3.54 (3H、s)、4.27 – 4.50 (3H、m)、4.79 (2H、s)、
 6.61 (2H、br.s)、6.81 (2H、d、 $J = 8.4\text{Hz}$)
 、7.05 – 7.21 (10H、m)、7.45 (1H、br.s)、7.65 (1H
 、br.s)、7.70 (2H、d、 $J = 8.6\text{Hz}$)、7.84 (1H、d)、
 7.91 (1H、br.t)、8.07 (1H、d)、8.15 (1H、d)、
 8.55 (1H、s)

LC/MS: 849.4 ($M + H^+$)

⑤

(37)

〔實施例 1-7〕

MTX- α -PhePhe-NH-C₅H₁₀-NH₂ (化合物 7) 的製造

與實施例 1-1 相同方法下，取代 N-第三丁氧基羰基-1,2-伸乙二胺使用 N-第三丁氧基羰基-1,5-戊二胺得到 148 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 1.61-1.56 (6H, m)、1.81-1.97 (2H, m)、2.21-2.29 (2H, m)、2.69-3.06 (6H, m)、3.23 (3H, s)、3.55 (3H, s)、4.25-4.50 (3H, m)、4.80 (2H, s)、6.65 (2H, br.s)、6.82 (2H, d, J=8.6Hz)、7.08-7.24 (10H, m)、7.50 (1H, br.s)、7.60-7.89 (5H, m)、8.10-8.16 (2H, m)、8.55 (1H, s)

LC/MS : 847.4 (M+H⁺)

〔實施例 1-8〕

MTX- α -PhePhe-Lys-OMe (化合物 8) 的製造

與實施例 1-2 相同方法下，取代 N-第三丁氧基羰基-4,7,10-三噁-1,13-十三烷二胺使用 N- ϵ -第三丁氧基羰基-L-離胺酸甲酯得到 178 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 1.25-1.34 (4H, m)、1.56-1.69 (2H, m)、1.75-1.90 (2H, m)、

Ⓢ

(38)

2.18 – 2.25 (2H, br.t) 、 2.50 – 2.60 (2H, m) 、 2.65 – 3.07 (4H, m) 、 3.22 (3H, s) 、 3.54 (3H, s) 、 3.60 (3H, s) 、 4.15 – 4.60 (4H, m) 、 4.79 (2H, s) 、 6.63 (2H, br.s) 、 6.81 (2H, d, J = 8.7Hz) 、 7.00 – 7.25 (10H, m) 、 7.45 (1H, br.s) 、 7.62 (1H, br.s) 、 7.69 (2H, d, J = 8.6Hz) 、 7.80 (1H, d) 、 8.05 (1H, d) 、 8.16 (1H, d) 、 8.30 (1H, d) 、 8.56 (1H, s)

LC / MS : 905.4 (M + H⁺)

〔 實施例 1 – 9 〕

MTX – α – PheGly – NH – C₁₀H₂₀O₃ – NH₂ (化合物 9) 的製造

取代實施例 1 – 2 (a) 的步驟之 N – 苯甲酯 – L – 苯基丙胺酸使用 N – 苯甲酯甘胺酸以外，其他實施例 1 – 2 相同方法下得到 528 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO – d₆) : δ 1.51 – 1.64 (4H, m) 、 1.84 – 1.94 (2H, m) 、 2.21 – 2.30 (2H, m) 、 2.55 (2H, t, J = 6.3Hz) 、 2.78 – 2.92 (1H, m) 、 3.03 – 3.76 (17H, m) 、 3.22 (3H, s) 、 3.55 (3H, s) 、 4.26 – 4.52 (2H, m) 、 4.79 (2H, s) 、 6.63 (2H, br.s) 、 6.82 (2H, d, J = 8.7Hz) 、 7.11 – 7.24 (5H, m) 、 7.47 (1H, br.s) 、 7.62 – 7.72 (4H, m) 、 8.04 – 8.16 (2H, m) 、 8.28 (1H, br.t) 、 8.56 (1H, s)

LC / MS : 875.5 (M + H⁺)

(39)

〔實施例 1-10〕

MTX- α -PheGly-NH-C₁₀H₂₀O₂-NH₂ (化合物 10) 的製造

與實施例 1-9 相同方法下，取代 N-第三丁氧基羰基-4,7,10-三喹-1,13-十三烷二胺使用 N-第三丁氧基羰基-4,9-二喹-1,12-十二烷二胺得到 300 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ 1.47-1.50 (4H, m)、1.54-1.60 (4H, m)、1.82-1.95 (2H, m)、2.25-2.28 (2H, m)、2.58 (2H, t, J=6.6Hz)、2.82-2.87 (1H, m)、3.02-3.07 (3H, m)、3.22 (3H, s)、3.25-3.41 (8H, m)、3.55 (3H, s)、3.55-3.63 (2H, m)、4.28-4.47 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br.s)、6.81 (2H, d, J=8.8Hz)、7.09-7.18 (5H, m)、7.45 (1H, br.s)、7.59 (1H, br.t)、7.66 (1H, br.s)、7.70 (2H, d, J=8.8Hz)、8.02 (1H, d)、8.08 (1H, d)、8.26 (1H, br.t)、8.56 (1H, s)

LC/MS : 859.3 (M+H⁺)

〔實施例 1-11〕

MTX- α -PheGly-NH-C₈H₁₆O₂-NH₂ (化合物 11) 的製造

(40)

與實施例 1-9 相同方法下，取代 N-第三丁氧基羰基-4,7,10-三噁-1,13-十三烷二胺使用 N-第三丁氧基羰基-4,7-二噁-1,10-癸二胺得到 300 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) : δ 1.53 - 1.62 (4H, m)、1.82 - 1.92 (2H, m)、2.20 - 2.27 (2H, m)、2.50 - 2.60 (2H, t)、2.81 - 2.86 (1H, m)、2.97 - 3.08 (3H, m)、3.22 (3H, s)、3.25 - 3.47 (8H, m)、3.55 (3H, s)、3.55 - 3.73 (2H, m)、4.24 - 4.47 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br.s)、6.81 (2H, d)、7.12 - 7.21 (5H, m)、7.45 (1H, br.s)、7.60 (1H, br.t)、7.63 (1H, br.s)、7.69 (2H, d)、8.03 (1H, d)、8.10 (1H, d)、8.28 (1H, br.t)、8.56 (1H, s)

LC/MS : 831.3 (M + H⁺)

[實施例 1-12]

MTX- α -PheGly-NH-C₆H₁₂O₂-NH₂ (化合物 12) 的製造

與實施例 1-9 相同方法下，取代 N-第三丁氧基羰基-4,7,10-三噁-1,13-十三烷二胺使用 N-第三丁氧基羰基-3,6-二噁-1,8-辛二胺得到 181 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) : δ 1.83 - 1.92 (2H

(41)

、 m) 、 2.21 - 2.27 (2H 、 m) 、 2.60 - 2.65 (2H 、 t) 、
 2.75 - 3.10 (2H 、 m) 、 3.22 (3H 、 s) 、 3.23 - 3.46 (10H 、 m) 、
 3.55 (3H 、 s) 、 3.55 - 3.75 (2H 、 m) 、 4.25 - 4.52 (2H 、 m) 、
 4.79 (2H 、 s) 、 6.61 (2H 、 br.s) 、 6.82 (2H 、 d 、 J = 8.6Hz) 、
 7.10 - 7.20 (5H 、 m) 、 7.45 (1H 、 br.s) 、 7.63 - 7.72 (4H 、 m) 、 8.00 (1H 、 d) 、
 8.10 (1H 、 d) 、 8.27 (1H 、 br.t) 、 8.56 (1H 、 s)

LC / MS : 803.4 (M + H⁺)

[實施例 1 - 13]

MTX - α - PheGly - NH - C₄H₈O₂ - NH₂ (化合物 13) 的
 製造

與實施例 1 - 9 相同方法下，取代 N - 第三丁氧基羰基 - 4, 7, 10 - 三喹 - 1, 13 - 十三烷二胺使用 N - 第三丁氧基羰基 - 3 - 喹 - 1, 5 - 戊二胺得到 318 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz 、 DMSO - d₆) : δ 1.82 - 1.95 (2H 、 m) 、 2.22 - 2.27 (2H 、 m) 、 2.59 - 2.64 (2H 、 t) 、 2.73 - 3.15 (2H 、 m) 、 3.23 (3H 、 s) 、 3.25 - 3.38 (6H 、 m) 、 3.55 (3H 、 s) 、 3.46 - 3.77 (2H 、 m) 、 4.23 - 4.51 (2H 、 m) 、 4.79 (2H 、 s) 、 6.62 (2H 、 br.s) 、 6.82 (2H 、 d 、 J = 8.6Hz) 、 7.10 - 7.17 (5H 、 m) 、 7.47 (1H 、 br.s) 、 7.63 - 7.75 (4H 、 m) 、 8.02 (1H 、 d) 、 8.11 (1H 、 d) 、 8.27 (1H 、 br.t) 、 8.56 (1H 、 s)

(42)

LC/MS : 759.3 (M + H⁺)

[實施例 1-14]

MTX - α - PhePro - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH₂ (化合物 14) 的製造

取代實施例 1-2 (a) 的步驟之 N-苯甲酯 - L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯 - L-脯胺酸以外，其他實施例 1-2 相同方法下得到 382 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO - d₆) : δ 1.49 - 2.03 (10H、m)、2.19 - 2.30 (2H、m)、2.55 (2H、t、J = 6.6Hz)、2.62 - 3.69 (21H、m)、3.55 (3H、s)、4.28 - 4.38 (1H、m)、4.63 - 4.75 (1H、m)、4.79 (2H、s)、6.60 (2H、br.s)、6.82 (2H、d、J = 8.6Hz)、7.14 - 7.29 (5H、m)、7.47 (1H、br.s)、7.66 - 7.72 (4H、m)、7.94 - 8.10 (2H、m)、8.56 (1H、s)

LC/MS : 915.3 (M + H⁺)

[實施例 1-15]

MTX - α - Phe β Ala - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH₂ (化合物 15) 的製造

取代實施例 1-2 (a) 的步驟之 N-苯甲酯 - L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯 - β -丙胺酸以外，其他實施例 1-2 相同方法下得到 180 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO - d₆) : δ 1.52 - 1.62 (4H

(43)

、 m) 、 1.78 – 1.95 (2H 、 m) 、 2.16 – 2.22 (4H 、 m) 、
 2.56 (2H 、 t 、 J = 7.3 Hz) 、 2.71 – 3.48 (21H 、 m) 、 3.55
 (3H 、 s) 、 4.10 (2H 、 br.s) 、 4.21 – 4.30 (1H 、 m) 、
 4.38 – 4.49 (1H 、 m) 、 4.80 (2H 、 s) 、 6.59 (2H 、 br.s
) 、 6.83 (2H 、 d 、 J = 8.6 Hz) 、 7.10 – 7.21 (5H 、 m) 、
 7.43 (1H 、 br.s) 、 7.65 – 7.74 (3H 、 m) 、 7.83 – 7.89 (2H 、 m) 、
 7.96 (1H 、 br.t) 、 8.08 (1H 、 d 、 J = 6.8 Hz)
 、 8.56 (1H 、 s)

LC / MS : 889.5 (M + H⁺)

[實施例 1 – 16]

MTX – α – Phe β Ala – NH – C₂H₄ – NH₂ (化合物 16) 的
 製造

取代實施例 1 – 1 (a) 的步驟之 N – 苯甲酯 – L – 苯
 基丙胺酸使用 N – 苯甲酯 – β – 丙胺酸以外，其他實施例
 1 – 1 相同方法下得到 194 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270 MHz 、 DMSO – d₆) : δ 1.80 – 1.94 (2H
 、 m) 、 2.18 – 2.26 (4H 、 m) 、 2.54 (2H 、 t 、 J = 6.1 Hz
) 、 2.74 – 3.08 (6H 、 m) 、 3.32 (3H 、 s) 、 3.55 (3H 、
 s) 、 4.24 – 4.48 (2H 、 m) 、 4.80 (2H 、 s) 、 6.59 (2H
 、 br.s) 、 6.83 (2H 、 d 、 J = 8.4 Hz) 、 7.13 (5H 、 s) 、
 7.45 (1H 、 br.s) 、 7.65 – 7.86 (5H 、 m) 、 7.96 (1H 、
 br.t) 、 8.09 (1H 、 d 、 J = 6.8 Hz) 、 8.56 (1H 、 s)

LC / MS : 729.3 (M + H⁺)

(44)

〔實施例 1-17〕

MTX- α -Phe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 17) 的製造

省略實施例 1-2 (b) 的步驟以外，其他實施例 1-2 相同方法下得到 496 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) : δ 1.49 - 1.59 (4H, m)、1.82 - 1.89 (2H, m)、2.19 - 2.27 (2H, m)、2.55 (2H, t, J = 7.2Hz)、2.73 - 3.10 (4H, m)、3.23 (3H, s)、3.17 - 3.48 (12H, m)、3.55 (3H, s)、4.21 - 4.28 (1H, m)、4.38 - 4.45 (1H, m)、4.80 (2H, s)、6.61 (2H, br.s)、6.83 (2H, d, J = 9.3Hz)、7.11 - 7.20 (5H, m)、7.46 (1H, br.s)、7.66 (1H, br.s)、7.73 (2H, d, J = 9.0Hz)、7.83 (1H, t)、7.92 (1H, d, J = 8.4Hz)、8.12 (1H, d, J = 7.5Hz)、8.56 (1H, s)

LC/MS : 818.4 (M + H⁺)

〔實施例 1-18〕

MTX- α -Ile-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 18) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-L-異亮胺酸，得到 562 mg 的黃色粉末標題化合物。

(45)

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO - d_6) : δ 0.76 - 0.80 (6H, m)、0.99 - 1.10 (1H, m)、1.36 - 1.45 (1H, m)、1.49 - 1.73 (5H, m)、1.88 - 2.07 (2H, m)、2.33 - 2.38 (2H, m)、2.55 (2H, t, $J = 6.6\text{Hz}$)、2.98 - 3.48 (14H, m)、3.21 (3H, s)、3.56 (3H, s)、4.05 - 4.13 (1H, m)、4.40 - 4.48 (1H, m)、4.78 (2H, s)、6.60 (2H, br.s)、6.82 (2H, d, $J = 8.4\text{Hz}$)、7.46 (1H, br.s)、7.66 - 7.72 (3H, m)、7.98 (1H, br.t)、8.12 (1H, d, $J = 7.6\text{Hz}$)、8.56 (1H, s)

LC/MS : 784.4 ($M + H^+$)

[實施例 1 - 19]

MTX - α - Ile - NH - C_2H_4 - NH_2 (化合物 19)

與實施例 1 - 18 相同方法下，取代 N - 第三丁氧基羰基 - 4, 7, 10 - 三噁 - 1, 13 - 十三烷二胺使用 N - 第三丁氧基羰基 - 1, 2 - 伸乙基二胺得到 320 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO - d_6) : δ 0.76 - 0.80 (6H, m)、0.96 - 1.08 (1H, m)、1.34 - 1.48 (1H, m)、1.62 - 1.70 (1H, m)、1.85 - 2.03 (2H, m)、2.36 (2H, t, $J = 7.8\text{Hz}$)、2.95 - 3.08 (2H, m)、3.21 (3H, s)、3.56 (3H, s)、4.06 - 4.12 (1H, m)、4.38 - 4.45 (1H, m)、4.78 (2H, s)、6.61 (2H, br.s)、6.83 (2H, d, $J = 9.0\text{Hz}$)、7.43 (1H, br.s)、7.64 - 7.72 (4H,

(46)

m) 、 7.92 (1H 、 t 、 J = 5.7Hz) 、 8.12 (1H 、 d 、 J = 7.5Hz) 、 8.57 (1H 、 s)

LC / MS : 624.2 (M + H⁺)

[實施例 1 - 20]

MTX - α - Glu (OMe) - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH₂ (化合物 20) 的製造

與實施例 1 - 17 相同方法下，取代 N - 苯甲酯 - L - 苯基丙胺酸使用 N - 苯甲酯 - L - 谷胺酸 - γ - 甲酯，得到 600 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz 、 DMSO - d₆) : δ 1.50 - 2.03 (8H 、 m) 、 2.24 - 2.31 (2H 、 t) 、 2.34 - 2.40 (2H 、 t) 、 2.49 - 2.57 (2H 、 t) 、 2.97 - 3.52 (14H 、 m) 、 3.21 (3H 、 s) 、 3.53 (3H 、 s) 、 3.55 (3H 、 s) 、 4.15 - 4.36 (2H 、 m) 、 4.78 (2H 、 s) 、 6.61 (2H 、 br.s) 、 6.81 (2H 、 d 、 J = 8.7Hz) 、 7.46 (1H 、 br.s) 、 7.67 (1H 、 br.s) 、 7.72 (2H 、 d 、 J = 8.6Hz) 、 7.84 (1H 、 br.t) 、 7.95 (1H 、 d) 、 8.14 (1H 、 d) 、 8.55 (1H 、 s)

LC / MS : 814.4 (M + H⁺)

[實施例 1 - 21]

MTX - α - Glu (OMe) - NH - C₂H₄ - NH₂ (化合物 21) 的製造

與實施例 1 - 20 相同方法下，取代 N - 第三丁氧基羰

⑤

(47)

基 - 4, 7, 10 - 三噁 - 1, 13 - 十三烷二胺使用 N - 第三丁氧基羰基 - 1, 2 - 伸乙基二胺得到 283 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO - d_6) : δ 1.71 - 2.09 (4H, m)、2.28 (2H, t, $J = 7.6\text{Hz}$)、2.39 (2H, t, $J = 7.6\text{Hz}$)、2.53 (2H, t, $J = 6.1\text{Hz}$)、2.99 - 3.05 (2H, m)、3.21 (3H, s)、3.54 (3H, s)、3.56 (3H, s)、4.14 - 4.36 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.61 (2H, br.s)、6.82 (2H, d, $J = 8.6\text{Hz}$)、7.43 (1H, br.s)、7.65 - 7.79 (4H, m)、7.95 (1H, d, $J = 7.8\text{Hz}$)、8.14 (1H, d, $J = 6.9\text{Hz}$)、8.56 (1H, s)

LC / MS : 654.1 ($M + H^+$)

[實施例 1 - 22]

MTX - α - Try - NH - $C_{10}H_{20}O_3$ - NH_2 (化合物 22) 的製造

與實施例 1 - 17 相同方法下，取代 N - 苯甲酯 - L - 苯基丙胺酸使用 N - 苯甲酯 - L - 酪胺酸，得到 133 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO - d_6) : δ 1.51 - 1.62 (4H, m)、1.85 - 1.95 (2H, m)、2.23 - 2.31 (2H, m)、2.51 - 2.58 (2H, t)、2.63 - 2.91 (2H, m)、2.95 - 3.16 (2H, m)、3.22 (3H, s)、3.27 - 3.54 (12H, m)、3.56 (3H, s)、4.22 - 4.35 (2H, m)、4.79 (2H, s

(48)

)、6.57 (2H、d、 $J=8.1\text{Hz}$)、6.61 (2H、br.s)、6.82 (2H、d、 $J=8.7\text{Hz}$)、6.92 (2H、d、 $J=8.1\text{Hz}$)、7.47 (1H、br.s)、7.67–7.88 (5H、m)、8.13 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC/MS : 834.4 (M + H⁺)

[實施例 1-23]

MTX- α -Try-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 23) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-L-色胺酸，得到 171 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO-d₆) : δ 1.50–1.61 (4H、m)、1.84–1.97 (2H、m)、2.23–2.32 (2H、m)、2.50–2.56 (2H、t)、2.92–3.15 (4H、m)、3.22 (3H、s)、3.29–3.45 (12H、m)、3.55 (3H、s)、4.29–4.49 (2H、m)、4.78 (2H、s)、6.64 (2H、br.s)、6.80 (2H、d)、6.92 (1H、t)、7.04 (1H、t)、7.10 (1H、s)、7.26 (1H、d)、7.44 (1H、br.s)、7.51 (1H、d)、7.65 (1H、br.s)、7.69 (2H、d)、7.82 (1H、br.t)、7.93 (1H、d)、8.10 (1H、d)、8.55 (1H、s)、10.80 (1H、s)

LC/MS : 857.5 (M + H⁺)

(49)

〔實施例 1-24〕

MTX- α -Ser-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 24) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-L-絲胺酸，得到 416 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) : δ 1.50-1.63 (4H, m)、1.90-2.08 (4H, m)、2.39 (2H, t, J=7.8Hz)、2.55 (2H, t, J=6.6Hz)、3.05-3.48 (16H, m)、3.21 (3H, s)、3.56 (3H, s)、4.13-4.20 (1H, m)、4.33-4.41 (1H, m)、4.78 (2H, s)、6.61 (2H, br.s)、6.82 (2H, d, J=9.0Hz)、7.44 (1H, br.s)、7.66-7.80 (5H, m)、8.19 (1H, d, J=6.9Hz)、8.56 (1H, s)

LC/MS : 758.4 (M+H⁺)

〔實施例 1-25〕

MTX- α -Leu-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 25) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-L-亮胺酸，得到 283 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 0.80-0.87 (6H, d)、1.43-1.64 (7H, m)、1.90-2.06 (2H, m)、

(50)

2.34 – 2.30 (2H、t)、2.53 – 2.58 (2H、t)、3.04 – 3.08 (2H、m)、3.21 (3H、s)、3.33 – 3.47 (12H、m)、3.56 (3H、s)、4.19 – 4.37 (2H、m)、4.78 (2H、s)、6.62 (2H、br.s)、6.82 (2H、d、J = 8.7Hz)、7.45 (1H、br.s)、7.64 – 7.85 (5H、m)、8.10 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC / MS : 784.4 (M + H⁺)

[實施例 1 – 26]

MTX – α – Val – NH – C₁₀H₂₀O₃ – NH₂ (化合物 26) 的製造

與實施例 1 – 17 相同方法下，取代 N – 苯甲酯 – L – 苯基丙胺酸使用 N – 苯甲酯 – L – 纈胺酸，得到 590 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO – d₆) : δ 0.79 (6H、d、J = 6.8Hz)、1.52 – 1.59 (4H、m)、1.85 – 2.04 (3H、m)、2.33 – 2.35 (2H、t)、2.56 – 2.58 (2H、t)、2.93 – 3.55 (14H、m)、3.21 (3H、s)、3.56 (3H、s)、4.03 – 4.08 (1H、m)、4.42 – 4.47 (1H、m)、4.78 (2H、s)、6.62 (2H、br.s)、6.82 (2H、d、J = 8.7Hz)、7.45 (1H、br.s)、7.61 – 7.72 (4H、m)、7.98 (1H、br.t)、8.13 (1H、d)、8.56 (1H、s)

LC / MS : 770.4 (M + H⁺)

(51)

〔實施例 1-27〕

MTX- α -His-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 27) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-L-組胺酸，得到 81 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) : δ 1.49-1.58 (4H, d), 1.90-2.04 (2H, m), 2.39 (2H, t, J=6.6Hz), 2.55 (2H, t, J=6.9Hz), 2.83 (2H, m), 3.02 (2H, m), 3.16-3.47 (12H, m), 3.23 (3H, s), 3.57 (3H, s), 4.22 (1H, m), 4.32 (1H, m), 4.80 (2H, s), 6.61 (2H, br.s), 6.72 (1H, s), 6.84 (2H, d, J=8.4Hz), 7.10-7.70 (5H, m), 7.77 (2H, d, J=8.7Hz), 8.36 (1H, br), 8.57 (1H, s)

LC/MS : 808.3 (M+H⁺)

〔實施例 1-28〕

MTX- α -Pro-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 28) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-L-脯胺酸，得到 683 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 1.58 (4H, dd, J=6.5Hz, J=12.8Hz), 1.69-2.10 (6H, m), 2.44 (

(52)

2H、t、 $J = 7.7\text{Hz}$)、2.60 (2H、t、 $J = 6.8\text{Hz}$)、2.91 – 3.75 (19H、m)、3.57 (3H、s)、4.18 – 4.25 (1H、m)、4.61 – 4.72 (1H、m)、4.77 (2H、s)、6.61 (2H、br.s)、6.80 (2H、d、 $J = 8.7\text{Hz}$)、7.44 (1H、br.s)、7.69 – 7.80 (4H、m)、8.15 (1H、d、 $J = 7.1\text{Hz}$)、8.55 (1H、s)

LC/MS : 768.3 (M + H⁺)

[實施例 1-29]

MTX- α - β Ala-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 29) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯- β -丙胺酸，得到 230 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO-d₆) : δ 1.49 – 1.62 (4H、m)、1.79 – 2.02 (2H、m)、2.21 (2H、t、 $J = 6.9\text{Hz}$)、2.32 (2H、t、 $J = 7.3\text{Hz}$)、2.56 (2H、t、 $J = 6.6\text{Hz}$)、3.00 – 3.61 (19H、m)、3.55 (3H、s)、4.29 – 4.38 (1H、m)、4.78 (2H、s)、6.61 (2H、br.s)、6.81 (2H、d、 $J = 8.6\text{Hz}$)、7.43 (1H、br.s)、7.61 – 7.91 (3H、m)、7.72 (2H、d、 $J = 8.6\text{Hz}$)、8.02 (1H、d、 $J = 7.8\text{Hz}$)、8.55 (1H、s)

LC/MS : 742.4 (M + H⁺)

(53)

〔實施例 1-30〕

MTX- γ -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 30) 的製造

與實施例 1-2 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-谷胺酸- γ -甲酯使用 N-苯甲酯-L-谷胺酸- α -甲酯，得到 312 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 1.49-1.60 (4H, m)、1.76-1.98 (2H, m)、2.09-2.20 (2H, m)、2.56 (2H, t, J=6.6Hz)、2.62-3.16 (6H, m)、3.21 (3H, s)、3.27-3.48 (12H, m)、3.59 (3H, s)、4.27-4.53 (3H, m)、4.78 (2H, s)、6.61 (2H, br.s)、6.81 (2H, d, J=8.6Hz)、7.16-7.23 (10H, m)、7.48 (1H, br.s)、7.68-7.74 (3H, m)、7.83 (1H, br.t)、8.01 (1H, d, J=7.9Hz)、8.10 (1H, d, J=7.8Hz)、8.36 (1H, d, J=6.8Hz)、8.55 (1H, s)

LC/MS : 965.5 (M+H⁺)

〔實施例 1-31〕

MTX- γ -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 31) 的製造

與實施例 1-5 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-谷胺酸- γ -甲酯使用 N-苯甲酯-L-谷胺酸- α -甲酯，得到 80 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 1.75-1.97 (2H

(54)

、 m) 、 2.08 – 2.17 (2H 、 m) 、 2.59 – 2.62 (2H 、 t) 、
 2.58 – 3.05 (6H 、 m) 、 3.22 (3H 、 s) 、 3.15 – 3.52 (8H
 、 m) 、 3.59 (3H 、 s) 、 4.23 – 4.52 (3H 、 m) 、 4.78 (2H
 、 s) 、 6.63 (2H 、 br.s) 、 6.81 (2H 、 d 、 J = 8.7Hz)
 、 7.11 – 7.21 (10H 、 m) 、 7.44 (1H 、 br.s) 、 7.65 (1H
 、 br.s) 、 7.70 (2H 、 d) 、 7.94 – 8.12 (3H 、 m) 、 8.35
 (1H 、 d) 、 8.55 (1H 、 s)

LC / MS : 893.5 (M + H⁺)

[實施例 1 – 32]

MTX – γ – PhePhe – NH – C₄H₈O – NH₂ (化合物 32) 的製
 造

與實施例 1 – 6 相同方法下，取代 N – 苯甲酯 – L – 谷
 胺酸 – γ – 甲酯使用 N – 苯甲酯 – L – 谷胺酸 – α – 甲酯
 ，得到 49 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz 、 DMSO – d₆) : δ 1.73 – 1.97 (2H
 、 m) 、 2.08 – 2.18 (2H 、 m) 、 2.60 – 2.65 (2H 、 t) 、
 2.59 – 3.02 (6H 、 m) 、 3.21 (3H 、 s) 、 3.13 – 3.44 (4H
 、 m) 、 3.59 (3H 、 s) 、 4.25 – 4.53 (3H 、 m) 、 4.78 (2H
 、 s) 、 6.63 (2H 、 br.s) 、 6.81 (2H 、 d 、 J = 8.7Hz)
 、 7.09 – 7.25 (10H 、 m) 、 7.43 (1H 、 br.s) 、 7.66 (1H
 、 br.s) 、 7.72 (2H 、 d 、 J = 8.4Hz) 、 7.95 – 8.10 (3H 、
 m) 、 8.36 (1H 、 d) 、 8.55 (1H 、 s)

LC / MS : 849.5 (M + H⁺)

(55)

〔實施例 1-33〕

MTX- γ -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 33) 的製造

與實施例 1-9 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-谷胺酸- γ -甲酯使用 N-苯甲酯-L-谷胺酸- α -甲酯，得到 693 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 1.50-1.68 (4H, m)、1.80-2.02 (2H, m)、2.12-2.27 (2H, m)、2.55 (2H, t, J=6.4Hz)、2.71-2.79 (1H, m)、2.96-3.14 (3H, m)、3.22 (3H, s)、3.38-3.74 (12H, m)、3.59 (3H, s)、4.28-4.48 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.62 (2H, br.s)、6.81 (2H, d, J=8.4Hz)、7.14-7.28 (5H, m)、7.47 (1H, br.s)、7.63-7.73 (4H, m)、8.19 (1H, d, J=7.6Hz)、8.29-8.36 (2H, m)、8.56 (1H, s)

LC/MS : 875.4 (M+H⁺)

〔實施例 1-34〕

MTX- γ -Phe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 34) 的製造

與實施例 1-17 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-谷胺酸- γ -甲酯使用 N-苯甲酯-L-谷胺酸- α -甲酯，得到 480 mg 的黃色粉末標題化合物。

(56)

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO - d_6) : δ 1.49 - 1.58 (4H, m), 1.79 - 2.00 (2H, m), 2.10 - 2.27 (2H, m), 2.55 (2H, t, $J = 6.9\text{Hz}$), 2.69 - 2.93 (2H, m), 2.96 - 3.12 (2H, m), 3.22 (3H, s), 3.26 - 3.48 (12H, m), 3.59 (3H, s), 4.25 - 4.33 (1H, m), 4.38 - 4.46 (1H, m), 4.79 (2H, s), 6.62 (2H, br.s), 6.81 (2H, d, $J = 8.7\text{Hz}$), 7.10 - 7.24 (5H, m), 7.44 (1H, br), 7.70 (1H, br), 7.72 (2H, d, $J = 8.7\text{Hz}$), 7.95 (1H, t), 8.10 (1H, d, $J = 8.1\text{Hz}$), 8.35 (1H, d, $J = 6.9\text{Hz}$), 8.56 (1H, s)

LC/MS : 818.4 ($M + H^+$)

[實施例 1 - 35]

MTX - γ - Glu (OMe) - NH - $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3$ - NH_2 (化合物 35) 的製造

與實施例 1 - 20 相同方法下，取代 N - 苯甲酯 - L - 谷胺酸 - γ - 甲酯使用 N - 苯甲酯 - L - 谷胺酸 - α - 甲酯，得到 438 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO - d_6) : δ 1.52 - 2.06 (8H, m), 2.22 - 2.30 (4H, m), 2.53 - 2.58 (2H, t), 3.03 - 3.15 (2H, m), 3.22 (3H, s), 3.25 - 3.54 (12H, m), 3.56 (3H, s), 3.61 (3H, s), 4.13 - 4.40 (2H, m), 4.79 (2H, s), 6.63 (2H, br.s), 6.81 (2H, d, $J = 8.6\text{Hz}$), 7.44 (1H, br.s), 7.67 (1H, br.s)

(57)

)、7.72 (2H、d、 $J = 8.4\text{Hz}$)、7.90 (1H、br.t.)、7.99 (1H、d)、8.37 (1H、d)、8.56 (1H、s)

LC/MS : 814.5 (M + H⁺)

[實施例 1-36]

MTX - α - D - Phe - D - Phe - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH₂ (化合物 36) 的製造

與實施例 1-2 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-D-苯基丙胺酸，得到 313 mg 的黃色粉末標題化合物。

¹H-NMR (270MHz、DMSO - d₆) : δ 1.40 - 1.59 (4H、m)、1.74 - 1.83 (2H、m)、2.04 - 2.11 (2H、m)、2.56 - 2.58 (2H、t)、2.59 - 3.12 (6H、m)、3.21 (3H、s)、3.17 - 3.51 (12H、m)、3.55 (3H、s)、4.24 - 4.44 (3H、m)、4.78 (2H、s)、6.62 (2H、br.s)、6.81 (2H、d、 $J = 8.6\text{Hz}$)、7.10 - 7.26 (10H、m)、7.45 (2H、m)、7.64 (1H、br.s)、7.72 (2H、d、 $J = 8.4\text{Hz}$)、8.18 (2H、m)、8.43 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC/MS : 965.6 (M + H⁺)

[實施例 1-37]

MTX - γ - D - Phe - D - Phe - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH₂ (化合物 37) 的製造

(58)

與實施例 1-30 相同方法下，取代 N-苯甲酯-L-苯基丙胺酸使用 N-苯甲酯-D-苯基丙胺酸，得到 85 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) : δ 1.51-1.61 (4H, m)、1.74-2.02 (2H, m)、2.11-2.16 (2H, m)、2.54-2.59 (2H, t)、2.62-3.12 (6H, m)、3.22 (3H, s)、3.25-3.53 (12H, m)、3.60 (3H, s)、4.31-4.46 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.61 (2H, br.s)、6.81 (2H, d, $J = 8.6\text{Hz}$)、7.08-7.26 (10H, m)、7.44 (1H, br.s)、7.66-7.77 (4H, m)、8.06 (2H, m)、8.36 (1H, d)、8.56 (1H, s)

LC/MS : 965.6 (M + H⁺)

[實施例 1-38]

MTX- α -AsnPhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物 38) 的製造

與實施例 1-2 相同下，依據一般的肽合成法延伸肽鏈，得到 145 mg 的黃色粉末標題化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) : δ 1.52-1.59 (4H, m)、1.87-2.02 (2H, m)、2.32-3.48 (24H, m)、3.22 (3H, s)、3.55 (3H, s)、4.24-4.56 (4H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br.s)、6.81 (2H, d, $J = 8.6\text{Hz}$)、7.04-7.75 (17H, m)、8.07-8.26 (4H, m)、8.56 (1H, s)

(59)

LC / MS : 1079.5 (M + H⁺)

〔 實施例 1 - 39 〕

MTX - α / γ - GlyPheLeuGly - NH - C₁₀H₂₀O₃ - NH₂ (化合物 39) 的製造

與實施例 1 - 2 相同下，依據一般的肽合成法延伸肽鏈，得到 723 mg 的黃色粉末標題化合物。藉由 LC / MS 解析，確認以純化步驟產生異構化成為 α / γ 的混合物 (α : γ = 3 : 1) (化合物 39) 。

LC / MS : 1045.7 (M + H⁺)

〔 實施例 2 - 1 〕

MTX - α - PhePhe - NHC₂H₄NH - HA 的製造

於透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 中加入四氫呋喃 (THF) (10 mL) 之懸浮液中，添加溶解於超純水與 THF 之等量混合液 (20 mL) 之 3 - 羥基 - 3, 4 - 二氫 - 4 - 氧代 - 1, 2, 3 - 苯并三嗪 (HOObt) (0.125 mmol) 及實施例 1 - 1 所得之化合物 (0.031 mmol) 之溶液後，添加溶解於超純水與 THF 的等量混合液 (10 mL) 之三 [2 - (2 - 甲氧基乙氧基) 乙基] 胺基 (0.094 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後，添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1 - 乙基 - 3 - (3 - 二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09 N

(60)

的氫氧化鈉水溶液 (220 mL)，於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1 N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和，再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9 g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出，析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中，得到標題的 HA - MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 195 萬。又，所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 2.1%。

該水溶液中，添加溶解於超純水 (160 mL) 的氯化鈉 (6 g) 水溶液時滴入乙醇 (400 mL) 進行乙醇析出，析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (500 mL) 中，添加氯化鈉 (15 g) 時，以 0.45 μ m 的過濾器 (司貼力別克斯 HV: minipore) 過濾後，於無菌狀態下濾液中滴入乙醇 (1000 mL) 進行乙醇析出，過濾取出析出物後進行真空乾燥。該析出物溶解於磷酸緩衝液 (2 mM 磷酸鈉，154 mM 氯化鈉，pH 7.2) (40 mL)，得到標題的 HA - MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 186 萬。又，所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 2.1%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 1.83 (m)、2.01 (br.s)、2.13 (m)、2.49 (m)、2.68 (m)、2.95 (m)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.56 (br.s)、3.71 (br.s)、3.82 (br.s)、4.16 (t)、4.46 (br.s)、4.54 (br.d)、4.88 (d)、4.99 (d)、6.63 (d)、6.87 - 7.11 (m)

(61)

、 7.73 (d) 、 8.69 (s)

〔 實施例 2-2 〕

MTX - α - PhePhe - NHC₂H₄NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-1 所得之化合物 1（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 228 萬，MTX 的結合率為 1.9%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA - MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 218 萬，MTX 的結合率為 1.9%。

¹H-NMR (500MHz、D₂O) : δ 1.84 (m) 、 2.01 (br.s) 、 2.13 (m) 、 2.49 (t) 、 2.68 (m) 、 2.95 (m) 、 3.36 (br.d) 、 3.51 (br.d) 、 3.56 (br.s) 、 3.71 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、 4.16 (t) 、 4.46 (br.d) 、 4.55 (br.d) 、 4.88 (d) 、 4.98 (d) 、 6.63 (d) 、 6.87 - 7.13 (m) 、 7.74 (d) 、 8.70 (s)

〔 實施例 2-2 〕

MTX - α - PhePhe - NHC₂H₄NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-1 所得之化合物 1

(62)

(0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 219 萬，MTX 的結合率為 2.2%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 206 萬，MTX 的結合率為 2.3%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.83 (m)、2.01 (br.s)、2.14 (m)、2.52 (m)、2.70 (m)、2.96 (m)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.16 (t)、4.46 (br.s)、4.55 (br.s)、4.87 (d)、4.97 (d)、6.66 (d)、6.88-7.09 (m)、7.72 (d)、8.69 (s)

[實施例 2-3]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HA 的製造

於透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量: 約 230 萬) 中加入四氫呋喃 (THF) (10 mL) 之懸浮液中，添加溶解於超純水與 THF 之等量混合液 (20 mL) 之 3-羥基-3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (HOObt) (0.125 mmol) 及實施例 1-1 所得之化合物 (0.008 mmol) 之溶液後，添加溶解於超純水與 THF 的等量混合液 (10 mL) 之三 [2-(2-甲氧基乙氧基) 乙基] 胺基 (0.118 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後，

(63)

添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09 N 的氫氧化鈉水溶液 (220 mL)，於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和，再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9 g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出，析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中，得到標題的 HA-MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 232 萬。又，所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 0.6%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 217 萬，MTX 的結合率為 0.5%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 2.01 (br.s)、2.52 (m)、2.69 (m)、2.95 (m)、3.34 (br.d)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.16 (t)、4.46 (br.s)、4.55 (br.s)、6.66 (d)、6.87-7.10 (m)、7.72 (d)、8.69 (s)

[實施例 2-4]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HA 的製造

於透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 中加

(64)

入四氫呋喃 (THF) (10 mL) 之懸浮液中，添加溶解於超純水與 THF 之等量混合液 (20 mL) 之 3-羥基-3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (HOObt) (0.125 mmol) 及實施例 1-1 所得之化合物 (0.015 mmol) 之溶液後，添加溶解於超純水與 THF 的等量混合液 (10 mL) 之三〔2-(2-甲氧基乙氧基)乙基〕胺基 (0.110 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後，添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09 N 的氫氧化鈉水溶液 (220 mL)，於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和，再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9 g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出，析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中，得到標題的 HA-MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 232 萬。又，所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 1.1%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 223 萬，MTX 的結合率為 1.1%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.84 (m)、2.01 (br.s)、2.13 (m)、2.52 (m)、2.70 (m)、2.96 (m)、

(65)

3.35 (br.s) 、 3.51 (br.s) 、 3.57 (br.s) 、 3.71 (br.s)
 、 3.83 (br.s) 、 4.16 (t) 、 4.46 (br.s) 、 4.55 (br.s)
 、 6.66 (d) 、 6.88 – 7.09 (m) 、 7.72 (d) 、 8.69 (s)

[實施例 2 – 5]

MTX – α – PhePhe – NHC₂H₄NH – HA 的製造

於透明質酸鈉鹽 (500 mg , 分子量 : 約 230 萬) 中加入四氫呋喃 (THF) (10 mL) 之懸浮液中 , 添加溶解於超純水與 THF 之等量混合液 (20 mL) 之 3 – 羥基 – 3 , 4 – 二氫 – 4 – 氧代 – 1 , 2 , 3 – 苯并三嗪 (HOObt) (0.125 mmol) 及實施例 1 – 1 所得之化合物 (0.020 mmol) 之溶液後 , 添加溶解於超純水與 THF 的等量混合液 (10 mL) 之三 [2 – (2 – 甲氧基乙氧基) 乙基] 胺基 (0.105 mmol) 之溶液 , 於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後 , 添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1 – 乙基 – 3 – (3 – 二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol) 之溶液 , 於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09 N 的氫氧化鈉水溶液 (220 mL) , 於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和 , 再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9 g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出 , 析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中 , 得到標題的 HA – MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 227 萬。又 , 所得之結合體的 MTX

(66)

結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 1.4%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 209 萬，MTX 的結合率為 1.3%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.84 (m)、2.01 (br.s)、2.13 (m)、2.49 (t)、2.68 (m)、2.95 (m)、3.36 (br.s)、3.51 (br.s)、3.56 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.16 (t)、4.46 (br.s)、4.55 (br.d)、4.88 (d)、4.98 (d)、6.63 (d)、6.87-7.13 (m)、7.74 (d)、8.70 (s)

[實施例 2-6]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HA 的製造

於透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量: 約 230 萬) 中加入四氫呋喃 (THF) (10 mL) 之懸浮液中，添加溶解於超純水與 THF 之等量混合液 (20 mL) 之 3-羥基-3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (HOObt) (0.125 mmol) 及實施例 1-1 所得之化合物 (0.063 mmol) 之溶液後，添加溶解於超純水與 THF 的等量混合液 (10 mL) 之三 [2-(2-甲氧基乙氧基) 乙基] 胺基 (0.063 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後，添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol)

(67)

之溶液，於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09 N 的氫氧化鈉水溶液 (220 mL)，於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和，再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出，析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中，得到標題的 HA-MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 205 萬。又，所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 3.9%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 191 萬，MTX 的結合率為 3.8%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 1.84 (m)、2.02 (br.s)、2.15 (m)、2.53 (t)、2.70 (m)、2.96 (m)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.16 (t)、4.46 (br.s)、4.55 (br.s)、4.89 (s)、4.96 (d)、6.66 (d)、6.87-7.10 (m)、7.72 (d)、8.68 (s)

[實施例 2-7]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HA 的製造

於透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 中加入四氫呋喃 (THF) (10 mL) 之懸浮液中，添加溶解於

(68)

超純水與 THF 之等量混合液 (20 mL) 之 3-羥基-3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (HOObt) (0.125 mmol) 及實施例 1-1 所得之化合物 (0.125 mmol) 之溶液後, 添加超純水與 THF 的等量混合液 (10 mL), 於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後, 添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol) 之溶液, 於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09 N 的氫氧化鈉水溶液 (220 mL), 於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和, 再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出, 析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中, 得到標題的 HA-MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 197 萬。又, 所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 4.5%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化, 得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 174 萬, MTX 的結合率為 4.4%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 1.83 (m)、1.93 (m)、2.02 (br.s)、2.14 (m)、2.53 (t)、2.69 (m)、2.95 (m)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.16 (t)、4.46 (br.s)、

(69)

4.55 (br.d) 、 4.87 (d) 、 4.95 (d) 、 6.67 (d) 、 6.87
- 7.10 (m) 、 7.71 (d) 、 8.68 (s)

[實施例 2-8]

MTX - α - PhePhe - NHC₂H₄NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-2 所得之化合物 2 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 211 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA - MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 198 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

[實施例 2-9]

MTX - α - PhePhe - NHC₁₀H₂₀O₂NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-3 所得之化合物 3 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 183 萬，MTX 的結合率為 1.8%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA - MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1

(70)

相同方法求得分子量約為 155 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

[實施例 2-10]

MTX- α -PhePhe-NHC₈H₁₆O₂NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-4 所得之化合物 4 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 189 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 162 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

[實施例 2-11]

MTX- α -PhePhe-NHC₆H₁₂O₂NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-5 所得之化合物 5 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 192 萬，MTX 的結合率為 1.9%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1

(71)

相同方法求得分子量約為 162 萬，MTX 的結合率為 2.0%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 1.77 – 1.85 (m)、2.02 (br.s)、2.16 – 2.24 (m)、2.51 (m)、2.66 (m)、2.92 (m)、3.00 (m)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.72 (br.s)、3.83 (br.s)、4.20 (m)、4.46 (br.s)、4.55 (br.s)、6.68 (d)、6.95 – 7.18 (m)、7.76 (d)、8.72 (s)

{ 實施例 2 – 12 }

MTX – α – PhePhe – $\text{NHC}_4\text{H}_8\text{ONH}$ – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 6 所得之化合物 6 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 172 萬，MTX 的結合率為 2.0%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 149 萬，MTX 的結合率為 1.9%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 1.77 – 1.84 (m)、2.01 (br.s)、2.20 – 2.28 (m)、2.49 (m)、2.64 (m)、2.93 (m)、3.00 (m)、3.35 (br.s)、3.52 (br.s)、3.58 (br.s)、3.73 (br.s)、3.83 (br.s)、4.20 (t)、

(72)

4.47 (br.s) 、 4.55 (br.s) 、 4.92 (d) 、 5.06 (d) 、
6.64 (d) 、 6.94 – 7.19 (m) 、 7.77 (d) 、 8.73 (s)

[實施例 2 – 13]

MTX – α – PhePhe – NHC₅H₁₀NH – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 7 所得之化合物 7 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 214 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 196 萬，MTX 的結合率為 1.2%。

[實施例 2 – 14]

MTX – α – PhePhe – Lys – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 8 所得之化合物 8 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 189 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1

(73)

相同方法求得分子量約為 172 萬，MTX 的結合率為 1.4%

[實施例 2-15]

MTX - α - PheGly - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 80 萬）與實施例 1-2 所得之化合物 2（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 83 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA - MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 80 萬，MTX 的結合率為 1.4%

[實施例 2-16]

MTX - α - PheGly - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

於透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 80 萬）中加入四氫呋喃（THF）（10 mL）之懸浮液中，添加溶解於超純水與 THF 之等量混合液（20 mL）之 3-羥基-3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪（HOObt）（0.125 mmol）及實施例 1-2 所得之化合物 2（0.009 mmol）之溶液後，添加溶解於超純水與 THF 的等量混合液（10 mL）之三〔2-（2-甲氧基乙氧基）乙基〕胺（0.116

(74)

mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後，添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09 N 的氫氧化鈉水溶液 (220 mL)，於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1 N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和，再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出，析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中，得到標題的 HA-MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 83 萬。又，所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259nm) 測定下算出 0.5%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 81 萬，MTX 的結合率為 0.5%。

[實施例 2-17]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

於透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量: 約 80 萬) 中加入四氫呋喃 (THF) (10 mL) 之懸浮液中，添加溶解於超純水與 THF 之等量混合液 (20 mL) 之 3-羥基-3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (HOObt) (0.125 mmol) 及實施例 1-2 所得之化合物 2 (0.125 mmol)

(75)

) 之溶液後，添加超純水與 THF 的等量混合液 (10 mL)，於 5°C 下攪拌。攪拌 30 分鐘後，添加溶解於超純水 (10 mL) 之 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) (0.125 mmol) 之溶液，於 5°C 下攪拌 20 小時。該反應液中添加 0.09N 的氫氧化鈉水溶液 (220 mL)，於 5°C 下攪拌 3.5 小時。該溶液中添加 1 N 的鹽酸 (20 mL) 進行中和，再添加溶解於超純水 (45 mL) 的氯化鈉 (9 g) 的溶液時滴下乙醇 (600 mL) 進行乙醇析出，析出物以離心分離進行分離。析出物溶解於超純水 (40 mL) 中，得到標題的 HA-MTX 結合體水溶液。透明質酸作為標準物質之膠體過濾法所得之分子量約為 77 萬。又，所得之結合體的 MTX 結合率由紫外線吸收 (259 nm) 測定下算出 3.4%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 76 萬，MTX 的結合率為 3.4%。

[實施例 2-18]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-9 所得之化合物 9 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 199

(76)

萬，MTX 的結合率為 1.5%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 186 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.59 (m)、1.78 (m)、1.90-1.95 (m)、2.02 (br.s)、2.13-2.23 (m)、2.99-3.14 (m)、3.28 (s)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.26 (t)、4.46 (br.s)、4.54 (br.s)、4.92 (s)、6.93 (d)、7.13-7.20 (m)、7.66 (d)、8.69 (s)

[實施例 2-19]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₂NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量：約 230 萬) 與實施例 1-10 所得之化合物 10 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 144 萬，MTX 的結合率為 1.8%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.49 (m)、1.60 (m)、1.76 (m)、2.01 (br.s)、2.09-2.15 (m)、2.20-

(77)

2.28 (m) 、 2.99 – 3.09 (m) 、 3.10 – 3.17 (m) 、 3.33 (br.s) 、 3.51 (br.s) 、 3.57 (br.s) 、 3.71 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、 4.30 (m) 、 4.46 (br.s) 、 4.55 (br.d) 、 4.97 (s) 、 6.91 (d) 、 7.13 (m) 、 7.17 – 7.21 (m) 、 7.67 (d) 、 8.73 (s)

[實施例 2 – 20]

MTX – α – PheGly – NHC₈H₁₆O₂NH – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 11 所得之化合物 11 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 173 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 150 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

¹H-NMR (500MHz、D₂O) : δ 1.64 (m) 、 1.78 (m) 、 2.01 (br.s) 、 2.09 – 2.17 (m) 、 2.24 (m) 、 3.01 (m) 、 3.08 (m) 、 3.16 (m) 、 3.34 (br.s) 、 3.51 (br.s) 、 3.56 (br.s) 、 3.71 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、 4.31 (m) 、 4.46 (br.s) 、 4.54 (br.s) 、 4.97 (s) 、 6.91 (d) 、 7.11 (m) 、 7.14 – 7.21 (m) 、 7.67 (d) 、 8.72 (s)

(78)

〔實施例 2-21〕

MTX- α -PheGly-NHC₆H₁₂O₂NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-12 所得之化合物 12（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 150 萬，MTX 的結合率為 2.3%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 139 萬，MTX 的結合率為 2.3%。

〔實施例 2-22〕

MTX- α -PheGly-NHC₄H₈ONH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-13 所得之化合物 13（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 156 萬，MTX 的結合率為 2.0%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 140 萬，MTX 的結合率為 2.2%。

(79)

〔實施例 2-23〕

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-14 所得之化合物 14（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 166 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 152 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

〔實施例 2-24〕

MTX- α -Phe β Ala-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-15 所得之化合物 15（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 152 萬，MTX 的結合率為 1.5%。

〔實施例 2-25〕

(80)

MTX - α - Phe β Ala - NHC₂H₄NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-16 所得之化合物 16（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 209 萬，MTX 的結合率為 2.3%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 198 萬，MTX 的結合率為 2.3%。

[實施例 2-26]

MTX - α - Phe - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-17 所得之化合物 17（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 213 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 179 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

¹H-NMR（500MHz、D₂O）： δ 1.63（m）、1.79（m）、2.02（br.s）、2.20（m）、2.28（m）、3.08（m）、3.10 - 3.20（m）、3.31（s）、3.35（br.s）、3.52（br.s）

(81)

)、3.56 (br.s)、3.72 (br.s)、3.84 (br.s)、4.28 (t)
)、4.47 (br.s)、4.54 (br.s)、4.97 (s)、6.94 (d)
 、7.06 (t)、7.13 (d)、7.67 (d)、8.73 (s)

[實施例 2-27]

MTX- α -Ile-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-18 所得之化合物 18 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 192 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 162 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

¹H-NMR (500MHz, D₂O) : δ 0.84 (t)、0.89 (d)、1.18 (m)、1.47 (m)、1.78 (m)、1.83-1.90 (m)、2.02 (br.s)、2.36 (m)、3.24 (s)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.63 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.09 (d)、4.45 (br.s)、4.55 (br.s)、4.93 (s)、6.92 (d)、7.72 (d)、8.68 (s)

[實施例 2-28]

MTX- α -Ile-NHC₂H₄NH-HA 的製造

(82)

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-19 所得之化合物 19（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 231 萬，MTX 的結合率為 2.1%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 202 萬，MTX 的結合率為 2.1%。

[實施例 2-29]

MTX- α -Glu-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-20 所得之化合物 20（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 201 萬，MTX 的結合率為 1.5%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 183 萬，MTX 的結合率為 1.5%。

¹H-NMR（500MHz、D₂O）： δ 1.57 (m)、1.77 (m)、2.02 (br.s)、2.25 (m)、2.37 (t)、3.24 (s)、3.25 (s)、3.35 (br.s)、3.51 (br.s)、3.56 (br.s)、

(83)

3.71 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、 4.13 (m) 、 4.22 (m) 、
4.36 (m) 、 4.46 (br.s) 、 4.55 (br.s) 、 4.91 (s) 、
6.94 (d) 、 7.76 (d) 、 8.66 (s) 、 8.68 (s)

注：底線記號部分為糖醛銻，由此可推斷其為 α 體與 γ 體的混合物。

[實施例 2-30]

MTX - α - Glu - NHC₂H₄NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-21 所得之化合物 21 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 226 萬，MTX 的結合率為 2.1%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA - MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 206 萬，MTX 的結合率為 2.1%。

[實施例 2-31]

MTX - α - Tyr - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-22 所得之化合物 22 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為

(84)

190 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 176 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.63 (m)、1.77 (m)、2.02 (br.s)、2.23 - 2.35 (m)、2.95 (m)、3.03 - 3.21 (m)、3.34 (br.s)、3.51 (br.s)、3.58 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.28 (m)、4.47 (br.d)、4.54 (br.s)、4.92 (s)、6.58 (d)、6.94 (d)、7.66 (d)、8.68 (s)

[實施例 2-32]

MTX - α - Typ - $\text{NHC}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{NH}$ - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量：約 230 萬) 與實施例 1-23 所得之化合物 23 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 187 萬，MTX 的結合率為 1.9%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 139 萬，MTX 的結合率為 1.9%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.53 (m)、1.74 (m)

(85)

、 2.01 (br.s) 、 2.09 – 2.15 (m) 、 2.46 (m) 、 2.85 (m) 、 3.05 (m) 、 3.35 (br.s) 、 3.52 (br.s) 、 3.58 (br.s) 、 3.74 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、 4.27 (m) 、 4.48 (br.d) 、 4.55 (br.s) 、 6.83 (d) 、 6.99 (s) 、 7.05 (s) 、 7.15 (d) 、 7.43 (d) 、 7.49 (s) 、 8.74 (s)

[實施例 2 – 33]

MTX – α – Ser – NHC₁₀H₂₀O₃NH – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 24 所得之化合物 24 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 186 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 165 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

¹H-NMR (500MHz、D₂O) : δ 1.61 (m)、1.76 (m) 、 2.02 (br.s) 、 2.38 (t) 、 2.51 (m)、3.24 (s) 、 3.25 (s) 、 3.35 (br.s) 、 3.50 (br.s) 、 3.56 (br.s) 、 3.58 (br.s) 、 3.71 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、 4.28 (m)、4.39 (m) 、 4.46 (br.s) 、 4.54 (br.s) 、 4.91 (s) 、 6.93 (d) 、 7.70 (d)、7.76 (d) 、 8.66 (s) 、 8.68 (s)

(86)

〔實施例 2-34〕

MTX- α -Leu-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-25 所得之化合物 25（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 189 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 147 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

¹H-NMR（500MHz、D₂O）： δ 0.84（d）、0.89（d）、1.52-1.68（m）、1.72-1.83（m）、2.01（br.s）、2.45（t）、3.34（br.s）、3.50（br.s）、3.57（br.s）、3.72（br.s）、3.83（br.s）、4.28（m）、4.45（br.d）、4.54（br.s）、4.95（s）、6.91（d）、7.72（d）、8.69（s）

〔實施例 2-35〕

MTX- α -Val-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-26 所得之化合物 26（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合

(87)

體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 187 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 156 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 0.93 (m)、1.78 (m)、2.01 (br.s)、2.11-2.19 (m)、2.47 (m)、3.24 (s)、3.34 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.63 (br.s)、3.72 (br.s)、3.83 (br.s)、4.02 (d)、4.47 (br.d)、4.54 (br.s)、4.95 (s)、6.91 (d)、7.72 (d)、8.69 (s)

[實施例 2-36]

MTX- α -His-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量：約 230 萬) 與實施例 1-27 所得之化合物 27 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 191 萬，MTX 的結合率為 1.2%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 162 萬，MTX 的結合率為 1.2%。

(88)

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 1.70 (m)、1.79 (m)、2.01 (br.s)、2.23 – 2.36 (m)、3.13 – 3.22 (m)、3.26 (s)、3.34 (br.s)、3.50 (br.s)、3.56 (br.s)、3.61 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.33 (t)、4.46 (br.d)、4.54 (br.s)、4.96 (s)、6.92 (d)、7.30 (s)、7.73 (d)、8.57 (s)、8.70 (s)

〔實施例 2-37〕

MTX- α -Pro-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-28 所得之化合物 28 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 167 萬，MTX 的結合率為 1.5%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 152 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

〔實施例 2-38〕

MTX- α - β Ala-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-29 所得之化合物 29 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合

(89)

體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 191 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 143 萬，MTX 的結合率為 1.7%

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.60 (m)、1.67 (m)、1.79 (m)、2.01 (br.s)、2.42 (m)、2.47 (m)、3.09 (t)、3.14 (t)、3.34 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.73 (br.s)、3.82 (br.s)、4.47 (br.s)、4.54 (br.d)、4.96 (s)、6.92 (d)、7.73 (d)、8.70 (s)

[實施例 2-39]

MTX- γ -PhePhe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量：約 230 萬) 與實施例 1-30 所得之化合物 30 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 209 萬，MTX 的結合率為 1.5%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 188 萬，MTX 的結合率為 1.5%

(90)

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.52 (m) 、 1.81 (m) 、 2.02 (br.s) 、 2.16 – 2.29 (m) 、 2.60 (m) 、 2.76 (m) 、 2.99 (m) 、 3.07 (m) 、 3.18 – 3.26 (m) 、 3.32 (s) 、 3.35 (br.s) 、 3.52 (br.s) 、 3.56 (br.s) 、 3.66 (br.s) 、 3.73 (br.s) 、 3.84 (br.s) 、 4.15 (t) 、 4.27 (t) 、 4.36 (m) 、 4.47 (br.s) 、 4.55 (br.d) 、 6.86 (d) 、 6.92 – 6.99 (m) 、 7.02 – 7.16 (m) 、 7.79 (d) 、 8.71 (s)

[實施例 2 – 40]

MTX – γ – PhePhe – $\text{NHC}_6\text{H}_{12}\text{O}_2\text{NH}$ – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 31 所得之化合物 31 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 189 萬，MTX 的結合率為 2.0%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 176 萬，MTX 的結合率為 2.0%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 2.02 (br.s) 、 2.15 – 2.24 (m) 、 2.60 (m) 、 2.74 – 2.83 (m) 、 3.12 – 3.19 (m) 、 3.20 – 3.23 (m) 、 3.29 (s) 、 3.35 (br.s) 、 3.51 (br.s) 、 3.57 (br.s) 、 3.71 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、

(91)

4.21 (t) 、 4.26 (t) 、 4.32 (m) 、 4.46 (br.s) 、 4.55 (br.d) 、 6.84 (s) 、 6.93 (d) 、 7.00 – 7.13 (m) 、 7.76 (d) 、 8.64 (s)

[實施例 2 – 41]

MTX – γ – PhePhe – NHC₄H₈ONH – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 32 所得之化合物 32 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 196 萬，MTX 的結合率為 2.1%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 180 萬，MTX 的結合率為 2.01%。

[實施例 2 – 42]

MTX – γ – PheGly – NHC₁₀H₂₀O₃NH – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 33 所得之化合物 33 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 190 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到

(92)

標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 172 萬，MTX 的結合率為 1.5%

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.69 (m)、1.79 (m)、2.02 (br.s)、2.19-2.26 (m)、2.29 (m)、2.66 (m)、2.82 (m)、3.13 (m)、3.20 (m)、3.29 (s)、3.34 (br.s)、3.51 (br.s)、3.56 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.16 (t)、4.33 (m)、4.46 (br.s)、4.54 (br.s)、4.94 (d)、6.82 (s)、6.99-7.08 (m)、7.75 (d)、8.68 (s)

[實施例 2-43]

MTX- γ -Phe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg, 分子量：約 230 萬) 與實施例 1-34 所得之化合物 34 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 187 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 165 萬，MTX 的結合率為 1.7%

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.44 (m)、1.80 (m)、2.02 (br.s)、2.31 (m)、2.53 (m)、2.68 (m)、

(93)

2.88 (m) 、 3.01 (m) 、 3.13 (m) 、 3.18 (m) 、 3.31 (s) 、 3.35 (br.s) 、 3.51 (br.s) 、 3.58 (br.s) 、 3.63 (br.s) 、 3.72 (br.s) 、 3.84 (br.s) 、 4.02 (t) 、 4.37 (m) 、 4.47 (br.s) 、 4.55 (br.s) 、 4.86 (d) 、 4.98 (d) 、 6.76 (d) 、 7.02 – 7.09 (m) 、 7.78 (d) 、 8.72 (s)

[實施例 2 – 44]

MTX – γ – Glu – NHC₁₀H₂₀O₃NH – HA 的製造

與實施例 2 – 1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1 – 35 所得之化合物 35 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA – MTX 結合體之水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 179 萬，MTX 的結合率為 1.6%。

該水溶液以與實施例 2 – 1 相同方法進行純化，得到標題的 HA – MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2 – 1 相同方法求得分子量約為 149 萬，MTX 的結合率為 1.7%。

¹H-NMR (500MHz，D₂O) : δ 1.61 – 1.71 (m) 、 1.73 – 1.88 (m) 、 2.01 (br.s) 、 2.23 (m) 、 2.32 (t) 、 2.38 – 2.55 (m) 、 3.07 (m) 、 3.34 (br.s) 、 3.51 (br.s) 、 3.56 (br.s) 、 3.73 (br.s) 、 3.83 (br.s) 、 4.15 (m) 、 4.46 (br.s) 、 4.55 (br.s) 、 4.95 (s) 、 6.91 (d) 、 7.70 (d) 、 8.71 (s)

(94)

〔實施例 2-45〕

MTX - α - D - Phe - D - Phe - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-36 所得之化合物 36（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 148 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA - MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 135 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

〔實施例 2-46〕

MTX - γ - D - Phe - D - Phe - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-37 所得之化合物 37（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA - MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 160 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA - MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1

(95)

相同方法求得分子量約為 141 萬，MTX 的結合率為 1.3%。

[實施例 2-47]

MTX- α -AsnPhePhe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽 (500 mg，分子量：約 230 萬) 與實施例 1-38 所得之化合物 38 (0.031 mmol) 進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 210 萬，MTX 的結合率為 1.3%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 178 萬，MTX 的結合率為 1.2%。

¹H-NMR (500MHz, D₂O) : δ 1.60 (m)、1.80 (m)、2.02 (br.s)、2.34 (m)、2.54 (m)、2.60-3.05 (m)、3.35 (br.s)、3.52 (br.s)、3.57 (br.s)、3.64 (br.s)、3.72 (br.s)、3.83 (br.s)、4.28 (m)、4.46 (br.s)、4.55 (br.s)、6.61 (d)、6.77 (t)、6.82-7.36 (m)、7.76 (d)、7.80 (d)、8.61 (s)、8.64 (s)

注：底線記號部分為負訊息，由此可推斷其為 α 體與 γ 體的混合物。

(96)

〔實施例 2-48〕

MTX- α / γ - GlyPheLeuGly - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-39 所得之化合物 39（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 206 萬，MTX 的結合率為 1.4%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 185 萬，MTX 的結合率為 1.3%。

¹H-NMR（500MHz、D₂O）： δ 0.72（d）、0.77（d）、0.81（d）、1.32（m）、1.50（m）、1.67-1.82（m）、2.01（br.s）、2.23（m）、2.33（m）、2.75-3.03（m）、3.51（br.s）、3.58（br.s）、3.71（br.s）、3.83（br.s）、4.16-4.28（m）、4.46（br.s）、4.54（br.s）、6.85（d）、6.92-7.06（m）、7.75（d）、7.78（d）、8.63（s）、8.65（s）

注：底線記號部分為負訊息，由此可推斷其為 α 體與 γ 體的混合物。

〔實施例 2-49〕

MTX- α PhePhe - NHC₁₀H₂₀O₃NH - HA 的製造

(97)

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-2 所得之化合物 2（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 33 萬，MTX 的結合率為 1.1%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.67 (m)、1.79 (m)、1.84-1.94 (m)、2.02 (br.s)、2.12-2.20 (m)、2.59 (m)、2.77 (m)、2.91 (m)、2.99 (m)、3.12-3.25 (m)、3.35 (br.s)、3.49 (br.s)、3.51 (br.s)、3.57 (br.s)、3.71 (br.s)、3.83 (br.s)、4.18 (t)、4.45 (br.d)、4.55 (br.d)、4.88 (d)、4.96 (d)、6.76 (d)、6.95-7.10 (m)、7.72 (d)、8.68 (s)

[實施例 2-50]

MTX- α PhePhe-NHC₂H₄NH-HA 的製造

與實施例 2-1 相同方法下，使透明質酸鈉鹽（500 mg，分子量：約 230 萬）與實施例 1-1 所得之化合物 1（0.031 mmol）進行反應，得到標題的 HA-MTX 結合體之水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 34，MTX 的結合率為 2.0%。

該水溶液以與實施例 2-1 相同方法進行純化，得到

(98)

標題的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。與實施例 2-1 相同方法求得分子量約為 34 萬，MTX 的結合率為 1.9%。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz、 D_2O) : δ 1.83 (m)、2.01 (br.s)、2.12 (m)、2.52 (t)、2.69 (m)、2.95 (m)、3.34 (br.d)、3.49 (br.d)、3.57 (br.s)、3.70 (br.s)、3.83 (br.s)、4.16 (t)、4.45 (br.d)、4.54 (br.d)、4.87 (d)、4.96 (d)、6.66 (d)、6.88-7.09 (m)、7.72 (d)、8.68 (s)

上述實施例 2-1~2-50 所得之本發明的 HA-MTX 結合體歸納如下表。

[表 1]

實施例	結合位置 (α/γ)	含有肽鏈的連接體	水溶液		無菌水溶液	
			MTX 之結 合率(%)	結合體之分子量 (道爾頓)	MTX 之 結合率(%)	結合體之分子 量(道爾頓)
實施例 2-1	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	195 萬	2.1	186 萬
實施例 2-2	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.9	228 萬	1.9	218 萬
實施例 2-2'	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.2	219 萬	2.3	206 萬
實施例 2-3	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	0.6	232 萬	0.5	217 萬
實施例 2-4	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.1	232 萬	1.1	223 萬
實施例 2-5	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.4	227 萬	1.3	209 萬
實施例 2-6	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	3.9	205 萬	3.8	191 萬
實施例 2-7	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	4.5	197 萬	4.4	174 萬
實施例 2-8	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.6	211 萬	1.4	198 萬
實施例 2-9	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH-	1.8	183 萬	1.7	155 萬
實施例 2-10	α	-Phe-Phe-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH-	1.6	189 萬	1.6	162 萬
實施例 2-11	α	-Phe-Phe-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH-	1.9	192 萬	2.0	162 萬
實施例 2-12	α	-Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH-	2.0	172 萬	1.9	149 萬
實施例 2-13	α	-Phe-Phe-NH-C ₅ H ₁₀ -NH-	1.4	214 萬	1.2	196 萬
實施例 2-14	α	-Phe-Phe-Lys-	1.4	189 萬	1.4	172 萬
實施例 2-15	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	83 萬	1.4	80 萬
實施例 2-16	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	0.5	83 萬	0.5	81 萬
實施例 2-17	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	3.4	77 萬	3.4	76 萬



(100)

〔表 1-2〕

實施例 2-18	α	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	199 萬	1.4	186 萬
實施例 2-19	α	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH-	NT	NT	1.8	144 萬
實施例 2-20	α	-Phe-Gly-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH-	1.6	173 萬	1.6	150 萬
實施例 2-21	α	-Phe-Gly-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH-	2.3	150 萬	2.3	139 萬
實施例 2-22	α	-Phe-Gly-NH-C ₄ H ₈ O-NH-	2.0	156 萬	2.2	140 萬
實施例 2-23	α	-Phe-Pro-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.6	166 萬	1.6	152 萬
實施例 2-24	α	-Phe- β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	NT	NT	1.5	152 萬
實施例 2-25	α	-Phe- β Ala-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.3	209 萬	2.3	198 萬
實施例 2-26	α	-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	213 萬	1.7	179 萬
實施例 2-27	α	-Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	192 萬	1.7	162 萬
實施例 2-28	α	-Ile-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	231 萬	2.1	202 萬
實施例 2-29	α	-Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	201 萬	1.5	183 萬
實施例 2-30	α	-Glu-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	226 萬	2.1	206 萬
實施例 2-31	α	-Tyr-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.6	190 萬	1.7	176 萬
實施例 2-32	α	-Trp-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.9	187 萬	1.9	139 萬
實施例 2-33	α / γ	-Ser-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	186 萬	1.7	165 萬
實施例 2-34	α	-Leu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	189 萬	1.6	147 萬
實施例 2-35	α	-Val-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	187 萬	1.7	156 萬
實施例 2-36	α	-His-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.2	191 萬	1.2	162 萬
實施例 2-37	α	-Pro-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	167 萬	1.6	152 萬
實施例 2-38	α	- β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	191 萬	1.7	143 萬
實施例 2-39	γ	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	209 萬	1.5	188 萬
實施例 2-40	γ	-Phe-Phe-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH-	2.1	189 萬	2.0	176 萬
實施例 2-41	γ	-Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH-	2.1	196 萬	2.1	180 萬



(101)

〔表 1-3〕

實施例 2-42	γ	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	1190 萬	1.5	172 萬
實施例 2-43	γ	-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	187 萬	1.7	165 萬
實施例 2-44	γ	-Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.6	179 萬	1.7	149 萬
實施例 2-45	α	-Dphe-DPhe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	148 萬	1.4	135 萬
實施例 2-46	γ	-Dphe-DPhe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	160 萬	1.3	141 萬
實施例 2-47	α / γ	-Asn-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.3	210 萬	1.2	178 萬
實施例 2-48	α / γ	-Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	206 萬	1.3	185 萬
實施例 2-49	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	NT	NT	1.1	33 萬
實施例 2-50	α	Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.0	34 萬	1.9	34 萬

(102)

〔實驗例 1〕

黏彈性的測定

透明質酸（分子量為 190 萬，80 萬）與實施例 2-1、2-8、2-18、2-27 及 2-29 之結合體的無菌水溶液的黏彈性，以 CSL500 型壓力控制式測量器（Carri-Med 公司製）使用直徑 4cm 的圓盤於 37°C 下進行測定。如圖 1 所示，各結合體為分子量 80 萬與 190 萬之透明質酸的中間顯示黏彈性。

〔實驗例 2〕

滑膜細胞增殖抑制作用

使用人類滑膜細胞（HFLS），對於以 TNF- α 刺激之細胞增殖亢進的本發明 HA-MTX 結合體的影響作檢討。關節風濕（RA）的主病巢為滑膜組織，已知作為其特徵之一為滑膜細胞對異常增殖而形成肉芽組織，破壞關節軟骨・骨。又，變形性關節症（OA）亦會出現二次性滑膜炎。對於 OA，沒有如 RA 所見到的滑膜細胞之顯著增殖變化，但滑膜炎成為膝蓋 OA 的特徵之關節水症或疼痛、發熱之發炎症狀的原因（宮坂信之們編輯，「骨・關節疾病」2003 年，朝倉書店）。因此，阻礙以發炎症細胞素之 TNF- α 亢進之滑膜細胞的增殖的化合物為，可抑制或治療 RA 及 OA 的病證進行之藥劑。

作為被驗物質使用實施例 3 的 HA-MTX 結合體之無菌水溶液。HFLS 為來自 RA 患者之人類滑膜細胞（HFLS

(103)

— OA, CA400-05, Lot No.: 1442) 由 CELL APPLICATIONS INS. 購得。

使用 HFLS 以 96 孔皿 (Falcon) 進行 5000 細胞 / 孔的播種，以含有 3% FBS、1x Antibiotic-antimycotic (GIBCO) 之 IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) 培養基進行 3 小時培養。細胞附著後，添加 TNF- α (最終濃度為 10ng/mL)、各濃度的 HA-MTX 結合體後經 5 天培養。培養結束前 2 天，加入 37 kBq/well 的 [^3H] - 脫氧尿苷 (MORAVEK)，進對細胞內的 [^3H] - 脫氧尿苷吸入量 (放射活性) 以閃爍計數器進行。細胞的回收以 0.05% 胰蛋白酶 - 0.2% EDTA 剝開細胞進行。

各實驗所測定的各被驗物質之放射活性為，以未添加被驗物質所培養的群之放射活性作為對照組下算出相對值 (% of control)。HA-MTX 結合體的 MTX 濃度為，因 1mg/mL 的透明質酸中游離的羧基為 $2.49 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (1g/401/L: 401 為 N-乙醯葡萄糖胺 + 葡萄糖醛酸的分子量)，故該值乘上 MTX 的結合率而求得。(MTX 結合率為 1% 的 HA-MTX 結合體為 1mg/mL 時，MTX 的濃度為 $2.49 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 使用所得的值以 4 parameter logistic 法 (解析軟體 GraphPad Prism 3.02 及 4.02) 算出細胞增殖阻礙活性 (IC₅₀ 值)。

HFLS-RA 的 HA-MTX 結合體之 IC₅₀ 值如表 2 所示。

(104)

〔表 2-1〕

表 2 經 TNF- α 刺激之人類滑膜細胞的增殖抑制作用

	結合位置	含有肽鏈的连接體	MTX 之結	結合體之分	IC ₅₀
	(α/γ)		合率(%)	子量(道爾頓)	(mol/L)
實施例 2-1	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	186 萬	3.6E-07
實施例 2-2	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.9	218 萬	1.4E-07
實施例 2-2'	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.3	206 萬	7.2E-07
實施例 2-4	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.1	223 萬	1.1E-05
實施例 2-5	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.3	209 萬	1.1E-06
實施例 2-6	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	3.8	191 萬	9.1E-08
實施例 2-8	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	198 萬	8.4E-07
實施例 2-9	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH-	1.7	155 萬	1.3E-06
實施例 2-10	α	-Phe-Phe-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH-	1.6	162 萬	1.2E-06
實施例 2-11	α	-Phe-Phe-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH-	2.0	162 萬	2.5E-07
實施例 2-12	α	-Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH-	1.9	149 萬	3.0E-07
實施例 2-13	α	-Phe-Phe-NH-C ₅ H ₁₀ -NH-	1.2	196 萬	1.5E-06
實施例 2-14	α	-Phe-Phe-Lys-	1.4	172 萬	1.5E-05
實施例 2-15	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	80 萬	4.8E-07
實施例 2-16	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	0.5	81 萬	1.3E-05
實施例 2-17	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	3.4	76 萬	1.3E-05
實施例 2-18	α	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	186 萬	9.2E-06
實施例 2-19	α	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH-	1.8	144 萬	5.4E-06

(105)

〔表 2-2〕

實施例 2-20	α	-Phe-Gly-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH-	1.6	150 萬	1.8E-05
實施例 2-21	α	-Phe-Gly-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH-	2.3	139 萬	8.3E-07
實施例 2-22	α	-Phe-Gly-NH-C ₄ H ₈ O-NH-	2.2	140 萬	3.0E-06
實施例 2-23	α	-Phe-Pro-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.6	152 萬	1.2E-05
實施例 2-24	α	-Phe- β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	152 萬	3.5E-06
實施例 2-25	α	-Phe- β Ala-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.3	198 萬	2.9E-07
實施例 2-26	α	-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	179 萬	1.7E-06
實施例 2-27	α	-Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	162 萬	3.1E-06
實施例 2-28	α	-Ile-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	202 萬	1.2E-05
實施例 2-29	α	-Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	183 萬	8.4E-06
實施例 2-30	α	-Glu-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	206 萬	5.4E-05
實施例 2-31	α	-Tyr-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	176 萬	7.0E-06
實施例 2-32	α	-Trp-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.9	139 萬	4.7E-06
實施例 2-33	α	-Ser-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	165 萬	3.6E-05
實施例 2-34	α	-Leu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.6	147 萬	3.6E-06
實施例 2-35	α	-Val-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	156 萬	1.1E-05
實施例 2-36	α	-His-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.2	162 萬	1.7E-05
實施例 2-39	γ	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	188 萬	3.2E-06
實施例 2-42	γ	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	172 萬	1.4E-05
實施例 2-47	α/γ	-Asn-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.2	178 萬	1.1E-06
實施例 2-48	α/γ	-Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.3	185 萬	1.3E-06
實施例 2-49	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.1	33 萬	1.3E-05
MTX 單獨	—	—	—		5.5E-08

(106)

由表 2 確認任一 HA - MTX 結合體皆具有可抑制經 TNF - α 刺激之 HFLS 的細胞增殖亢進之作用。

[實驗例 3]

對於 mBSA 誘導單關節炎模型之膝關節腫脹抑制效果

本發明 HA - MTX 結合體之活體內滑膜炎抑制作用，以老鼠 mBSA (methylated bovine serum albumin) 誘導單關節炎模型之膝關節腫脹的抑制效果作評估。本實驗所使用的 mBSA 誘導單關節炎模型係作為抗原誘發關節炎模型而被泛用者，已知其可誘發滑膜炎 (Sven E. Andersson, et al. The Journal of Rheumatology (1998) 25 : 9, 1772-7)，故本模型若被確認具有活體內關節腫脹抑制效果時，表示可推衍其具有滑膜炎抑制作用。於活體內可抑制滑膜炎的化合物為，可適用於滑膜炎所引起的關節病 (RA 或 OA 等) 之治療藥上。

動物使用 LEW / Crj 系老鼠 (日本查爾斯 · 里貝，6 週齡，雄)。於誘導關節炎的 21 天及 14 天前，將 2mg / mL 的 mBSA (Calbiochem) 水溶液與等量的 Freund's 完全助劑 (Difco) 所製成的 0.5 mL 乳濁液皮下投予於老鼠的下腹。關節炎為，2mg / mL 的 50 μ L 之 mBSA 水溶液投予於右膝關節內進行誘導。左膝關節為無處理下作為各個體的對照組。被驗物質 (無菌水溶液) 及對照藥之透明質酸於關節炎誘導 7 天及 1 天前與 7 天後，進行 50 μ L 的右膝關節投予。

(107)

膝關節腫脹的測定為兩膝關節的幅度以游標測定，有左右差（右膝直徑－左膝直徑）時表示膝關節腫脹。進行關節炎誘導前至 2 週間，每週進行 2 次的頻率測定膝關節幅度，此經時性變化算出 AUC（Area Under the Curve 的略稱，亦稱為曲線下面積，此表示關節腫脹的經時性曲線下之面積）。測定時算出 AUC 的平均值及標準偏差，進行被驗物質投予群與 HA 投予群下無對應的 t 檢定，判斷出危險率未達 5% 時有顯著差。統計解析為使用 SAS version 6.12 或 8.02（SAS 因司第佳日本）。又，各被驗物質之 AUC 係以 HA 投予群作為對照組，算出各被驗物質的相對值（% of control）。

本發明的各 HA－MTX 結合體之效果以上述方法所檢討之結果如表 3 所示。

{ 3-1 }
表 3 對於 mBSA 誘導單關節炎模型的關節腫脹之 HA - MTX 結合體的抑制作用

	結合位置 (α/γ)	含有肽鏈的連接體	MTX 之結 合率(%)	結合體之分子 量 (道爾頓)	AUC (% 對照組) (平均值 \pm SEM)	P 值
實施例 2-1	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	186 萬	48.5 \pm 5.3	P<0.0001
實施例 2-2	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.9	218 萬	45.0 \pm 6.8	P<0.0001
實施例 2-2'	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.3	206 萬	65.5 \pm 7.5	P<0.005
實施例 2-3	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	0.5	217 萬	76.2 \pm 7.7	P<0.05
實施例 2-4	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.1	223 萬	69.0 \pm 6.5	P<0.005
實施例 2-5	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.3	209 萬	51.7 \pm 3.8	P<0.0001
實施例 2-6	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	3.8	191 萬	41.6 \pm 7.6	P<0.0001
實施例 2-7	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	4.4	174 萬	46.5 \pm 4.8	P<0.0001
實施例 2-8	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	198 萬	54.9 \pm 7.2	P<0.005
實施例 2-10	α	-Phe-Phe-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH-	1.6	162 萬	63.7 \pm 9.1	P<0.05
實施例 2-13	α	-Phe-Phe-NH-C ₅ H ₁₀ -NH-	1.2	196 萬	60.5 \pm 9.9	P<0.01
實施例 2-14	α	-Phe-Phe-Lys-	1.4	172 萬	54.3 \pm 7.4	P<0.0005
實施例 2-17	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	3.4	76 萬	56.1 \pm 8.2	P<0.01
實施例 2-18	α	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	186 萬	61.5 \pm 4.7	P<0.005
實施例 2-20	α	-Phe-Gly-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH-	1.6	150 萬	65.3 \pm 9.6	P<0.01
實施例 2-21	α	-Phe-Gly-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH-	2.3	139 萬	47.4 \pm 8.8	P<0.0005
實施例 2-27	α	-Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	162 萬	75.1 \pm 6.8	P<0.05
實施例 2-28	α	-Ile-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	202 萬	63.5 \pm 4.7	P<0.005
實施例 2-29	α	-Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.5	183 萬	68.8 \pm 6.7	P<0.005
實施例 2-30	α	-Glu-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	206 萬	58.3 \pm 7.4	P<0.005
實施例 2-31	α	-Tyr-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	176 萬	67.7 \pm 6.2	P<0.005
實施例 2-38	α	- β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	143 萬	69.3 \pm 4.2	P<0.001
實施例 2-41	α	-Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH-	2.1	180 萬	67.1 \pm 8.3	P<0.05
實施例 2-47	α/γ	-Asn-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.2	178 萬	42.1 \pm 6.3	P<0.001
實施例 2-48	α/γ	-Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.3	185 萬	58.8 \pm 11.6	P<0.05



(109)

由表 3 結果得知，本次所檢討的 HA-MTX 結合體與 HA 投予群比較，皆顯示對關節炎模型之膝關節腫脹具有顯著的抑制作用。又，若注意到結合於 HA 的 MTX 結合率之影響時，特別於 MTX 的結合率為 0.5 至 4.4%（實施例 1~7）時，與 HA 投予群相比對於關節炎模型的膝關節腫脹更顯示顯著的抑制作用。

〔實驗例 4〕

依據實施例 3 的方法，以驗證本發明的 HA-MTX 結合體之有用性為目的，1) 實施例 2-2 所調製的 HA-MTX 結合體（無菌水溶液）之投予群、2) 含有與該 HA-MTX 結合體所含的 MTX 等量之 MTX 的溶液之投予群、及 3) 含有與該結合體所含之等量 MTX 及透明質酸（HA）的混合物（HA+MTX）之投予群，比較這些投予群間的關節腫脹抑制作用。本試驗的膝關節腫脹之經時性變化如圖 2 所示，及 AUC 如圖 3 所示。圖 2 及圖 3 所示結果可確認，與 MTX 單體及 MTX 與 HA 的混合物相比，HA-MTX 結合體具有對關節炎模型之關節腫脹具有顯著強的抑制作用。因此，MTX 與 HA 的結合可顯著提高 MTX 的關節腫脹抑制作用已明朗化。

由上述得知，本發明的 HA-MTX 結合體為具有於 HA 時未被確認的活體外經 TNF- α 刺激所引起的人類滑膜細胞增殖之抑制作用，及活體內減輕已發病模型的滑膜炎之作用。又，關節炎模型中，對於 MTX 單獨及 HA 與

(110)

MTX 的混合物無法充分顯示滑膜炎之減輕作用而言，HA-MTX 結合體則可發揮強力的滑膜炎減輕作用已明朗化。

[實施例 5]

對膠原關節炎模型之影響

對於 HA-MTX 結合體之活體內滑膜炎抑制作用，以使用被泛用的老鼠膠原關節炎模型（金氏們，「關節外科」（1998）、Vol. 17, No.2, 111-21）作為關節風濕（RA）模型進行評估。本模型中可抑制發炎的本發明化合物可適用於以 RA 作為代表的自身抗原誘發之免疫疾病治療上。

動物為使用 DA/Slc 老鼠（日本 SLC（股），11 週齡，雌）。將牛 II 型膠原（膠原技術研修會）溶解於 0.01 mol/L 乙酸水溶液至 1.5mg/mL，加入等量的 Freund's 完全助劑（Difco）製成乳濁液。將此乳濁液對老鼠背部皮內 4 處，以 1 處投予約 0.1 mL 的合計 0.4 mL 量進行投予，誘發關節炎。實施例 3-7 的被驗物質（無菌水溶液）及對照藥劑的透明質酸（HA）與生理食鹽水（Saline）於，於敏化日開始每 5 天 1 次，將 50 μ L 僅投予於右膝關節內。左膝關節則作為無處理群。又，作為病態模型的對照組，對未誘導關節炎的動物（normal）之右膝關節內投予生理食鹽水。

膝關節腫脹的變化為，兩膝的關節幅度以游標測定，

(111)

再與正常群的關節幅度比較觀察。關節炎誘導前至 23 天後進行一週 2 次的觀察。對於膝關節幅度的測定值，算出每測定時的平均值及標準誤差，進行被驗物質群與 HA 投予群下無對應的 t 檢定，判斷出危險率未達 5% 時有顯著差。統計解析為使用 SAS version 8.02 (SAS 因司第佳日本)。

本發明的 HA-MTX 結合體之效果以上述方法進行檢討的結果如圖 4 所示。

圖 4 所示結果得知，本發明的 HA-MTX 結合體與 HA 投予群相比，對於膠原關節炎的誘導所引起的腫脹關節幅度有著顯著抑制作用，其關節幅度之經時性變化幾乎與正常群同等水準。又，該效果僅於投予 HA-MTX 結合體之部位（右膝）觀察到，對於非投予部位（左膝）則無被觀察到。如此表示本發明的化合物的表現作用僅限於投予部位。

[實驗例 6]

對於膠原酶誘導關節炎 (OA) 模型之關節腫脹抑制效果

將 HA-MTX 結合體之活體內之滑膜炎抑制作用以膠原酶誘導 OA 模型老鼠進行評估。膠原酶誘導 OA 模型為，關節內注入膠原酶水溶液，而直接消化軟骨組織的膠原，於關節內誘發發炎的模型。該模型顯示與關節軟骨變性或滑膜炎等人類 OA 病態類似之病理組織學性變化，適用於 OA 治療藥之評估上 (Takanori K. et al., Osteoarthritis

(112)

and Cartilage (1998) 6, 177-86)。因此，可抑制本模型之發炎的化合物可適用於 OA 治療藥上。

動物為使用 SD/Crj 老鼠（日本查爾斯·里貝，6 週齡，雄）。將 50 μ L 的 1.5% 膠原酶（SIGMA）溶液僅投予於右膝關節腔內誘導出關節炎。左膝關節因作為各個體的對照組故未進行任何處理。被驗物質於關節炎誘導的 7 天及 1 天前作 1 週 1 次比率將 50 μ L 投予於右膝關節內。

膝關節腫脹的測定為兩膝關節的幅度以游標測定，有左右差（右膝直徑 - 左膝直徑）時表示膝關節腫脹。進行關節炎誘導前至 20 天，每週進行 2 次的頻率測定膝關節幅度，此經時性變化算出 AUC。測定時算出 AUC 的平均值及標準偏差，進行被驗物質投予群與 HA 投予群下無對應的 t 檢定，判斷出危險率未達 5% 時有顯著差。

本發明的各 HA-MTX 結合體之效果以上述方法所檢討之結果如圖 5 與表 4 所示。圖 5 中的左圖顯示 HA-MTX 結合體的典型關節腫脹經時性變化，表 4 中顯示經檢討的被驗物質的結果。

〔表 4〕

表 4 對於膠原酶誘導關節炎 (OA) 模型的關節腫脹的 HA-MTX 結合體之抑制作用

	結合位置 (α/γ)	含有肽鏈的連接體	MTX 之結 合率 (%)	結合體之分子 量 (道爾頓)	AUC (% 對照組) (平均值 \pm SEM)	P 值
實施例 2-1	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	2.1	186 萬	45.7 \pm 3.9	P<0.0001
實施例 2-2	α	-Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH-	1.9	218 萬	48.9 \pm 3.7	P<0.001
實施例 2-8	α	-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	198 萬	54.8 \pm 5.9	P<0.0001
實施例 2-18	α	-Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.4	186 萬	65.9 \pm 3.5	P<0.0001
實施例 2-27	α	-Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	1.7	162 萬	82.6 \pm 5.2	P<0.05

(114)

由上述結果得知，本次所檢討的 HA-MTX 結合體與任一 HA 投予群比較，皆顯示對膠原酶誘導關節炎模型之膝關節腫脹具有顯著的抑制作用。

〔實驗例 7〕

對於膠原酶誘導關節炎 (OA) 模型之關節軟骨破壞抑制效果

如實驗例 6 的標題所示，已知膠原酶誘導關節炎 (OA) 模型可使用於 OA 治療藥之評估上，故可抑制本模型的發炎，且可抑制軟骨變性之化合物可適用於 OA 治療藥上。

動物為使用 SD/Crj 老鼠 (日本查爾斯·里貝，6 週齡，雄)。將 50 μ L 的 1.5% 膠原酶 (SIGMA) 溶液僅投予於右膝關節腔內誘導出關節炎。左膝關節因作為各個體的對照組故未進行任何處理。被驗物質於關節炎誘導的 7 天及 1 天前作 1 週 1 次比率將 50 μ L 投予於右膝關節內。

欲評估膝關節軟骨破壞程度，於關節炎誘導後第 28 天採出右膝關節，將小腿骨內顆部之關節軟骨之變性像以掃描型電子顯微鏡 (SEM) 攝影。攝影後進行 *，由各個體的 SEM 像排出關節軟骨變性之程度順序。數據固定後，開錠盲檢化，算出各群的順序平均。生理食鹽水投予群與被驗物質投予群之間，進行 Wilcoxon 檢定，危險率未達 5% 作為顯著差。統計解析使用 SAS version 8.02 (SAS 因司第佳日本)。

(115)

本發明的 HA-MTX 結合體之效果以上述方法進行檢討的結果如圖 6 所示。

由圖 6 所示結果得知，本發明的 HA-MTX 結合體與生理食鹽水投予群相比，對於膠原酶誘導 OA 模型的軟骨變形顯示顯著的抑制作用。由該結果得知 HA-MTX 結合體不僅對於關節炎模型的關節腫脹，對於關節軟骨的破壞亦可抑制。因此，本發明的 HA-MTX 結合體適用於關節軟骨變性或關節軟骨損害所引起的關節疾病治療上。

〔產業上可利用性〕

本發明的 HA-MTX 結合體不僅具有作為關節注入劑之 HA 作用，且將 MTX 的滑膜炎抑制作用安全地僅表現於投予關節內，提供具有過去未有的效果之優良關節疾病治療藥劑。

【圖式簡單說明】

〔圖 1〕圖 1 表示各被檢物質及對照（分子量為 190 萬的透明質酸及分子量為 80 萬之透明質酸）的黏彈性之測定結果。

〔圖 2〕圖 2 表示各被驗物質投予群及對照群（HA 及 vehicle）中，將 mBSA 溶液投予於膝關節內時所測定出的膝關節腫脹經時性變化。

〔圖 3〕圖 3 表示對於圖 2 的各被驗物質投予群及對照群之圖表的 AUC。

(116)

[圖 4] 圖 4 表示膠原關節炎模型之膝關節幅度的經時性變化。左圖表示對於實施例 3-7 的化合物或對照藥 (HA 或 Vehicle) 僅投予於右膝關節內的群，膠原關節炎的誘導後馬上測定的右膝關節 (投予部位) 幅度之經時性變化。右圖表示投予部位的左膝關節幅度的經時性變化。

[圖 4] 圖 4 表示實施例 1 投予群及對照組 (HA 及 Saline) 中，誘導膠原關節炎後之膝關節幅度之經時性變化。左圖表示投予部位的右膝關節的經時性變化，右圖表示非投予部位的左膝關節之經時性變化。條狀為平均 ± 標準誤差。

[圖 5] 圖 5 表示實施例 1 投予群及對照組 (HA 及 Saline) 中，將膠原酶 OA 模型的關節炎於誘導後至 20 天後的膝關節腫脹之經時性變化。條狀為平均 ± 標準誤差。

[圖 6] 實施例 2-2 投予群及生理食鹽水群之膠原酶 OA 模型之小腿骨內顆部位之軟骨變性程度。條狀為平均 ± 標準誤差。

五、中文發明摘要

發明名稱：透明質酸－胺甲蝶呤結合體

本發明的課題為提供一種作為關節病治療藥有用透明質酸－胺甲蝶呤結合體。

作為解決該課題的方法為，發現作為關節疾病治療藥有用的透明質酸之羥基上，介由含有 1～8 個胺基酸所成的肽鏈之連接體（linker）與胺甲蝶呤結合的透明質酸－胺甲蝶呤結合體。

六、英文發明摘要

發明名稱：

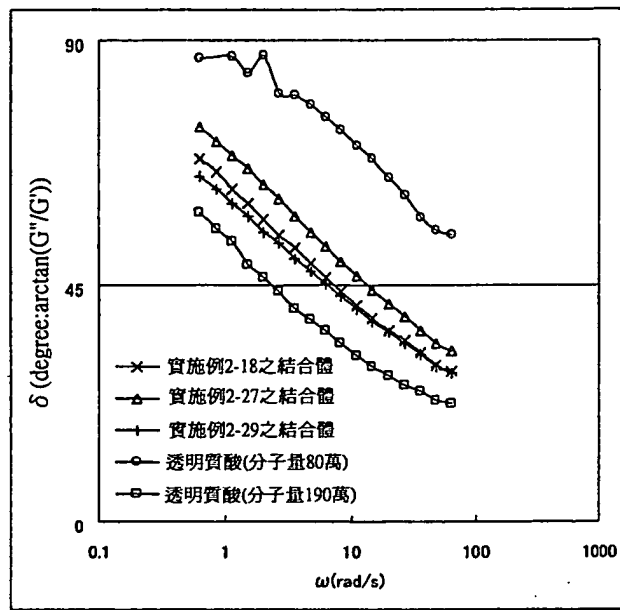
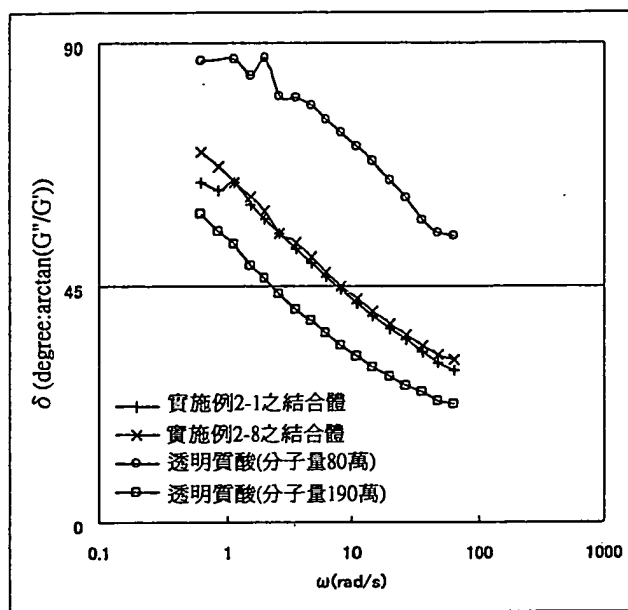


圖1

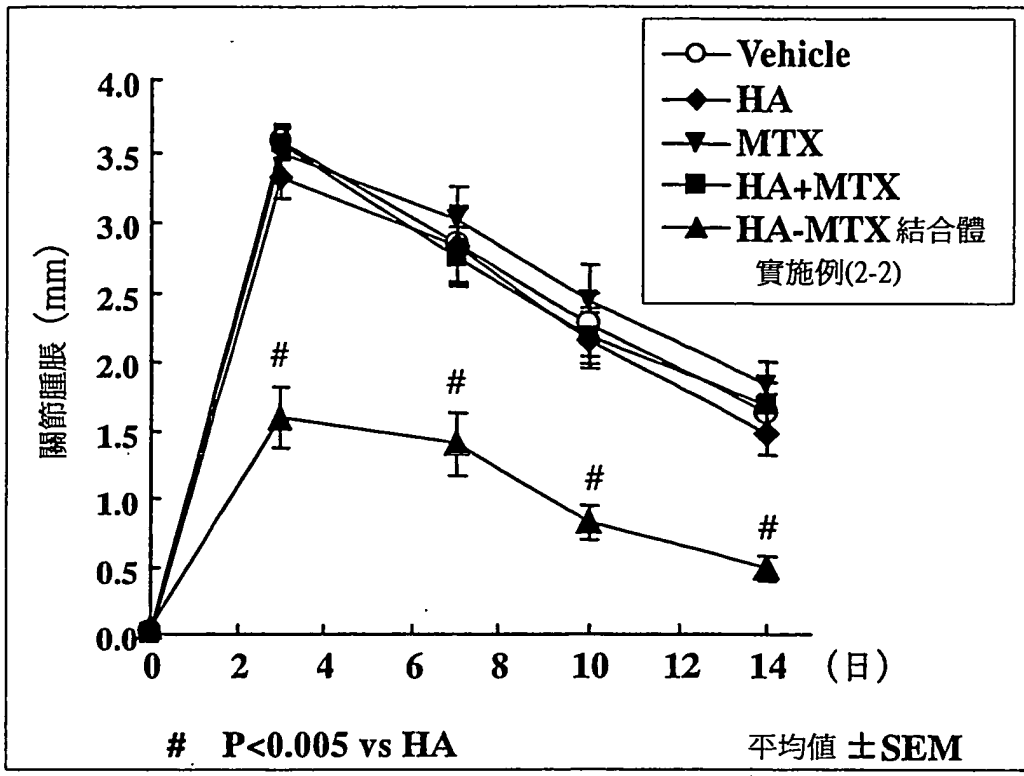
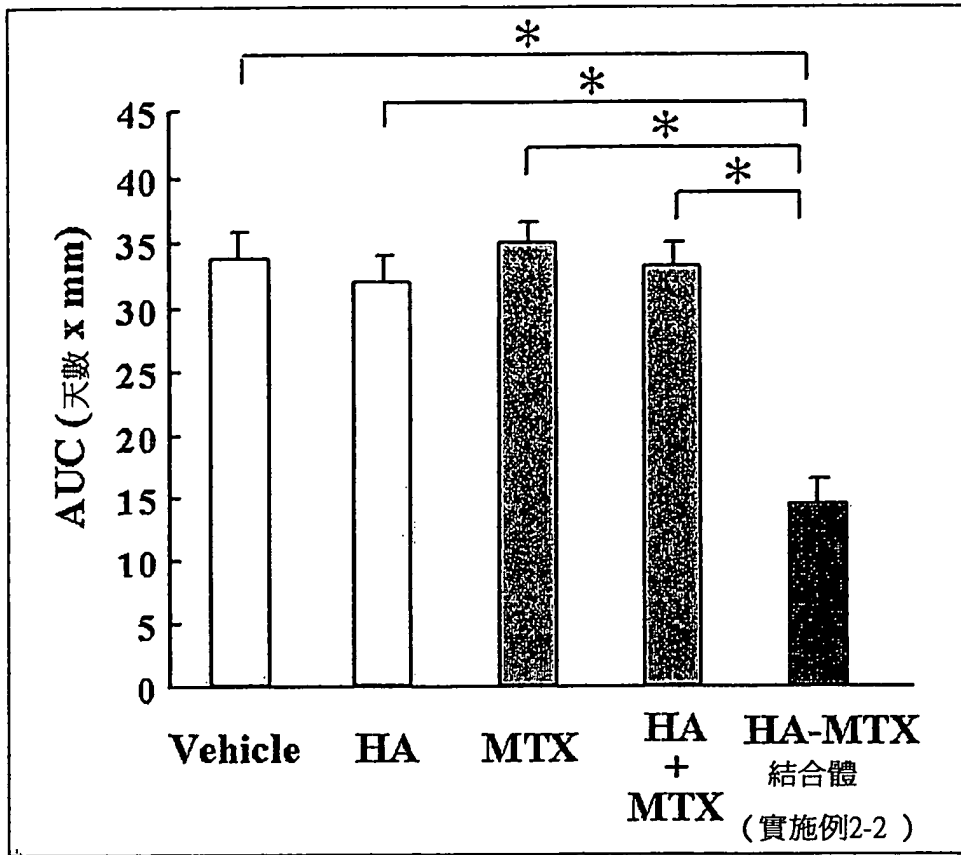


圖2



* P < 0.0001 vs HA-MTX 結合體 平均值 + SEM

圖 3

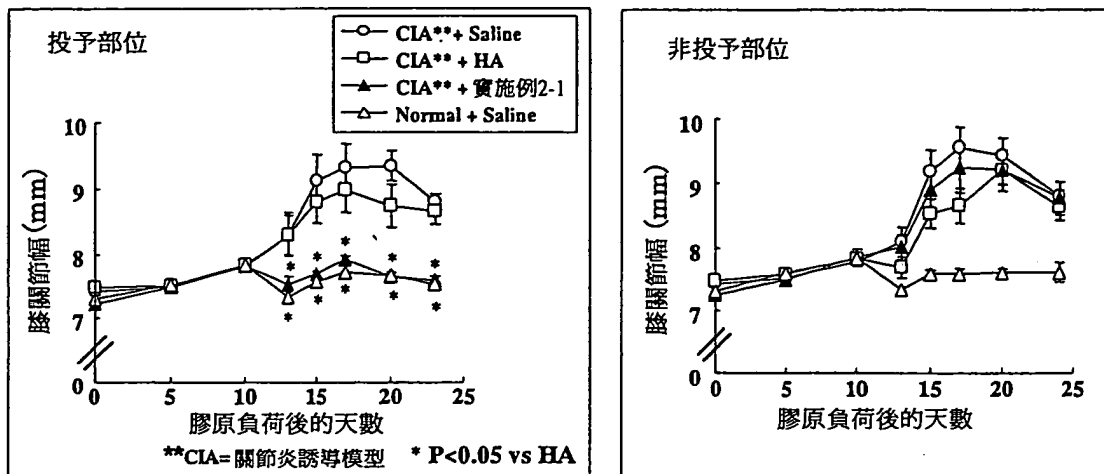


圖4

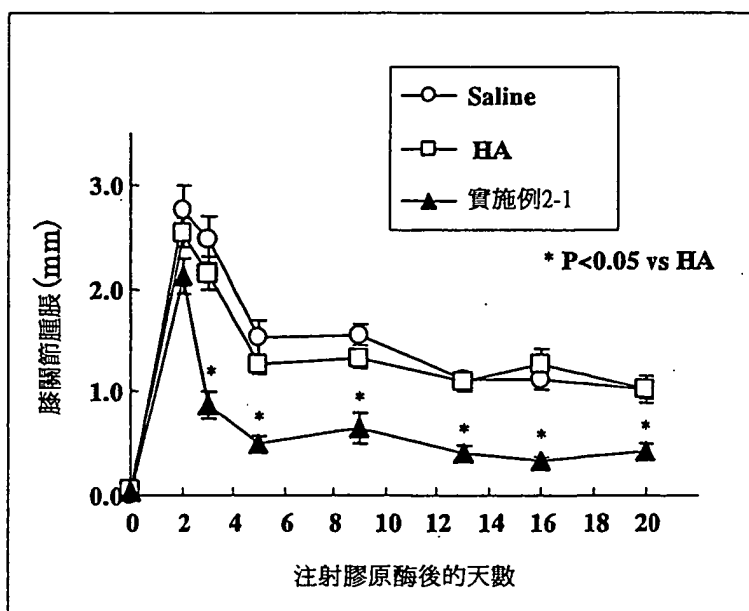


圖5

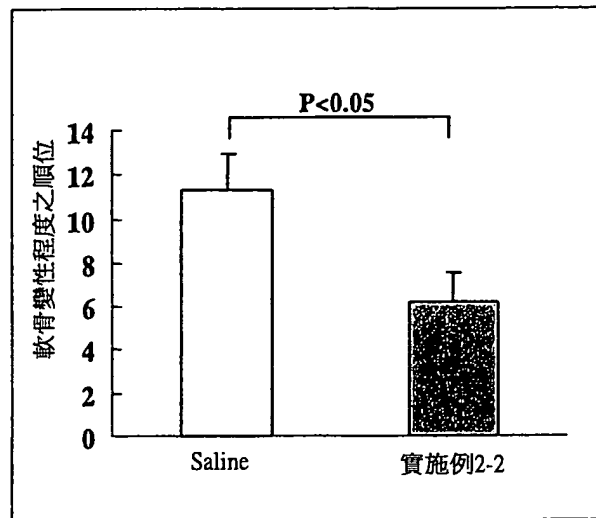


圖6

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第(無)圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

99年12月8日修正替換頁

※申請案號：094106691

※申請日期：94年03月04日

※IPC分類： A61K 31/728 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

一、發明名稱：

(中) 透明質酸-胺甲蝶呤結合體

(英) Hyaluronic acid/methotrexate compound

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 電氣化學工業股份有限公司

(英) DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中) 1. 前田 哲郎

(英) 1. MAEDA, TETSURO

地址：(中) 日本國東京都中央區日本橋室町二丁目一番一號

(英) 1-1, Nihonbashi Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8338

Japan

國籍：(中英) 日本 JAPAN

三、發明人：(共 8 人)

1. 姓名：(中) 池谷仁志

(英) IKEYA, HITOSHI

國籍：(中) 日本

(英) JAPAN

2. 姓名：(中) 守川忠志

(英) MORIKAWA, TADASHI

國籍：(中) 日本

(英) JAPAN

3. 姓名：(中) 高橋浩一

(英) TAKAHASHI, KOICHI

國籍：(中) 日本

(英) JAPAN

4. 姓名：(中) 田村達也

(英) TAMURA, TATSUYA

99年12月8日修正替換頁

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

5. 姓 名：(中) 岡町晃
(英) OKAMACHI, AKIRA

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

6. 姓 名：(中) 石澤武宣
(英) ISHIZAWA, TAKENORI

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

7. 姓 名：(中) 佐藤晴彦
(英) SATO, HARUHIKO

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

8. 姓 名：(中) 樋口義信
(英) HIGUCHI, YOSHINOBU

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本 ; 2004/03/05 ; 2004-062616 有主張優先權
2. 日本 ; 2004/06/04 ; 2004-167755 有主張優先權

99年12月8日修正替換頁

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

5. 姓 名：(中) 岡町晃
(英) OKAMACHI, AKIRA

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

6. 姓 名：(中) 石澤武宣
(英) ISHIZAWA, TAKENORI

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

7. 姓 名：(中) 佐藤晴彦
(英) SATO, HARUHIKO

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

8. 姓 名：(中) 樋口義信
(英) HIGUCHI, YOSHINOBU

國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本 ; 2004/03/05 ; 2004-062616 有主張優先權
2. 日本 ; 2004/06/04 ; 2004-167755 有主張優先權

第094106691號專利申請案中文申請專利範圍修正本

民國 100 年 8 月 10 日修正

十、申請專利範圍

1. 一種透明質酸－胺甲蝶呤結合體，其特徵為於透明質酸、透明質酸衍生物或此等鹽之羧基上，介由含有 1～8 個胺基酸所成的肽鏈之連接體（linker）與胺甲蝶呤所結合者。

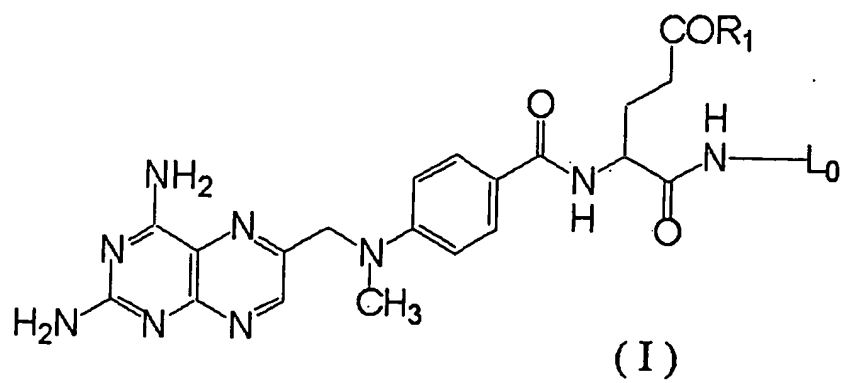
2. 如申請專利範圍第 1 項之透明質酸－胺甲蝶呤結合體，其中連接體為含有 1～8 個胺基酸所成之肽鏈、及 C₂₋₂₀ 伸烷基二胺鏈，該伸烷基二胺鏈為可插入 1～5 個氧原子，及／或可由羧基或 C₁₋₆ 烷氧基羰基取代者。

3. 如申請專利範圍第 1 項之透明質酸－胺甲蝶呤結合體，其中對透明質酸之總羧基的胺甲蝶呤之結合率為 0.5%～4.5%。

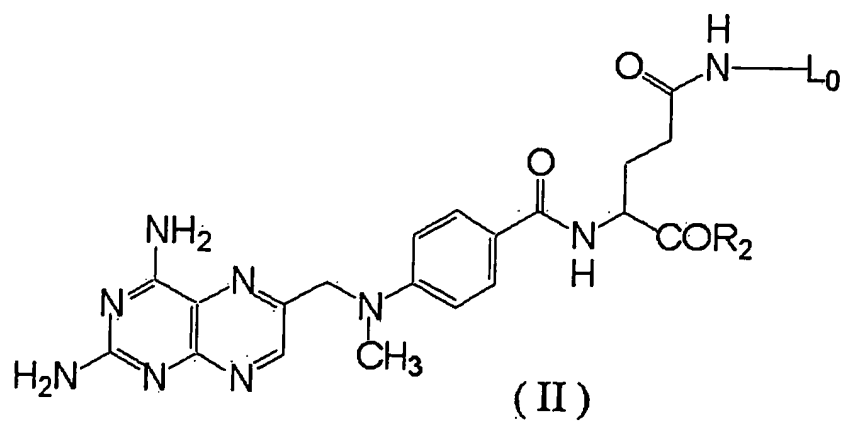
4. 如申請專利範圍第 1 項之透明質酸－胺甲蝶呤結合體，其中透明質酸的分子量為 60 萬道爾頓以上。

5. 如申請專利範圍第 1 項之透明質酸－胺甲蝶呤結合體，其中結合於連接體的胺甲蝶呤為式（I）、（II）、（III）或（IV）表示者；

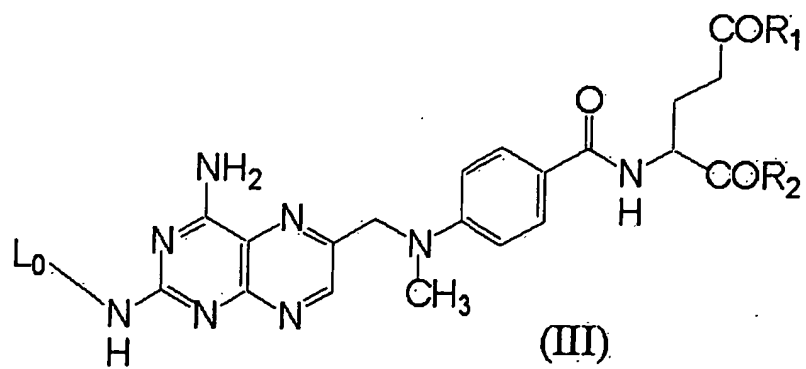
〔化 1〕



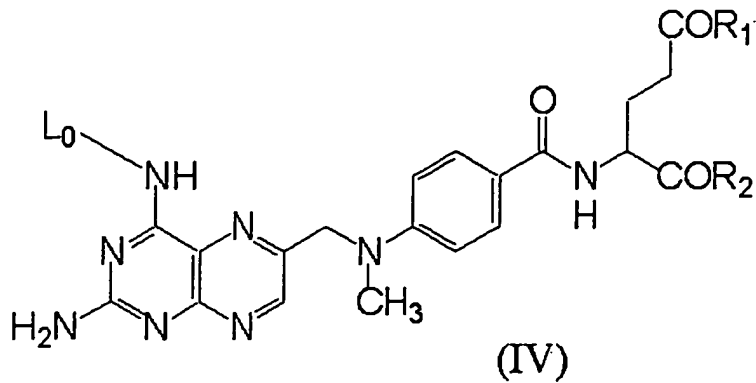
〔化 2〕



〔化 3〕



〔化 4〕

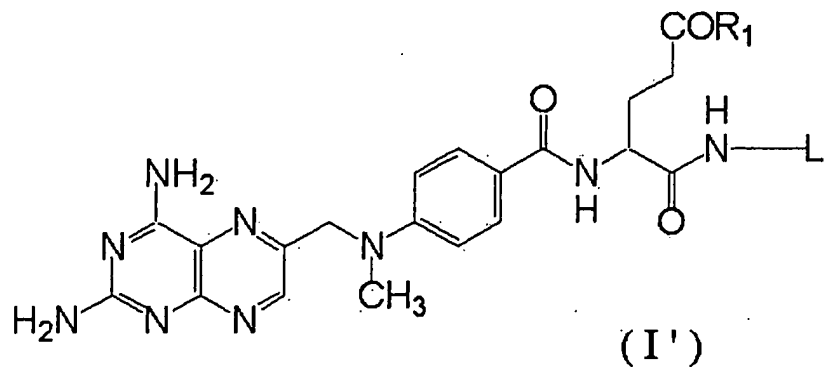


〔式中， R_1 及 R_2 表示各自獨立的羥基、胺基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基胺基、或二- C_{1-6} 烷基胺基；

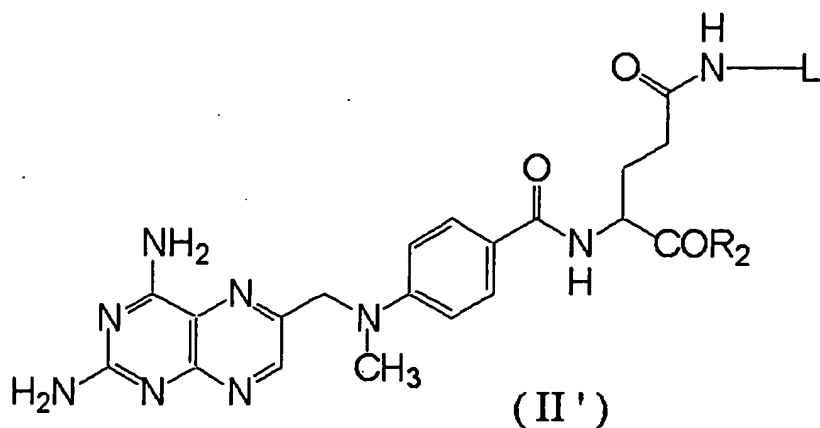
L_0 表示連接體的結合位置〕。

6. 如申請專利範圍第 1 項之透明質酸-胺甲蝶呤結合體，其中含有肽鏈之連接體及於該連接體所結合的胺甲蝶呤為，式 (I') 或 (II') 所示者；

〔化 5〕



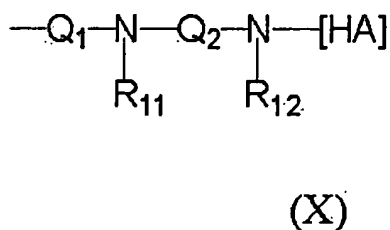
〔化 6〕



〔式中， R_1 及 R_2 表示各自獨立的羥基、胺基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基胺基、或二- C_{1-6} 烷基胺基；

L 表示式 (X)

〔化 7〕



〔式中， Q_1 與所結合的 $\text{---}NH\text{---}$ 一起形成 1~8 個胺基酸所成之肽鏈，含於該肽鏈的胺基酸之各殘基可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、甲醯基、 C_{1-6} 烷基磺醯基、及 C_{6-10} 芳基磺醯基所成群之基取代或保護，含於該肽鏈之各醯胺鍵可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基及/或 C_{1-6} 烷基羰基於氮原子上取代，含於該殘基的各羧基可獨立由 1 或 2 個 C_{1-6} 烷基取代或亦可轉化成醯胺基；

R_{11} 及 R_{12} 表示各自獨立的氫原子或 C_{1-6} 烷基；

Q_2 表示 C_{2-20} 伸烷基，該伸烷基可插入 1~5 個氧原子、

及/或可由羧基或 C₁-6 烷氧基羰基取代；

[HA] 表示與透明質酸結合位置，該連接體與含於該透明質酸之羧基形成醯胺鍵結) 所表示的连接體)。

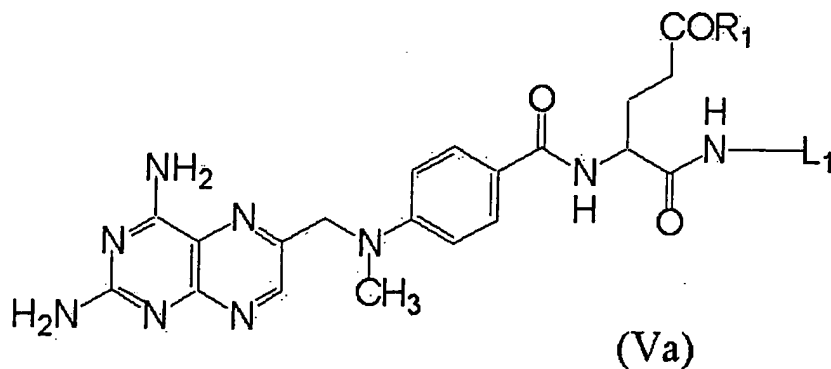
7. 一種醫藥組成物，其特徵為含有如申請專利範圍第 1 項至第 6 項中任一項之透明質酸-胺甲蝶呤結合體作為有效成分者。

8. 一種關節病治療藥，其特徵為含有如申請專利範圍第 1 項至第 6 項中任一項之透明質酸-胺甲蝶呤結合體作為有效成分者。

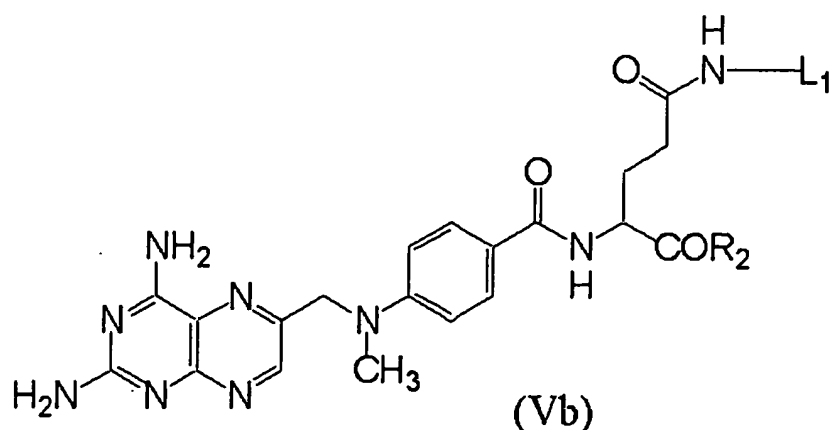
9. 如申請專利範圍第 8 項之關節病治療藥，其為關節局部投予製劑。

10. 一種化合物，其特徵為式 (Va) 或 (Vb) 所示者；

[化 8]



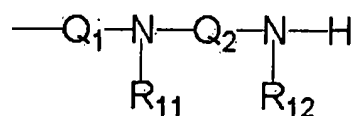
〔化 9〕



〔式中， R_1 及 R_2 表示各自獨立的羥基、胺基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基胺基、或二- C_{1-6} 烷基胺基；

L_1 表示式 (X')

〔化 10〕



(X')

〔式中， Q_1 與所結合的 $\text{---}NH\text{---}$ 一起形成 1~8 個胺基酸所成之肽鏈，含於該肽鏈的胺基酸之各殘基可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、甲醯基、 C_{1-6} 烷基磺醯基、及 C_{6-10} 芳基磺醯基所成群之基取代或保護，含於該肽鏈之各醯胺鍵可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基及 / 或 C_{1-6} 烷基羰基於氮原子上取代，含於該殘基的各羰基可獨立由 1 或 2 個 C_{1-6} 烷基取代或亦可轉換成醯胺基；

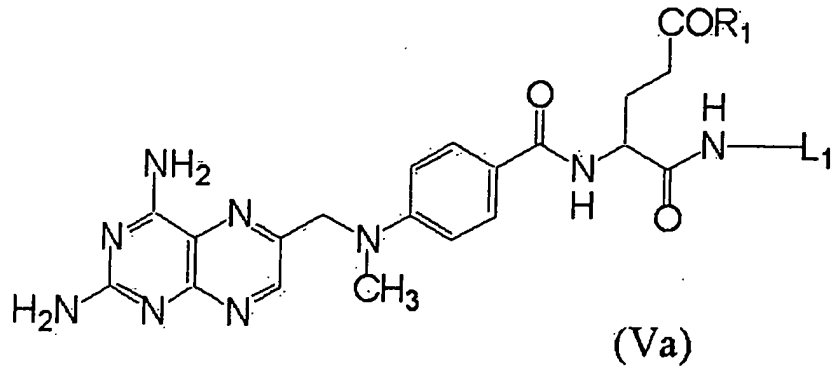
R_{11} 及 R_{12} 表示各自獨立的氫原子或 C_{1-6} 烷基；

Q_2 表示 C_{2-20} 伸烷基，該伸烷基可插入 1~5 個氧原子)

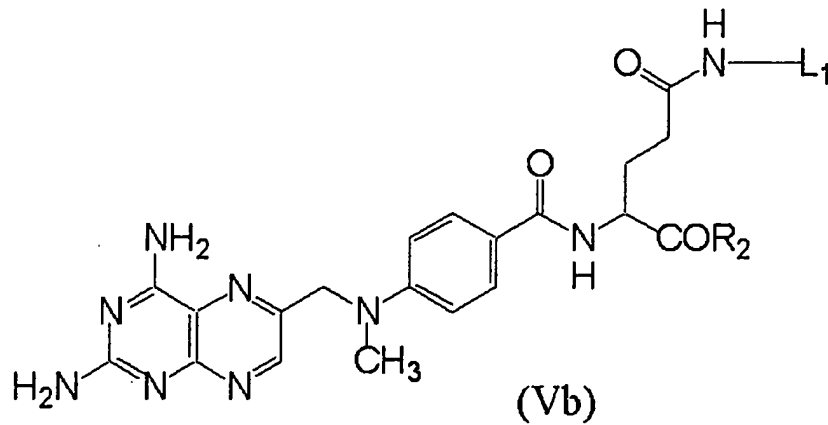
〕。

11. 一種如申請專利範圍第 1 項之透明質酸 - 胺甲蝶呤結合體之製造方法，其特徵為含有式 (Va) 或 (Vb) 所示者；

[化 8]



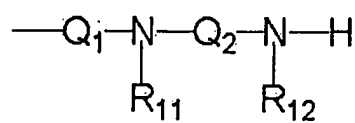
[化 9]



[式中，R₁ 及 R₂ 表示各自獨立的羥基、胺基、C₁-6 烷氧基、C₁-6 烷基胺基、或二 - C₁-6 烷基胺基；

L₁ 表示式 (X')

[化 10]



(X')

(式中， Q_1 與所結合的 $-NH-$ 一起形成 1~8 個胺基酸所成之肽鏈，含於該肽鏈的胺基酸之各殘基可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、甲醯基、 C_{1-6} 烷基磺醯基、及 C_{6-10} 芳基磺醯基所成群之基取代或保護，含於該肽鏈之各醯胺鍵可獨立由 1 個以上選自 C_{1-6} 烷基及 / 或 C_{1-6} 烷基羰基於氮原子上取代，含於該殘基的各羰基可獨立由 1 或 2 個 C_{1-6} 烷基取代或亦可轉換成醯胺基；

R_{11} 及 R_{12} 表示各自獨立的氫原子或 C_{1-6} 烷基；

Q_2 表示 C_{2-20} 伸烷基，該伸烷基可插入 1~5 個氧原子、及 / 或可由羰基或 C_{1-6} 烷氧基羰基取代)] 之化合物與透明質酸反應，將該透明質酸的羰基轉換成 N- 取代醯胺基的步驟。