



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **323626**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19985667	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.06.05 PCT/JP97/01915
(22)	Inng.dag	1998.12.04	(85)	Videreføringsdag	1998.12.04
(24)	Løpedag	1997.06.05	(30)	Prioritet	1996.06.06, JP, 144522/96
(41)	Alm.tilgj	1999.02.04			
(45)	Meddelt	2007.06.18			
(73)	Innehaver	Daiichi Pharmaceutical Co Ltd, 14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, 103-8234 TOKYO, Japan			
(72)	Oppfinner	Masahiro Ikeda, Tokyo, Japan Hiroshi Susaki, Tokyo, Japan Kazuhiro Inoue, Tokyo, Japan			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av et medikamentkompleks			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 640622 A1 NO 19963214 A1 (=EP 757049)			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåte for fremstilling av et medikamentkompleks i hvilket et polysakkaridderivat med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest er sammenbundet ved hjelp av en "spacer" som omfatter en aminosyre eller en "spacer" som omfatter 2 til 8 aminosyrer sammenbundet med peptidbindinger, eller et medikamentkompleks i hvilket et polysakkaridderivat med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest er sammenbundet uten bruk av en "spacer", kjennetegnet ved at et organisk aminsalt av polysakkaridderivatet karboksylgrupper får reagere med medikamentforbindelsen eller "spaceren" bundet til medikament-forbindelsen i et ikke-vandig system. Reaksjonen mellom polysakkarid-derivatet med karboksylgrupper og medikamentforbindelsen bundet til "spaceren" eller lignende kan utføres med høyt utbytte, og dersom en medikamentforbindelse med en laktonring benyttes i reaksjonen kan sidereaksjoner reduseres.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse gjelder en fremgangsmåte for fremstilling av et medikamentkompleks i hvilket et poly-
5 sakkaridderivat og en medikamentforbindelse, f.eks. et anti-neoplastisk middel, er sammenbundet.

Oppfinnelsens bakgrunn

Antineoplastiske midler, som benyttes for behandling
10 av faste cancere, f.eks. lungecancer eller karsinomer i fordøyelsesorganene og blodcancer som leukemi, tilføres systemisk via tilførselsveier som intravenøs eller oral tilførsel, og fordeles så til spesifikke tumorseter og viser sin terapeutiske virkning ved å inhibere eller undertrykke proliferasjon av cancercellene. De systemisk tilførte antineoplastiske
15 midler tas imidlertid hurtig opp av lever og de retikuloendotale organer fra blodet, eller de utskilles hurtig i urinen, og blodkonsentrasjonen kan følgelig noen ganger være så redusert at fordelingen på tumorseter er utilstrekkelig. I tillegg har vanlige antineoplastiske midler i seg selv en
20 dårlig fordelingsselektivitet overfor tumorseter (tumor-selektivitet), og de antineoplastiske midler vil derfor fordeles uniformt over forskjellige vev og celler i hele kroppen og fungere som cytotoksiner også ovenfor normale celler og
25 vev, noe som fører til problemer ved at uheldige bivirkninger oppstår, f.eks. emesis, pyreksi eller alopesi med ekstremt høy hyppighet. Det har derfor vært ønsket å utvikle et middel for effektiv og selektiv fordeling av antineoplastiske midler til tumorseter.

Som ett slik middel ble det foreslått en fremgangsmåte hvor et polysakkaridderivat med karboksylgrupper benyttes som medikamenttilførselsbærer, og et antineoplastisk middel er bundet til polysakkaridderivatet for å forsinke fjerning av det antineoplastiske middel fra blodet og øke selektiviteten
35 ovenfor tumorvev. F.eks. beskriver internasjonalt patentskrift WO94/19376 et medikamentkompleks hvor en peptidkjede (antall aminosyrerester: 1 til 8) er bundet til en karboksylgruppe av et polysakkarid med karboksylgrupper, og hvor doksorubicin, daunorubicin, mitomycin C, bleomycin eller lignende videre er

bundet ved hjelp av peptidkjeden. I tillegg beskriver japansk patentskrift (KOKOKU) nr. (Hei) 7-84481/1995 et medikamentkompleks i hvilket det ovenfor nevnte antineoplastiske middel er innført i et karboksymetylert mannoglukanderivat ved hjelp
 5 av en Schiff-base eller en syreamidbinding. Disse medikamentkomplekser særpreges ved at de har forbedret antitumoraktivitet sammenlignet med antitumormidlet alene, som ikke er bundet til en medikamenttilførselsbærer, og redusert toksisitet og bivirkninger.

10 Når det gjelder teknologier for medikamentkomplekser som benytter polyalkoholiserte polysakkaridderivater som medikamenttilførselsbærere er noen rapporter tilgjengelige, f.eks. "Researches on polysaccharide-peptide-doxorubicin complexes-Correlations between stabilities of polysaccharide
 15 carriers in blood and their anti-neoplastic activities" (Abstracts of 10th Meeting of the Japan Society of Drug-Delivery System, 279, 1994); "Researches on polysaccharide-peptide doxorubicin complexes - Pharmacokinetics and anti-neoplastic activity" (Abstracts of 9th Annual Meeting of Japanese
 20 Society for the study of xenobiotics, 292, 1994); Abstracts of the 19th Seminar of Trends in Research and Development (arrangert av The Organization of Drug A D R Relief, R & D Promotion and Product Review), D-9, 1995; og "Researches on Drug delivery to a tumor tissue by polysaccharide carriers"
 25 (Abstracts of 12th Colloid and Interface Technology Symposium, The Chemical Society of Japan, 51, 1995).

Disse medikamentkomplekser har konvensjonelt blitt fremstilt ved å fremstille natriumsaltet av et polysakkaridderivat med karboksylgrupper, f.eks. karboksymetylpullulan
 30 eller karboksymetylmannoglukan, og deretter binde en karboksylgruppe i polysakkaridderivatet til en aminogruppe i et antitumormiddel (eller en N-terminal aminogruppe i en peptidkjede som er bundet til antitumormidlet) ved hjelp av en syreamidbinding. Natriumsalt av polysakkaridderivater er fullstendig uløselige, i det minste i organiske løsemidler, og når
 35 reaksjonen ovenfor utføres har fremgangsmåten følgelig blitt tilpasset på en måte som omfatter fremstilling av natriumsaltet av et polysakkaridderivat som en løsning i vann eller et organisk løsemiddel blandet med vann, og deretter å løse et

kondensasjonsmiddel og et antitumormiddel (eller et antitumor-
middel med en peptidkjede) i form av hydrokloridet eller
lignende i løsning.

Imidlertid utføres i reaksjonen dehydratiserings-
5 kondensasjon i et løsemiddel som inneholder vann, og det var
følgelig umulig å erholde et ønsket produkt i høyt utbytte.
Antitumormidler som benyttes som reagenser er generelt dyre,
og det har vært ønskelig å utvikle en fremgangsmåte for
effektiv fremstilling av de ovenfor nevnte medikament-
10 komplekser, fra et fremstillingsøkonomisk synspunkt. I tillegg
har forbindelsene som beskrives i japansk patentsøknad (KOKAI)
nr. (Hei) 6-87746/1994, og som er anvendbare som antitumor-
midler, en laktonring molekylet, og det er problemer ved at
når disse forbindelser, bundet til en peptidkjede, utsettes
15 for reaksjonen ovenfor åpnes laktonringen i nærvær av en base
og vann, og den resulterende karboksylgruppe kan reagere med
den N-terminale aminogruppe i peptidkjeden som er bundet til
antitumormidlet slik at utbyttet av det ønskede produkt
reduseres i vesentlig grad og at reaksjonen ikke gir det
20 ønskede, enhetlige medikamentkompleks. Det har derfor vært
ønskelig å utvikle en reaksjonsfremgangsmåte som kan unngå
dannelse av forbindelser med åpent laktonring.

Beskrivelse av oppfinnelsen

25 Et formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveie-
bringe en fremgangsmåte for effektiv fremstilling av medika-
mentkomplekser som seteselektivt kan tilføre en aktiv bestand-
del, f.eks. et antitumormiddel eller et antiinflammasjons-
middel, til tumorseter eller lignende. Nærmere bestemt er for-
30 målet med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en frem-
gangsmåte som kan tilveiebringe medikamentkompleksene i stor
skala og med lave omkostninger ved effektiv reaksjon mellom et
polysakkaridderivat med karboksylgrupper og en medikamentfor-
bindelse, f.eks. et antitumormiddel, eller med en "spacer" som
35 omfatter et oligopeptid eller lignende som er bundet til en
medikamentforbindelse.

For å oppnå formålet nevnt ovenfor utførte opp-
finnerne omfattende undersøkelser, og som et resultat fant de
at dersom et polysakkaridderivat med karboksylgrupper får

reagere med en medikamentforbindelse eller en "spacer" bundet til en medikamentforbindelse med benyttelse av et organisk aminsalt av polysakkaridsaltet i stedet for natriumsaltet som benyttes konvensjonelt, kan saltet av polysakkaridderivatet
 5 løses i høy konsentrasjon i et organisk løsemiddel som i det vesentlige er vannfritt, slik at reaksjonen mellom polysakkaridderivatet og medikamentforbindelsen eller "spaceren" bundet til medikamentforbindelsen kan utføres med ekstremt høyt utbytte, og at de produkter eller lignende kan reduseres.
 10 Foreliggende oppfinnelse ble oppnådd basert på disse funn.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således en fremgangsmåte for fremstilling av et medikamentkompleks hvor et polysakkaridderivat med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest er sammenbundet ved hjelp av en "spacer" som
 15 omfatter en aminosyre eller en "spacer" som består av 2 til 8 aminosyrer sammenbundet med peptidbindinger, eller et medikamentkompleks hvor et polysakkaridderivat med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest er sammenbundet uten "spaceren", og som særpreges ved at et organisk aminsalt av
 20 polysakkaridderivatet med karboksylgrupper får reagere med medikamentforbindelsen eller medikamentforbindelsen bundet til "spaceren" i et ikke-vandig system, og en fremgangsmåte for fremstilling av det ovenfor nevnte medikamentkompleks som omfatter følgende trinn: (1) Overføring av et alkalimetallsalt
 25 av polysakkaridderivat med karboksylgrupper til et organisk aminsalt av dette, og (2) å la det organiske aminsalt reagere med medikamentforbindelsen eller medikamentforbindelsen bundet til "spaceren" i et ikke-vandig system.

Ifølge foretrukne utførelser foreliggende oppfinnelse
 30 tilveiebringes fremgangsmåten ovenfor hvori polysakkaridderivatet med karboksylgrupper er en karboksy-(C₁₋₄)-alkyldekstran-polyalkohol, fremgangsmåten ovenfor hvori dekstran-polyalkoholen som utgjør karboksy-(C₁₋₄)-alkyldekstran-polyalkoholen er en dekstranpolyalkohol erholdt ved å behandle et
 35 dekstran under betingelser som tillater i det vesentlige fullstendig polyalkoholisering, fremgangsmåten ovenfor hvori karboksy-(C₁₋₄)-alkyldekstran-polyalkoholen er en karboksymetyldekstran-polyalkohol, fremgangsmåten ovenfor hvori karboksy-(C₁₋₄)-alkyldekstran-polyalkoholen er en karboksy-

metyldekstran-polyalkohol med molekylvekt i området fra 5 000 til 500 000, fortrinnsvis i området fra 50 000 til 450 000, og mer foretrukket i området fra 200 000 til 400 000, og hvor karboksymetyleringsgraden pr. inngående sukkerrest ligger i
5 området fra 0,01 til 2,0, fortrinnsvis i området fra 0,1 til 1,0, og mer foretrukket i området fra 0,3 til 0,5, og fremgangsmåten ovenfor hvori medikamentforbindelsen er et antineoplastisk middel eller et antiinflammasjonsmiddel.

Ifølge videre foretrukne utførelser av foreliggende
10 oppfinnelse tilveiebringes fremgangsmåten ovenfor hvor medikamentforbindelsen er en forbindelse som kan danne en laktonring, fremgangsmåten ovenfor hvori en medikamentforbindelse i hvilken en laktonring dannes, eller en "spacer" bundet til en medikamentforbindelse i hvilken en laktonring dannes, benyttes
15 for reaksjonen mellom det organiske aminosalt og medikamentforbindelsen eller "spaceren" bundet til medikamentforbindelsen, og fremgangsmåte ovenfor hvori medikamentforbindelsen som kan danne en laktonring er (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-fluor-2,3-dihydro-9-hydroksy-4-metyl-1H,12H-benzo[de]pyrano-
20 [3',4':6,7]indolozino[1,2-b]kinolin-10,13(9H,15H)-dion.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 8, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge fore-
25 liggende oppfinnelse.

Figur 2 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 8, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 3 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset
30 ifølge eksempel 9, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 4 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 9, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

35 Figur 5 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 10, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 6 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 15, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge fore-

liggende oppfinnelse.

Figur 7 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 15, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

5 Figur 8 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 28, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 9 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 28, fremstilt ved
10 fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 10 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 29, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 11 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum
15 for medikamentkomplekset ifølge eksempel 29, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 12 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 34, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

20 Figur 13 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 34, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 14 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 39, fremstilt ved fremgangsmåten
25 ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 15 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 39, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 16 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 41, fremstilt ved fremgangsmåten
30 ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 17 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 41, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

35 Figur 18 viser GPC-diagrammet for medikamentkomplekset ifølge eksempel 44, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 19 viser det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for medikamentkomplekset ifølge eksempel 44, fremstilt ved

fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 20 viser farmakokinetikken for medikamentkomplekset ifølge eksempel 15, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse. Hvert punkt i figuren
5 representerer en gjennomsnittsverdi fra tre eksperimenter.

Den beste måte for utførelse av oppfinnelsen

Medikamentkomplekset fremstilt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse særpreges ved at et poly-
10 sakkaridderivat med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest er sammenbundet ved hjelp av en "spacer" som omfatter en aminosyre eller en "spacer" som omfatter 2 til 8 aminosyrer sammenbundet med peptidbindinger, eller et polysakkaridderivat med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest sammenbundet uten "spaceren".
15

Medikamentforbindelsesresten som inngår i medikamentkomplekset er avledet fra en medikamentforbindelse som anvendes for terapeutisk og/eller forebyggende behandling av sykdommer hos pattedyr, heriblant mennesker, som legemiddel,
20 f.eks. et antineoplastisk middel, et antiinflammasjonsmiddel, et antibakterielt middel eller lignende, og resten omfatter en delstruktur av medikamentforbindelsen. Medikamentforbindelsen fra hvilken resten er avledet er imidlertid ikke begrenset til dem nevnt ovenfor. I tillegg kan enhver forbindelse benyttes
25 som medikamentforbindelse så lenge den har én eller to reaktive funksjonelle grupper som kan delta i dannelsen av en binding med et polysakkaridderivat eller en "spacer" (f.eks. en aminogruppe, en karboksylgruppe, en hydroksylgruppe, en tiolgruppe, en estergruppe eller lignende). Begrepet "medikamentforbindelse" i den foreliggende beskrivelse omfatter også en
30 "prodrug"-forbindelse som inneholder, som en del av seg selv, hovedstrukturen av en medikamentforbindelse med farmakologisk aktivitet *per se*, og som kan gjendanne forbindelsen *in vivo*.

Nærmere bestemt betyr begrepet "medikamentforbindelsesrest" i foreliggende beskrivelse en delstruktur avledet
35 fra medikamentforbindelsen som foreligger forbindelsen etter bindingsdannelse, hvor det antas at en binding mellom polysakkaridderivatet eller "spaceren" og medikamentforbindelses-

resten er dannet ved en reaksjon mellom en reaktiv funksjonell gruppe i medikamentforbindelsen og en reaktiv funksjonell gruppe i polysakkaridderivatet eller "spaceren" (f.eks. dehydratiseringskondensasjon osv.). Dersom f.eks. medikamentforbindelsen representeres med D-NH₂, D-COOH, C-COOR, D-OH, D-SH, D-CONH₂ eller D-NH-COOR (R er en lavere alkylgruppe eller lignende), representeres medikamentforbindelsesresten med D-NH-(D-NH-CO-Q osv.), D-CO-(D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q osv.), D-CO-(D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q osv.), D-O-(D-O-CO-Q, D-O-Q osv.), D-S-(D-S-CO-Q, D-S-Q osv.), D-CONH-(D-CO-NH-CO-Q osv.) hhv. D-NH-CO-(D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Q osv.), (det i parentes står for en binding mellom "spaceren" eller polysakkaridderivatet og medikamentforbindelsesresten, hvori Q står for en gjenværende delstruktur av "spaceren" hhv. polysakkaridderivatet, minus en reaktiv funksjonell gruppe hhv. en karboksylgruppe). Typen binding mellom "spaceren" eller polysakkaridderivatet og medikamentforbindelsesresten er imidlertid ikke begrenset til den nevnt ovenfor. Medikamentforbindelsesresten kan være bundet til den karboksylgruppe i polysakkaridderivatet, den N-terminale aminogruppe eller den C-terminale karboksylgruppe i "spaceren", eller til en reaktiv funksjonell gruppe som foreligger i en aminosyre som inngår i "spaceren".

Som resten av medikamentforbindelsesrest kan f.eks. fortrinnsvis rester av antineoplastiske midler som doksorubicin, daunorubicin, mitomycin C, bleomycin, sykloctidin, vinkristin, vinblastin, metotreksat, antineoplastiske platina-midler (cisplatin eller derivater av dette), taksol eller derivater av dette, kamptotecin eller derivater av dette (antineoplastiske midler beskrevet i japansk patentsøknad (KOKAI) nr. (Hei) 6-87746/1994, fortrinnsvis (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-fluor-2,3-dihydro-9-hydroksy-4-metyl-1H,12H-benzo-[de]pyrano[3',4':6,7]indolizin[1,2-b]kinolin-10,13-(9H,15H)-dion, beskrevet i krav 2, eller lignende), benyttes. I tillegg foretrekkes også rester av steroide antiinflammatoriske midler som hydrokortisonsuccinat og prednizolonsuccinat og ikke-steroide antiinflammatoriske midler som mefenaminsyre, flufenaminsyre, diklofenak, ibuprofen og tinoridin.

Medikamentforbindelsesresten kan være direkte bundet til polysakkaridet, eller den kan være bundet ved hjelp av en "spacer". Som "spacer" kan de benyttes som omfatter én aminosyre eller 2 til 8 aminosyrer sammenbundet med peptidbindinger. Nærmere bestemt har, dersom medikamentforbindelsesresten og polysakkaridderivatet er bundet sammen ved hjelp av en "spacer", "spaceren" form av en aminosyrerest, hvilket vil si en rest erholdt ved å fjerne et hydrogenatom og en hydroksylgruppe fra en aminogruppe hhv. en karboksylgruppe i aminosyren, eller en rest av et oligopeptid som omfatter 2 til 8 aminosyrer sammenbundet med peptidbindinger, hvilket vil si en rest erholdt ved å fjerne et hydrogenatom og en hydroksylgruppe fra den N-terminale aminogruppe hhv. den C-terminale karboksylgruppe i oligopeptidet.

Foretrukne "spacere" er oligopeptidrester som omfatter 2 til 6 aminosyrer. Typen aminosyre som inngår i "spaceren" er ikke spesielt begrenset, og f.eks. kan L- eller D-aminosyrer benyttes, fortrinnsvis L-aminosyrer, og β -alanin, ϵ -aminokapronsyre, γ -aminosmørsyre og lignende kan også benyttes, likeså α -aminosyrer. Aminosyrer som ikke er α -aminosyrer er fortrinnsvis plassert nær polysakkaridderivatet i "spaceren".

Dersom f.eks. en oligopeptid-"spacer" er benyttet er bindingsretningen ikke spesielt begrenset, og generelt kan N-enden i "spaceren" generelt være bundet til en karboksylgruppe i karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkoholen ved hjelp av en syreamidbinding, og C-enden i "spaceren" kan være bundet til en aminogruppe i medikamentforbindelsen. Alternativt kan f.eks. dersom en lysinrest inngår som en oppbyggende enhet i peptid-"spaceren", α -aminogruppen og ϵ -aminogruppen i lysinresten danne syreamidbindinger med karboksylgrupper i andre aminosyrer slik at det dannes N-ender i begge ender av peptid-"spaceren", noe som tillater dannelsen av bindinger med karboksylgrupper i medikamentforbindelsene. Videre kan, ved å innføre én eller flere diaminforbindelsesrester eller dikarboksylsyreforbindelser (rester av diaminforbindelser som etylendiamin eller dikarboksylsyreforbindelser som ravsyre) i en "spacer" som oppbyggende enheter, en spacer med enten N-ender eller C-ender i begge ender benyttes.

Dersom en "spaceren" som omfatter et oligopeptid benyttes er aminosyresekvensen ikke spesielt begrenset.

"Spacere" som foretrekkes benytter omfatter f.eks. en "spacer" som er en dipeptidrest representert med -X-Z-, hvori X står
 5 for en rest av en hydrofob aminosyre og Z står for en rest av en hydrofil aminosyre, og hvor X-Z- står for en rest som består av et dipeptid som er dannet ved en peptidbinding mellom en hydrofob aminosyre (X) og en hydrofil aminosyre (Z) på N-terminale hhv. den C-terminale side, og hvor ett hydrogenatom
 10 og én hydroksylgruppe er fjernet fra aminogruppen i N-enden hhv. karboksylgruppen i C-enden, og en "spacer" som inneholder en rest av dipeptidet som delpeptidsekvens. Som den hydrofob aminosyre kan f.eks. fenylalanin, tyrosin, leucin eller lignende benyttes, og som hydrofil aminosyre kan f.eks.
 15 glysin, alanin eller lignende benyttes. "Spaceren" kan ha en gjentatt sekvens av dipeptidresten (f.eks. X-Z-X-Z-, -X-Z-X-Z-X-Z-, osv.).

Ved å benytte "spaceren" som inneholder en slik dipeptidstruktur kan "spaceren" hydrolyseres i tumorseter eller
 20 inflammasjonsseter, som anses rike på peptidase, slik at medikamentforbindelsen frigjøres i høy konsentrasjon i setene, og følgelig er strukturen som dannes mellom "spaceren" som inneholder dipeptidet ovenfor og medikamentforbindelsen ved sammenbinding en foretrukket delstruktur for medikament-
 25 komplekset fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse. Dersom en rest av et antineoplastisk middel som viser konsentrasjonsavhengig antineoplastisk aktivitet (antineoplastiske midler som viser kraftigere antineoplastisk aktivitet ved høyere konsentrasjon, konsentrasjonsavhengige
 30 antineoplastiske midler som f.eks. doksorubicin osv.) benyttes som medikamentforbindelsesrest kan en "spacer" som består av dipeptidresten representert med -X-Z- nevnt ovenfor eller en "spacer" som inneholder dipeptidresten nevnt ovenfor som delpeptidsekvens mest foretrukket benyttes.

35 I tillegg kan, dersom et antineoplastisk middel av tidsavhengig type som krever opprettholdelse over en viss konsentrasjon i et gitt tidsrom benyttes som medikamentforbindelsesrest, forhøyet antineoplastisk aktivitet noen ganger oppnås ved å benytte "spaceren" ovenfor. Eksempler omfatter de

antineoplastiske midler som beskrives i japansk patentsøknad (KOKAI) nr. (Hei) 6-87746/1994, fortrinnsvis det antineoplastiske middel som beskrives i krav 2. Generelt bør "spaceren" ikke begrenses til dem nevnt ovenfor, og det er nødvendig å velge en egnet "spacer" ut fra det antineoplastiske middels virkningsmekanisme, egenskaper vedrørende farmakokinetikk eller forekomst av toksisitet, frigjørbarhet *in vivo* av det antineoplastiske middel og lignende. For karsinomer som viser hurtig proliferering foretrekkes det generelt å velge "spaceren" ovenfor som kan frigjøre medikamentforbindelsen i høy konsentrasjon i løpet av kort tid.

Spesifikke eksempler på "spaceren" er vist i den påfølgende tabell, "spaceren" som benyttes i fremgangsmåten for fremstilling av medikamentkompleksene ifølge foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke begrenset til dem nevnt nedenfor, og det kan lett forstås at en gjennomsnittsfagperson kan utvelge en egnet "spacer" slik at det oppnås en optimal frigivelseshastighet for en medikamentforbindelse. I tabellen er den venstre ende av peptidsekvensene N-ender, og medikamentforbindelsesrestene er bundet til C-enden. D-Phe står for en D-fenylalaninrest, og de andre aminosyrene representerer L-aminosyrer. Frigivelseshastigheten ble vurdert ut fra effektivitetsgraden av medikamentkompleksene bundet med doksorubicin mot Walker 256 tumorbærende rotter, eller ut fra konsentrasjonen av fritt doksorubicin i tumorseter hos Walker 256 tumorbærende rotter. Blant disse "spacere" foretrekkes en "spacer" som kan frigi medikamentforbindelsen i høy konsentrasjon i løpet av kort tid, f.eks. (N-ende)-Gly-Gly-Phe-Gly-, benyttet for doksorubicin.

30

35

Tabell 1

	(a) "Spacere" med høy frigivelseshastighet
	-Leu-Gly-
5	-Tyr-Gly-
	-Phe-Gly-
	-Gly-Phe-Gly-
	-Gly-Gly-Phe-Gly-
	-Gly-Phe-Gly-Gly-
10	-Phe-Gly-Gly-Gly-
	-Phe-Phe-Gly-Gly-
	-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-
	(b) "Spacere" med relativt høy frigivelseshastighet
	-Gly-Gly-Phe-Phe-
15	-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-
	(c) "Spacere" med relativt lav frigivelseshastighet
	-Phe-Phe-
	-Ala-Phe-
	-Pro-Gly-
20	-Gly-Gly-Gly-Phe-
	(d) "Spacere" med lav frigivelseshastighet
	-Gly-
	-D-Phe-Gly-
	-Gly-Phe-
25	-Ser-Gly-
	-Gly-Gly-
	-Gly-Gly-Gly-
	-Gly-Gly-Gly-Gly-

30

Som polysakkaridderivat med karboksylgrupper som utgjør polysakkaridderivatresten i medikamentkomplekset kan f.eks. ethvert polysakkarid og kjemisk eller biologisk modifiserte derivater av dette benyttes, så sant det har karboksyl-

35 grupper i molekylet. F.eks. kan polysakkarider som hyaluronsyre, pektinsyre, algininsyre, kondroitin og heparin, og polysakkarider som pullulan, dekstran, mannan, kitin, inulin, levan, xylan, araban, mannoglukan og kitosan i hvilke alle eller noen av hydroksylgruppene er tilført funksjonelle

grupper med en karboksylgruppe, benyttes. F.eks. kan de med karboksy(C_{1-4})alkylerte hydroksylgrupper eller de med hydroksylgrupper som er esterifisert med én eller flere karboksylgrupper fra en polybasisk syre fortrinnsvis benyttes.

- 5 I tillegg kan de beholdt ved polyalkoholisering av polysakkaridene ovenfor og påfølgende innføring av funksjonelle grupper med en karboksylgruppe også benyttes.

Blant disse polysakkaridderivater foretrekkes en karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkohol. Selv om polyalkoholiseringsgraden av karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkoholen ikke er spesielt begrenset foretrekkes det at dekstranpolyalkoholen som utgjør karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkoholen er en dekstranpolyalkohol beholdt ved å behandle et dekstran under betingelser som tillater i det vesentlige fullstendig poly-
15 alkoholisering.

Typen dekstran som benyttes for fremstilling av karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkoholen er ikke spesielt begrenset, og dekstranet kan inneholde α -D-1,6-bindinger med enhver ønsket hyppighet. F.eks. kan dekstraner som inneholder
20 α -D-1,6-bindinger med en hyppighet på 85 % eller mer, 90 % eller mer, og 95 % eller mer benyttes. Molekylvekten av dekstranet er ikke spesielt begrenset, og f.eks. kan dekstraner med en molekylvekt fra tilnærmet 10 000 til tilnærmet 2 000 000, fortrinnsvis fra tilnærmet 50 000 til tilnærmet 800 000, benyttes. Som C_{1-4} -alkylgruppen som utgjør karboksy(C_{1-4})alkylgruppen i karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkoholen kan en uforgrenet eller forgrenet C_{1-4} -alkylgruppe, nærmere bestemt en metylgruppe, en etylgruppe, en N-propylgruppe, en isopropylgruppe, en N-butylgruppe, en sec-butylgruppe eller lignende benyttes, og en metylgruppe kan fortrinnsvis benyttes.
30

Fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse særpreges ved at, for fremstilling av det ovenfor nevnte medikamentkompleks, et organisk aminsalt av polysakkaridderivatet
35 med karboksylgrupper får reagere med medikamentforbindelsen alene, eller et organisk aminsalt av polysakkaridderivatet med karboksylgrupper får reagere med en "spacer" bundet til medikamentforbindelsen i et organisk løsemiddel som er i det vesentlige vannfritt, dvs. et ikke-vandig system. Som en fore-

trukket utførelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen vil en fremgangsmåte som benytter en karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkohol som polysakkaridderivat spesifikt forklares nedenfor. Området til foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke begrenset til denne utførelse.

Dersom et dekstran benyttes som utgangsmateriale kan dekstranet behandles, først med et stort overskudd av natriumperjodat og natriumborhydrid for erholdelse av en dekstranpolyalkohol som i det vesentlige er fullstendig polyalkoholisert. Imidlertid er fremgangsmåten for polyalkoholisering av dekstranet ikke begrenset til fremgangsmåten nevnt ovenfor, og enhver fremgangsmåte tilgjengelig innen faget kan tilpasses. Karboksy(C_{1-4})alkyleringen kan f.eks. utføres ved å la en halogenert(C_{1-4})alkylkarboksylsyre som kloreddiksyre, bromeddiksyre, α -klorpropionsyre, α -metyl- α -klorpropionsyre, β -klorpropionsyre, α -metyl- β -klorpropionsyre, α -klorsmørsyre, β -klorsmørsyre eller γ -klorsmørsyre, fortrinnsvis kloreddiksyre, reagere med hydroksylgrupper i dekstranpolyalkoholen for å oppnå delvis eller fullstendig karboksy(C_{1-4})alkylering av hydroksylgruppene.

Dekstranpolyalkoholen løses f.eks. i et ikke-reaktivt løsemiddel som ikke deltar i reaksjonene (f.eks. vann, N,N-dimetylformamid eller dimetylsulfoksid), og løsningen tilsettes en halogenert(C_{1-4})alkylkarboksylsyre eller et salt av denne i nærvær av en base (f.eks. natriumhydroksid eller kaliumhydroksid), hvorefter blandingen får reagere i fra flere minutter til flere dager ved en temperatur fra under iskjøling til tilnærmet 100 °C. Graden av karboksy(C_{1-4})alkylgruppeinnføring kan lett kontrolleres, f.eks. ved egnet valg av reaksjonstemperatur for karboksy(C_{1-4})alkyleringen eller mengden halogenert(C_{1-4})alkylkarboksylsyre eller baser som benyttes som reagenser, og disse midler er velkjente blant fagfolk. Graden av karboksy(C_{1-4})alkylering for hydroksylgruppene i dekstranpolyalkoholen er ikke spesielt begrenset, og graden kan f.eks. ligge i området fra 0,01 til 2,0, fortrinnsvis fra 0,1 til 1,0, og mer foretrukket fra 0,3 til 0,5 pr. inngående sukkerrest. Molekylvekten av karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkoholen er fra tilnærmet 5 000 til 500 000, fortrinnsvis fra tilnærmet 50 000 til 450 000, og mer foretrukket fra tilnærmet

200 000 til 400 000, bestemt ved gelfiltreringsmetoden.

Karboksy(C_{1-4})alkyldekstran-polyalkohol fremstilt som beskrevet ovenfor foreligger som en vandig løsning av et alkalimetallsalt, f.eks. et natriumsalt eller et kaliumsalt.

5 Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse særpreges ved at et organisk aminsalt av polysakkaridderivatet benyttes i stedet for det ovenfor beskrevne polysakkaridderivat i form av et alkalimetallsalt for dannelsen av bindingen mellom medika-
mentforbindelse eller "spaceren" bundet til medikamentforbind-
10 elsen og karboksylgruppene i polysakkaridderivatet. Det organiske aminsalt av polysakkaridderivatene kan løses i høy konsentrasjon i et organisk løsemiddel som i det vesentlige er vannfritt og tillater reaksjonen å utføres i et ikke-vandig system, og reaksjonen effektivitet kan følgelig forhøyes i
15 bemerkelsesverdig grad.

Som det organiske aminsalt kan f.eks. salter av alifatiske aminer som trietylamin, trimetylamin eller tri-
etanolamin, salter av alisykliske og aromatiske aminer som N-
metylpiperidin, N-metylmorfolin eller di-
20 metylaminopyridin, eller kvaternære ammoniumsalter som tetra-
metylammoniumklorid eller tetraethylammoniumklorid, benyttes. Overføringen fra natriumsaltet av polysakkaridderivatet til det organiske aminsalt kan utføres ved å benytte et ione-
bytterresin eller lignende. F.eks. kan natriumsaltet av
25 karboksymetyldekstran-polyalkohol løses i vann, påsettes en kolonne med Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 mesh, H⁺-type)-resin og elueres med vann, hvorefter eluatet kan tilsettes et organisk amin, f.eks. trietylamin, og frysetørkes. Alternativt er det også mulig å utføre overføringen i ett trinn, dvs. ved å løse
30 natriumsaltet av en karboksymetyldekstran-polyalkohol i vann og la løsningen passere gjennom et resin på trietylammonium-
form.

Bindingen mellom medikamentforbindelsen alene og karboksylgruppen i karboksymetyldekstran-polyalkoholen, eller
35 bindingen mellom "spaceren" bundet til medikamentforbindelsen og karboksylgruppen i karboksymetyldekstran-polyalkoholen, kan generelt dannes ved å la en reaktiv aminogruppe i medikamentforbindelsen eller den N-terminale aminogruppe i "spaceren" bindes til en karboksylgruppe i karboksymetyldekstran-poly-

alkoholen ved hjelp av en syreamidbinding. Bindingen mellom medikamentforbindelsen eller "spaceren" og karboksylgruppen i karboksymetyldekstran-polyalkoholen er imidlertid ikke begrenset til bindingen ovenfor, og andre kjemiske bindinger og bindinger som benytter én eller flere "spacere" kan benyttes. F.eks. kan et syreanhydrid dannes mellom den C-terminale karboksylgruppe i "spaceren" eller en karboksylgruppe i medikamentforbindelsen og en karboksylgruppe i karboksymetyldekstranen-polyalkoholen, eller, ved å benytte en diaminforbindelse som etylendiamin som "spacer", hver av karboksylgruppene kan bindes ved hjelp av en syreamidbinding til hver av aminogruppene i diaminforbindelsen.

Dersom den reaktive aminogruppe som inngår i medikamentforbindelsen eller den N-terminale aminogruppe i "spaceren" er bundet til en karboksylgruppe i karboksymetyldekstran-polyalkoholen ved hjelp av en syreamidbinding kan dehydratiseringskondensasjonsmidler som vanligvis benyttes for syntese av peptidkjeder, f.eks. N,N'-disykloalkylkarbodiimider som N,N'-disykloheksylkarbodiimid (DCC), karbodiimidderivater som 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDAPC), benzo-triazolderivater som 1-hydroksybenzotriazol (HOBt), 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (EEDQ) og lignende benyttes. I tillegg kan reaksjonen også utføres ved den aktiverte ester-fremgangsmåten eller syrehalidfremgangsmåten.

Reaksjonen kan utføres i ethvert organisk løsemiddel så sant det er i det vesentlige vannfritt og kan løse reaktantene (det organiske aminsalt av karboksymetyldekstran-polyalkoholen og medikamentforbindelsen eller "spaceren" bundet til medikamentforbindelsen). F.eks. kan N,N-dimetylformamid, dimetylsulfoksid, acetamid, N-metylpyrrolidon, sulfolan og lignende fortrinnsvis benyttes. Selv om mengden medikamentforbindelsesrest som innføres i karboksymetyldekstran-polyalkoholen ved reaksjonen med medikamentforbindelsen eller "spaceren" bundet til medikamentforbindelsen ikke er spesielt begrenset bør mengden velges på egnet vis, ut fra medikamentforbindelsens fysikalskkjemiske egenskaper og medikamentkompleksets farmakinetikk, effektivitet og toksisitet. Generelt kan et område fra tilnærmet 0,1 til 30 % (vekt/vekt), fortrinnsvis fra tilnærmet 1 til 15 % (vekt/vekt), velges.

Mengden medikamentforbindelsesrest som er innført i karboksymetyldekstran-polyalkoholen kan lett bestemmes, f.eks. ved absorpsjonsspektrometrisk analyse.

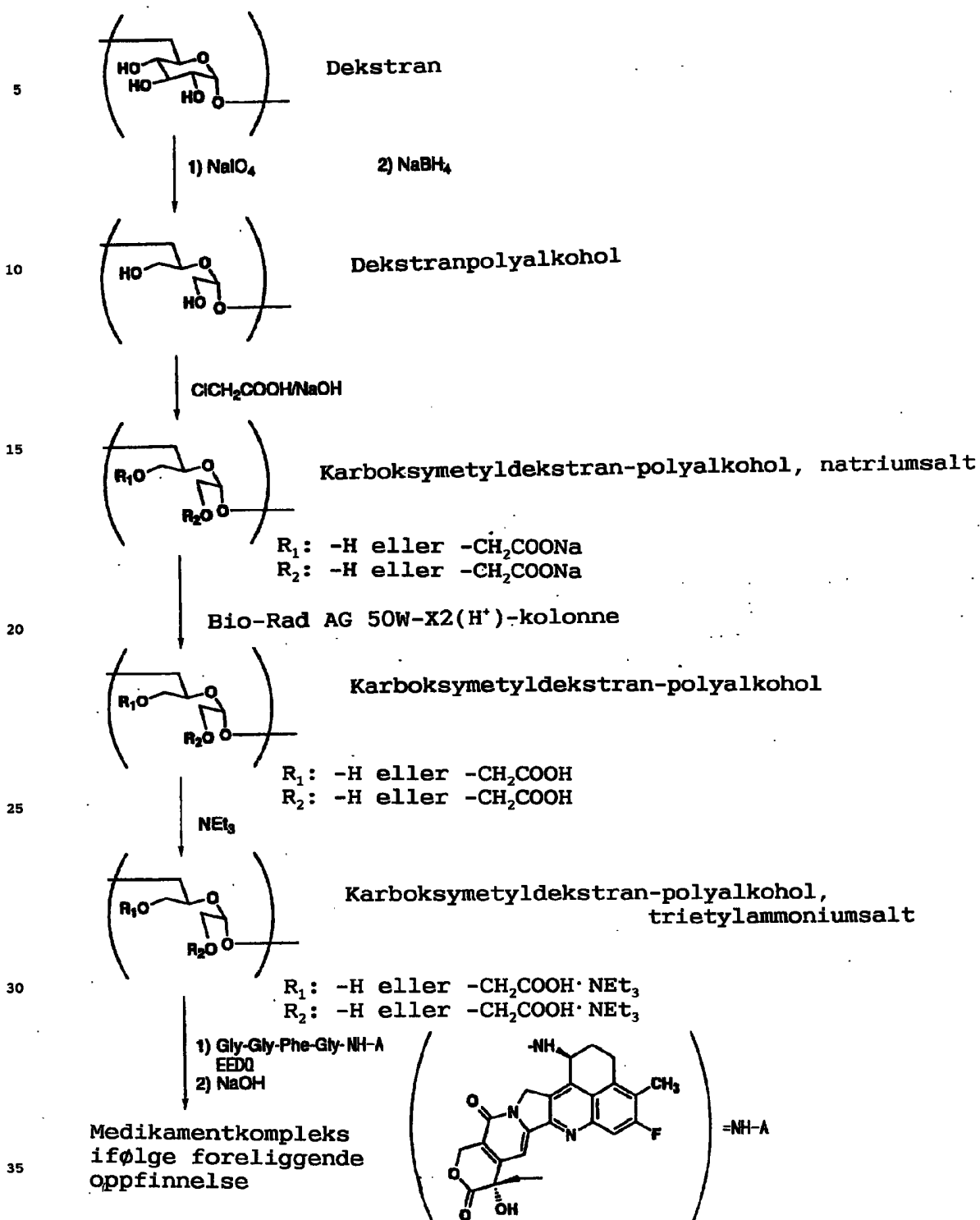
Som en foretrukket utførelse av fremstillingsfremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse viser det påfølgende reaksjonsskjema prosessen for innføring av oligopeptidet bundet til medikamentforbindelsen, som er det antineoplastiske middel som beskrives i krav 2 i japansk patentsøknad (KOKAI) nr. (Hei) 6-87746/1994, inn i en karboksymetyldekstran-polyalkohol. Fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke begrenset til dem vist i skjemaet. I skjemaet nedenfor er den innførte mengde av medikamentforbindelsesresten f.eks. fra tilnærmet 1 til 15 % (vekt/vekt), fortrinnsvis fra tilnærmet 4 til 8 % (vekt/vekt). I tillegg er blant de oppbyggende enheter i polyalkoholene kun én oppbyggende enhet som er har fått tilført 1 eller 2 karboksymetylgrupper eksemplifisert i skjemaet nedenfor. Det bør imidlertid forstås at polysakkaridderivatresten i medikamentkomplekset ikke dannes ved repetisjon av den ovenfor nevnte oppbyggende enhet.

20

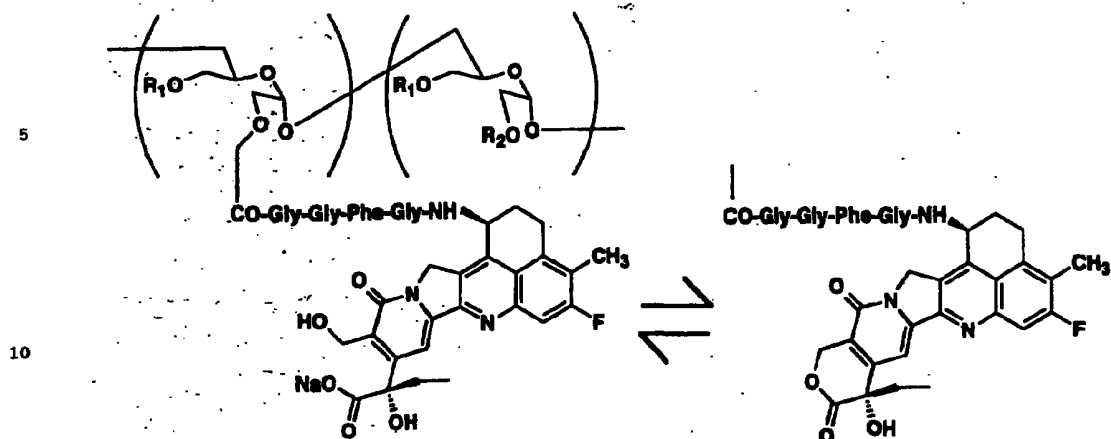
25

30

35



Medikamentkompleks ifølge foreliggende oppfinnelse



Det er kjent at likevekten for medikamentforbindelsen i skjemaet ovenfor ligger over mot forbindelsen hvis laktonring er lukket (den ringlukkede forbindelse) i surt vandig miljø (f.eks. ved tilnærmet pH 3), mens likevekten ligger over mot forbindelsen hvis laktonring er åpnet (den ringåpnede forbindelse) i basisk vandig miljø (f.eks. ved pH tilnærmet 10), og medikamentkomplekset som har fått innført resten som tilsvarer den ringlukkede forbindelse har lignende antineoplastisk aktivitet som komplekset med resten som tilsvarer den ringåpnede forbindelse. Når imidlertid en reaktant hvis laktonring er åpnet foreligger i reaksjonssystemet for reaksjonen mellom karboksymetyldekstran-polyalkoholen og "spaceren" bundet til den ovenfor nevnte medikamentforbindelse (f.eks. en oligopeptid-"spacer"), vil kondensasjonsreaksjonen forløpe mellom en karboksylgruppe avledet fra laktonringen og en aminogruppe avledet fra "spaceren", noe som fører til betydelig reduksjon i utbyttet av reaksjonen, og videre kan et ønsket medikamentkompleks noen ganger ikke erholdes i enhetlig tilstand. Slike sidereaksjoner kan unngås ved å benytte den ringlukkede forbindelse som reaktant i et ikke-vandig system som ikke tillater likevekten. Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er derfor spesielt egnet for fremstilling av medikamentkomplekset som inneholder den ovenfor nevnte medikamentforbindelse.

Det ovenfor medikamentkompleks fremstilt ifølge fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse særpreges ved at

det spesifikt kan vise ønsket farmakologisk aktivitet i et lokalt sette, f.eks. et tumorsete eller et inflammasjonssete, avhengig av typen medikamentfremgangsmåtesrest (f.eks. en rest av en medikamentforbindelse som et antineoplastisk middel eller et antiinflammatorisk middel), og at det kan redusere toksisiteten som ligger i medikamentforbindelsen alene. F.eks. har karboksymetyldekstran-polyalkohol benyttet som polysakkaridderivatrest ganske fremragende tilbakeholdelse i blod og gir høy akkumulering i tumorseter eller inflammasjonsseter når den benyttes som medikamenttilførselsbærer, og tillater medikamentkomplekset å ha seteselektivitet for neoplastiske seter og inflammatoriske seter. Videre antas det at protease (peptidase) uttrykkes i tumorseter eller inflammasjonsseter, og at medikamentkomplekset med en "spacer" som utgjøres av et oligopeptid følgelig lett hydrolyseres i "spacer"-resten og tillater den frigjorte medikamentforbindelse å vise sin virkning.

Et legemiddel som inneholder medikamentkomplekset fremstilt ifølge fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse kan generelt fylles i ampuller eller lignende i form av et frysetørket produkt eller i en annen tilstand, og kan tilveiebringes for klinisk anvendelse som preparater for parenteral tilførsel, f.eks. injeksjoner eller dryppinfusjoner, som oppløses før bruk. Imidlertid er utformingen av de farmasøytiske preparater av legemidlet ikke begrenset til utformingene nevnt ovenfor. For fremstilling av de ovenfor nevnte farmasøytiske preparater kan farmasøytiske sammensetning fremstilt ved benyttelse av farmasøytiske tilsetningsstoffer som er som er tilgjengelige innen faget, f.eks. solubilisatorer, pH-modifiserende midler, stabilisatorer og lignende, benyttes. Selv om dosen av legemidlet beskrevet ovenfor ikke er spesielt begrenset bør den vanligvis fastsettes med utgangspunkt i dosen av medikamentforbindelsen som utgjør medikamentforbindelsesresten, mengden medikamentforbindelsesrest som er innført i medikamentkomplekset, pasientens tilstand, sykdommens natur og lignende. Dersom f.eks. et medikamentkompleks som tilføres parenteralt har fått innført tilnærmet 6 % (vekt/vekt) av en rest av det antineoplastiske middel som beskrives i krav 2 i japansk patentsøknad (KOKAI) nr. (Hei) 6-87746/1994, kan

generelt 1 til 500 mg, fortrinnsvis fra tilnærmet 10 til 100 mg pr. m² kroppsoverflate pr. dag generelt tilføres én gang pr. dag, og tilførselen kan fortrinnsvis gjentas hver 3. til 4. uke.

5

Eksempler

Foreliggende oppfinnelse vil forklares mer spesifikt ved eksempler. I eksemplene står "A-NH-" for en medikamentforbindelsesrest hvori medikamentforbindelsen har en laktonring, f.eks. medikamentforbindelsen som beskrives i krav 2 i japansk patentsøknad (KOKAI) nr. (Hei) 6-87746/1994 (noen ganger betegnet "DX-8951" i eksemplene), og medikamentforbindelsen med en lukket laktonring er representert med A-NH₂. Et eksempel omfatter gruppen representert ved A-NH- i skjemaet beskrevet ovenfor, i hvilket en laktonring dannes. I tillegg står A'-NH- for at laktonringen i en medikamentforbindelsesrest representert ved A-NH- enten foreligger i ringlukket form eller i ringåpnet form eller alternativt som en blanding av disse.

20

I eksemplene ble, dersom ikke annet er angitt, karboksymetyleringsgraden i karboksymetyldekstran-polyalkoholen (substitusjonsgraden med karboksymetylgrupper pr. inngående sukkerrest) bestemt ved å overføre natriumsaltet av karboksymetyldekstranen-polyalkoholen til den frie syreform, løse den resulterende syre i en vandig 0,1 N natriumhydroksidløsning og titrering ved bruk 0,1 N saltsyre. En vandig løsning av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkoholen ble påsatt en Bio-Rad AG50W-x 2 (H⁺-form)-kolonne, og eluatet ble frysetørket og deretter benyttet som prøve. Prøven ble løst i en angitt overskuddsmengde av vandig 0,1 N natriumhydroksidløsning og titrert med 0,1 N saltsyre med fenoltalein som indikator. Karboksymetyleringsgraden ble beregnet ved å benytte følgende ligning: Karboksymetyleringsgrad = $13,4(a-b)/[s-5,8(a-b)]$, hvori "s" er vekten av prøven (mg), "a" er den angitte overskuddsmengde av vandig 0,1 N natriumhydroksidløsning (ml), og "b" er det anvendte volumet 0,1 N saltsyre i titreringen (ml). Mengden innført medikament (vektprosent) ble bestemt ved absorpsjonsspektroskopisk analyse ved

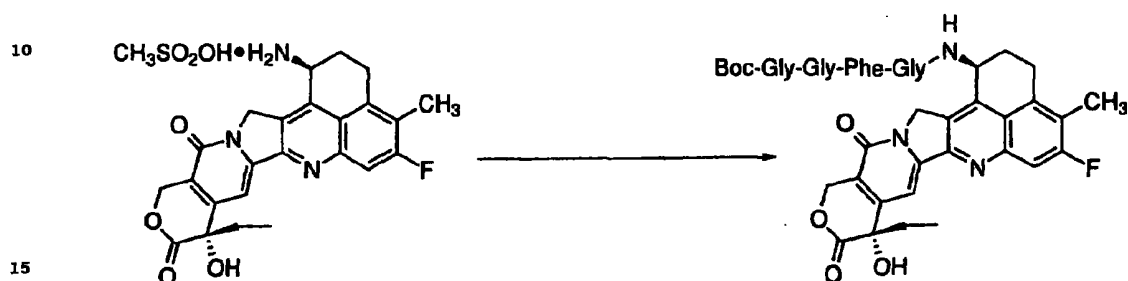
35

benyttelse av karakteristiske absorpsjoner for medikamentforbindelsen (tilnærmet 362 nm). Gelfiltreringen ble utført under følgende betingelser: Kolonne: TSK gel G4000 PW_{XL}, elueringsmiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet:

5 0,8 ml/min, og kolonnetemperatur: 40 °C.

Eksempel 1

3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)



Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (600 mg) og N-hydroksysuccinimid (160 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (20 ml) og avkjølt til 4 °C, og deretter tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (280 mg). Til denne løsning ble en løsning av metansulfonatet av medikamentforbindelsen beskrevet i krav 2 i japansk patentsøknad (KOKAI) nr. (Hei) 6-87746/1994 (600 mg, forbindelsen beskrevet i eksempel 50 i den ovenfor nevnte patentsøknad) og trietylamin (0,16 ml) løst i N,N-dimetylformamid (30 ml) tilsatt, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 16 timer under omrøring og fravær av lys. Reaksjonsblandingen ble inn-

25 dampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble rensset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 10:1-løsning tilsatt 0,5 % eddiksyre) for

30 erholdelse av tittelforbindelsen (1,0 g).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,40 (d, 1H, J = 8,3 Hz); 8,10-8,17 (m, 2H), 7,91-8,01 (m, 1H), 7,78 (d, 1H, J = 10,75 Hz); 7,32 (s, 1H), 6,94-6,96 (m, 1H); 6,50 (s, 1H), 5,57 (t, 1H, J = 4,5 Hz), 5,43 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 3,77 (dd, 2H, J = 5,85 Hz, J = 8,80 Hz), 3,70 (d, 2H, J = 4,40 Hz), 3,65 (d, 2H, J = 5,35 Hz), 3,56 (d, 2H, J = 5,85), 3,15-3,25 (m, 2H); 2,40 (s, 3H), 2,05-2,25 (m, 1H), 1,86 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 0,88 (t, 3H, J = 7,35).

35

Masse (FAB); m/e 854 (M+1).

Eksempel 2

Syntese av 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NHA-A (A-NH₂=DX-8951)

5 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe (600 mg) og N-hydroksysuccinimid (160 mg) ble oppløst i N,N-dimetylformamid (20 ml) og avkjølt til 4 °C, og deretter tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (280 mg). Til denne løsning ble en løsning av metansulfonatet av DX-8951 (600 mg) og trietylamin (0,16 ml) oppløst i N,N-di-
10 metylformamid (30 ml) tilsatt, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 16 timer under omrøring og fravær av lys. Denne reaksjonsblanding ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble rensset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 10:1-
15 løsning tilsatt 0,5 % eddiksyre) for erholdelse av tittel-forbindelsen (700 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,57 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 8,19 (d, 1H), 8,05-8,07 (m, 2H), 7,79 (d, 1H, J = 11,2 Hz), 7,32 (s, 1H), 7,10 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 6,93-7,03 (m, 4H), 6,51 (s, 1H),
20 5,52-5,55 (m, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,18 (d, 1H, J = 18,5 Hz), 4,84 (d, 1H, J = 18,5 Hz), 4,57-4,59 (m, 1H), 3,57-3,71 (m, 6H), 3,15-3,25 (m, 2H), 3,00-3,02 (m, 1H), 2,80-2,90 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,05-2,25 (m, 1H), 1,86 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 0,88 (t, 3H, J = 7,35 Hz).

25 Masse (FAB); m/e 854 (M+1).

Eksempel 3

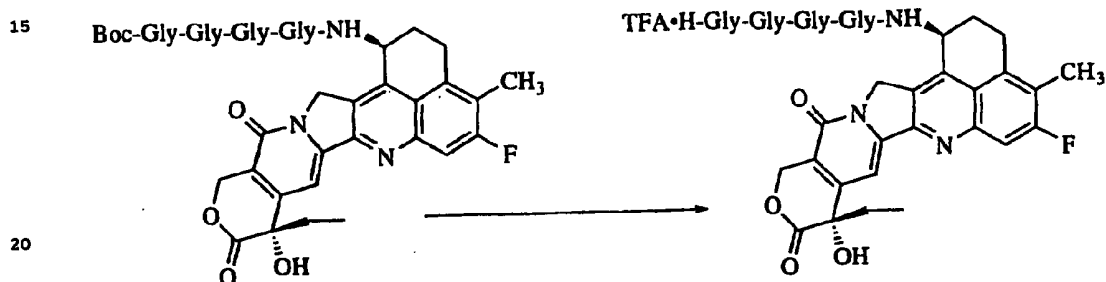
Syntese av 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)

Boc-Gly-Gly-Gly-Gly (120 mg) og N-hydroksysuccinimid
30 (39 mg) ble oppløst i N,N-dimetylformamid (20 ml) og avkjølt til 4 °C og deretter tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (70 mg). Til denne løsning ble en løsning av metansulfonat av DX-8951 (150 mg) og trietylamin (0,039 ml) oppløst i N,N-dimetylformamid (10 ml) tilsatt, og blandingen fikk reagere ved
35 romtemperatur i 16 timer under omrøring og under fravær av lys. Reaksjonsblandingen ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble rensset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 10:1-løsning) for erholdelse av tittelforbindelsen (100 mg).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 8,40 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 8,10-8,17 (m, 2H), 7,91-8,01 (m, 1H), 7,78 (d, 1H, $J = 10,75$ Hz), 7,32 (s, 1H), 6,94-6,96 (m, 1H), 6,50 (s, 1H), 5,57 (t, 1H, $J = 4,5$ Hz), 5,43 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 3,77 (dd, 2H, $J = 5,85$ Hz, $J = 8,80$ Hz), 3,70 (d, 2H, $J = 4,40$ Hz), 3,65 (d, 2H, $J = 5,35$ Hz), 3,56 (d, 2H, $J = 5,85$ Hz), 3,15-3,25 (m, 2H), 2,40 (s, 3H), 2,05-2,25 (m, 1H), 1,86 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 0,88 (t, 3H, $J = 7,35$ Hz).
 Masse (FAB); m/e 764 ($M+1$).

Eksempel 4

Syntese av 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) tri-fluoracetat



3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (79 mg) ble løst i trifluoreddiksyre (3 ml) og ble inkubert i én time. Løsemidlet ble avdampet og restmaterialet behandlet med azeotrope destillasjoner, to ganger med metanol (30 ml) og to ganger med etanol (30 ml), hvorefter restmaterialet ble vasket med eter for erholdelse av tittelforbindelsen (80 mg).
 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 8,59-8,61 (m, 1H), 8,50 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 8,21-8,27 (m, 2H), 7,91-8,01 (br, 3H), 7,81 (d, 1H, $J = 11,2$ Hz), 7,32 (s, 1H), 6,50-6,52 (br, 1H), 5,57-5,59 (m, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 3,80-3,82 (m, 3H), 3,70-3,75 (m, 3H), 3,15-3,25 (m, 2H), 2,41 (s, 3H), 2,05-2,25 (m, 1H), 1,86-1,88 (m, 2H), 0,88 (t, 3H, $J = 7,35$ Hz).

Eksempel 5

Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol

Dekstran T2000 (10 g, Pharmacia, gjennomsnitts-

molekylvekt: 2 000 000) ble løst i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5, 1 000 ml) og tilsatt en vandig løsning (1 000 ml) av natriumperjodat (33,0 g). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager i fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol (7,0 ml) og omrørt
5 over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Natriumborhydrid (14 g) ble tilsatt og oppløst, og blandingen ble så omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble isavkjølt, justert til pH 5,5 med eddiksyre og omrørt ved 4 °C
10 i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble ultrafiltrert ved benyttelse av en Biomaks-30-membran (Millipore) for å fjerne fraksjonen med lav molekylvekt. Polymerfraksjonen ble frysetørket for beholdelse av
15 dekstranpolyalkohol. Etter behandling av denne dekstranpolyalkohol ved pH 3,0 i én time ble fraksjonen med lav molekylvekt fjernet med en Biomaks-50-membranen, hvorefter polymerfraksjonen ble fjernet med en Biomaks-100-membran, og resultatet frysetørket for beholdelse av rensede dekstranpolyalkohol
20 (2,0 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 220K (gelfiltrering, dekstranstandard).

Denne rensede dekstranpolyalkohol (1,8 g) ble tilsatt til en vandig løsning beholdt ved å løse natriumhydroksid (10,5 g) i vann (45 ml) og oppløst ved romtemperatur. Til
25 denne løsning ble monokloredediksyre (15 g) tilsatt og oppløst under isavkjøling, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 20 timer. Etter dette ble reaksjonsblandingen justert til pH 8 med eddiksyre og fraksjonen med lav molekylvekt ble fjernet ved ultrafiltrering med en Biomaks-10-
30 membran. Polymerfraksjonen ble frysetørket for beholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (1,8 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 330K (gelfiltrering, dekstranstandard), og karboksymetyleringsgraden var 0,8.

Det ovenfor beskrevne natriumsalt av karboksymetyldekstran-polyalkohol (300 mg) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 mesh, H⁺-form)-kolonne (1,5 x 8,6 cm), og eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (0,5 ml) og frysetørket for beholdelse av trietylammoniumsaltet av
35 karboksymetyldekstran-polyalkohol (380 mg). Porsjoner av

natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (hver på 300 mg) ble behandlet med kolonnen som beskrevet ovenfor for erholdelse av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (380 mg, 400 mg).

5

Eksempel 6

Syntese av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol

Natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (0,15 g) erholdt i eksempel 5 ovenfor ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (1,05 g) i 10 vann (4,5 ml), og deretter oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble monokloreddiksyre (1,5 g) tilsatt og oppløst under isavkjøling, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 18 timer. Denne reaksjonsblanding ble justert til pH 8 med eddiksyre, tilsatt dråpevis til 90 ml metanol og tilsatt 15 3 M vandig natriumklorid (0,15 ml), og dannede utfelling ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble vasket med metanol og deretter løst i vann (5 ml), og tilsatt 3 M vandig natriumklorid (0,15 ml). Denne 20 vandige løsning ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,45 µm), og filtratet ble tilsatt dråpevis til 35 ml etanol og utfelt materiale oppsamles ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble vasket med etanol, løst i vann og dialysert mot renset vann ved benyttelse av en dialysemembran (Spectrapore 1, molekylvektgrense: 6 000-8 000). 25 Dialysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (0,18 g). Karboksymetyleringsgraden for denne forbindelse pr. sukkerrest var 1,2 (alkalimetri).

30

Eksempel 7

Syntese av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol

Den rensede dekstranpolyalkohol (0,2 g) erholdt i eksempel 5 ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å 35 løse natriumhydroksid (0,84 g) i vann (6 ml) og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble monokloreddiksyre (1,2 g) tilsatt og oppløst under isavkjøling, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 18 timer. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 8 med eddiksyre, tilsatt dråpevis til 120 ml

metanol, og deretter tilsatt 3 M vandig natriumklorid (0,2 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble vasket med metanol og deretter løst i vann (5 ml) og tilsatt 3 M vandig natriumklorid (0,2 ml). Denne vandige løsning ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,45 µm), og filtratet ble tilsatt dråpevis til 35 ml etanol og utfelt materiale oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble vasket med etanol, løst i vann og dialysert mot rensset vann ved benyttelse av en dialysemembran (Spectrapore 1, molekulvektgrense: 6 000-8 000). Dialysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (0,20 g). Karboksymetyleringsgraden av denne forbindelse pr. sukkerrest var 0,4 (alkalimetri).

Eksempel 8

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 5 (380 mg, karboksymetyleringsgrad 0,8), ble løst i N,N-dimetylformamid (30 ml). Til denne løsning ble en løsning av 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)-trifluoreddiksyresalt (49 mg) i N,N-dimetylformamid (5 ml), trietylamin (0,017 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (380 mg) tilsatt etter hverandre, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Denne reaksjonsblanding ble justert til pH 10 med 1 M vandig natriumhydroksid, og porsjoner på 5 ml av blandingen hver tilsatt dråpevis til 25 ml etanol. Denne blanding ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (1 ml) og dietyleter (5 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter).

Utfelt materiale ble løst i vann og dialysert mot rensset vann ved benyttelse av en dialysemembran (Spectrapore 1, molekulvektgrense: 6 000-8 000), og dialysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og frysetørket. Det resulterende råprodukt ble løst i vann (30 ml), justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid og inkubert ved 37 °C i én

time. Løsning ble dialysert som beskrevet ovenfor, hvorefter dialysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (289 mg). Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter å ha løst forbindelsen i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK Gel PW-4000XL, Tosho, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum av forbindelsen (0,1 M tris-bufferløsning pH 9,0, 0,25 mg/ml) er vist i figur 1 hhv. figur 2. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 5,3 % (vekt/vekt) basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 9

15 Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Tittelforbindelsen (300 mg) ble syntetisert på tilsvarende måte som i eksempel 8 ved innføring av trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A, erholdt ved å fjerne Boc-gruppen fra 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (50 mg) på tilsvarende måte som i eksempel 4, i trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (380 mg) erholdt i eksempel 5. Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter å ha løst denne forbindelse i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK Gel PW-4000XL, Tosho, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum av forbindelsen (0,1 M tris-bufferløsning pH 9,0, 0,19 mg/ml) er vist i figur 3 hhv. figur 4. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 5,3 % (vekt/vekt) basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 10

35 Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Gly-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Tittelforbindelsen (190 mg) ble syntetisert på tilsvarende måte som i eksempel 8 ved å innføre trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A, erholdt ved å fjerne Boc-gruppen fra 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-

NH₂-DX-8951) (41 mg) på tilsvarende måte som i eksempel 4, i trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (380 mg) erholdt i eksempel 5. Det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for denne forbindelse (0,1 M tris-buffer pH 9,0, 0,34 mg/ml) er vist i figur 5. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 5,3 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 11

10 Antitumoraktivitet av medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse

Meth A-tumorbærende mus ble fremstilt (7 mus pr. gruppe) ved subkutan transplantasjon av 1 x 10⁶ Meth A-musefibrosarkomceller i høyre lyske hos BALB/c-hannmus (7 uker gamle). På dag 7 ble medikamentkomplekset ifølge eksempel 9, løst i destillert injeksjonsvann, injisert i halevenen hos de Meth A-tumorbærende mus hver 4. dag fire ganger. På dag 21 etter implantasjonen ble tumorene utskåret og veid for å beregne graden inhiberisjon av tumorveksten ut fra følgende ligning: inhiberisjonsgrad av tumorvekst (%) = [1 - (gjennomsnittlig tumorvekt for gruppen som ble tilført analyseprøve/gjennomsnittlig tumorvekt for kontrollgruppen)] x 100. Resultatet var at det ble funnet at medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse erholdt i eksempel 9 viste bemerkelsesverdig forhøyet antitumoraktivitet sammenlignet med medikamentforbindelsen alene, uten "spacer" og polysakkaridderivatet, mens ingen toksisitet (vekttap) ble vist. Polysakkaridderivatet (eksempel 5) alene og medikamentforbindelsen modifisert kun med "spaceren" (trifluoreddiksyresaltet av H₂N-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A (A-NH₂-DX-8951) erholdt ved å fjerne Boc-gruppen fra forbindelsen i eksempel 1 ifølge fremgangsmåten i eksempel 4) ble funnet ikke å være effektive.

Tabell 2

Analyseforbindelse	Dose (mg/kg)	Inhibisjonsgrad (%)
Medikamentforbindelse alene	7,5 x 4	76
	1,875 x 4	46
	0,9375 x 4	36
Forbindelse fra eksempel 9	1,4 ¹⁾ x 4	94
	0,7 ¹⁾ x 4	59
	0,35 ¹⁾ x 4	41

¹⁾ Beregnet ut fra medikamentforbindelsen.

Eksempel 12

Antitumoraktivitet av medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse

Meth A-tumorbærende mus (6 mus pr. gruppe) ble fremstilt på tilsvarende måte som i eksempel 11, og antitumoraktiviteten ble sammenlignet med den erholdt ved én enkel tilførsel av medikamentkompleksene fra eksempel 8 og 9 på, én gang på dag 7. Resultatet var at graden av antitumoraktivitet var som følger: (Polysakkaridderivat)-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' > (Polysakkaridderivat)-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' > medikamentforbindelsen alene. Forbindelsen som omfattet medikamentforbindelsesresten direkte bundet til en karboksylgruppe i karboksymetyldekstran-polyalkoholen fra eksempel 5 uten "spacer" (mengde medikamentforbindelsesrest innført: 6,2 % (vekt/vekt)) ble funnet ikke å ha effekt.

30

35

Tabell 3

	Analyseforbindelse	Dose (mg/kg)	Inhibisjonsgrad (%)
5	Medikamentforbindelse alene	60	77
		20	59
	Forbindelse fra eksempel 8	10 ¹⁾	85
		5 ¹⁾	76
10	Forbindelse fra eksempel 9	5 ¹⁾	98
		2,5 ¹⁾	87

¹⁾ Beregner ut fra medikamentforbindelsen.

15 Eksempel 13

Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstranpolyalkohol

Dekstran T500 (10 g, Pharmacia, molekylvekt: 500K) ble løst i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5; 1 000 ml) og tilsatt en vandig løsning (1 000 ml) av natriumperjodat (33 g). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager i fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol (7,0 ml) og omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid. Natriumborhydrid (14 g) ble tilsatt og oppløst, hvorefter blandingen ble omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble isavkjølt, justert til pH 5,5 med eddiksyrer og omrørt ved 4 °C i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid for erholdelse av løsning 1. Separat ble fremgangsmåten beskrevet ovenfor utført ved benyttelse av dekstran T500 (10 g, Pharmacia, molekylvekt 500K) for erholdelse av løsning 2. Videre ble fremgangsmåten beskrevet ovenfor gjentatt ved benyttelse av dekstran T250 (10 g hver gang, Pharmacia, molekylvekt 250K) for erholdelse av løsning 3 og løsning 4. Løsningene 1-4 ble slått sammen og ultrafiltrert ved benyttelse en Biomaks-50-membran for å fjerne fraksjonen med lav molekylvekt. Polymerfraksjonen ble frysetørket for erholdelse av dekstranpolyalkohol (25 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 163 K (gelfiltrering, pullulanstandard).

Denne dekstranpolyalkohol (11 g) ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (46,2 g) i vann (330 ml) og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble monokloreddiksyre (66 g) tilsatt under isavkjøling og opp-
 5 løst, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 9 med eddiksyre og avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av Biomaks-30-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av
 10 karboksymetyldekstran-polyalkohol (13 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 228K (gelfiltrering, pullulanstandard) og karboksymetyleringsgraden var 0,4.

Natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (600 mg) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG 50W-X2 (200-
 15 400 mesh, H⁺-form)-kolonne (diameter: 44 mm, lengde: 210 mm) og eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (0,93 ml) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (690 mg).

20 Eksempel 14

Syntese av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) tri-fluoreddiksyresalt

3'-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (79 mg) erholdt i eksempel 1 ble løst i trifluoreddiksyre (3 ml) og
 25 inkubert i én time. Løsemidlet ble avdampet og restmaterialet behandlet med azeotrop destillasjon, to ganger med metanol (30 ml) og to ganger med etanol (30 ml), og deretter vasket med eter for erholdelse av tittelforbindelsen (80 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,53 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 8,40-8,48 (m, 2H), 8,28 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,95-8,07 (br, 3H), 7,81 (d, 1H, J = 10,2 Hz), 7,30-7,37 (m, 2H), 7,15-7,30 (m, 5H), 6,50-6,55 (br, 1H), 5,50-5,57 (m, 1H), 5,41 (d, 2H, J = 7,82 Hz), 5,25 (s, 2H), 4,55-4,62 (m, 1H), 3,55-3,92 (m, 6H), 3,15-3,25 (br, 2H), 2,98-3,03 (m, 1H), 2,73-2,82 (m, 1H), 2,40 (s, 3H),
 35 2,05-2,25 (m, 1H), 1,84-1,92 (m, 2H), 0,88 (t, 3H, J = 7,35 Hz).

Eksempel 15Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol
 5 erholdt i eksempel 13 (400 mg) ble overført til trietyl-
 ammoniumsaltet (470 mg) og løst i N,N-dimetylformamid (30 ml).
 Til denne løsning ble en løsning av trifluoreddiksyresaltet av
 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) erholdt i eksempel
 14 (62 mg) i N,N-dimetylformamid (5 ml), trietylamin (0,02 ml)
 10 og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (470 mg)
 tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved rom-
 temperatur over natten under omrøring og fravær av lys.
 Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt
 dråpevis til 10 ml etanol. Til blanding ble 3 M vandig
 15 natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml) tilsatt, og
 utfelt materiale oppsamlet ved sentrifugering. Utfelt materi-
 ale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid, justert til pH 9
 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling, og der-
 etter dialysert mot rensset vann ved benyttelse av en dialyse-
 20 membran (Spektrapore 1, molekylvektgrense: 6 000-8 000). Dia-
 lysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og
 deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen
 (600 mg). Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter å ha løst
 denne forbindelse i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK
 25 Gel PW-4000XL, Tosoh; løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrøm-
 ningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjons-
 spektrum for forbindelsen (0,1 M tris-buffer, pH 9,0,
 0,1 mg/ml) er vist i figur 6 hhv. figur 7. Innholdet av
 medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 5,8 %
 30 (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-
 buffer (pH 9,0).

Eksempel 16
Syntese av 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)-tri-
 35 fluoreddiksyresalt

3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)
 (79 mg) erholdt i eksempel 2 ble løst i trifluoreddiksyre
 (3 ml) og inkubert i én time. Løsemidlet ble avdampet og rest-
 materialet behandlet med azeotrop destillering, to ganger med

metanol (30 ml) og to ganger med etanol (30 ml), hvorefter restmaterialet ble vasket med eter for erholdelse av tittel-forbindelsen (80 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,62-8,66 (m, 2H), 8,23 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 8,18-8,20 (m, 1H), 7,98-8,10 (br, 2H), 7,79 (d, 1H, J = 10,7 Hz), 7,32 (s, 1H), 7,09 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 6,93-7,03 (m, 4H), 6,50-6,60 (br, 1H), 5,52-5,55 (m, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,18 (d, 1H, J = 18,5 Hz), 4,80 (d, 1H, J = 18,5 Hz), 4,57-4,59 (m, 1H), 3,57-3,71 (m, 6H), 3,15-3,25 (m, 2H), 3,00-3,02 (m, 1H), 2,80-2,90 (m, 1H), 2,50 (s, 3H), 2,05-2,25 (m, 1H), 1,86-2,00 (m, 2H), 0,88 (t, 3H, J = 7,35 Hz).

Eksempel 17

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Gly-Phe-

15 NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 13 (1,0 g) ble overført til trietyl-ammoniumsaltet (1,2 g) og løst i N,N-dimetylformamid (90 ml). Til denne løsning ble en løsning av trifluoreddiksyresaltet av 20 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) erholdt i eksempel 16 (158 mg) i N,N-dimetylformamid (15 ml), trietylamin (0,05 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (1,2 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring og fravær av lys.

25 Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Blandingene ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), hvorefter den dannede utfelling ble oppsamlet ved sentrifugering. Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid, justert til 30 pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling og dialysert mot renset vann ved benyttelse av en dialysemembran (Spektrapore 1, molekylvektgrense: 6 000-8 000). Dialysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (1,4 g). Inn-

35 holdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 5,2 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 18Syntese av Boc-Gly-Phe-Leu-OH

H-Gly-Phe-Leu-OH (3,0 g) ble tilsatt til 50 % vandig dioksan (48 ml) og isavkjølt. Til denne løsning ble 1 N vandig natriumhydroksid (9,45 ml) og en dioksanløsning (24 ml) med (Boc)₂O (2,27 g) tilsatt, og blandingen ble omrørt over natten. 1 N saltsyre (9,45 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og løsemidlet ble avdampet. Restmaterialet ble renset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 5:1) for erholdelse av tittelforbindelsen (2,5 g).

Eksempel 19Syntese av Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OBzl

Boc-Gly-Phe-Leu-OH erholdt i eksempel 18 (2,4 g) og N-hydroksysuccinimid (656 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (50 ml), avkjølt til 4 °C, så tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (1,17 g) og omrørt i 2 timer. Til denne løsning ble en N,N-dimetylformamidløsning (40 ml) i hvilken tosylatet av H-Gly-OBzl (1,9 g) og trietylamin (0,79 ml) var oppløst, tilsatt, og blandingen fikk reagere under omrøring ved romtemperatur i 16 timer. Denne reaksjonsblanding ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble renset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 50:1) for erholdelse av tittelforbindelsen (2,0 g).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,20-8,30 (m, 1H), 8,12 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,83 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,32-7,37 (m, 5H), 6,89-6,95 (m, 1H), 5,12 (s, 1H), 4,52-4,59 (br, 1H), 4,34 (dd, 1H, J = 7,3 Hz, J = 15,1 Hz), 3,93 (dd, 1H, J = 5,5 Hz, J = 17,2 Hz), 3,84 (dd, 1H, J = 5,5 Hz, J = 17,2 Hz), 3,54 (dd, 1H, J = 5,9 Hz, J = 16,7 Hz), 3,42 (dd, 1H, J = 5,9 Hz, J = 16,7 Hz), 3,00 (dd, 1H, J = 4,4 Hz, 13,7 Hz), 2,78 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 13,2 Hz), 1,50-1,65 (m, 1H), 1,45 (t, 2H, J = 7,3 Hz), 1,36 (s, 9H), 0,86 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 0,82 (d, 3H, J = 6,4 Hz).

Eksempel 20Syntese av Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OH

Boc-Gly-Phe-Leu-OBzl (1,7 g) erholdt i eksempel 19

ble løst i en blanding av etylacetat (30 ml) og metanol (30 ml) og tilsatt 5 % Pd-C (1,5 g) for katalytisk reduksjon. Reaksjonsblandingen ble filtrert og filtratet inndampet til tørrhet under redusert trykk for erholdelse av tittelforbind-
 5 elsen (1,15 g).

Eksempel 21

Syntese av 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)

Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OH erholdt i eksempel 20 (200 mg) og N-hydroksysuccinimid (58 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (5 ml). Etter avkjøling til 4 °C ble N,N'-disykloheksylkarbo-
 10 diimid (104 mg) tilsatt løsningen og oppløst. Til denne løsning ble en N,N-dimetylformamidløsning (5 ml) i hvilken metansulfonatet av DX-8951 (224 mg) og trietylamin (0,059 ml)
 15 var oppløst tilsatt, og blandingen fikk reagere under omrøring ved romtemperatur i 16 timer under fravær av lys. Denne reaksjonsblanding ble inndampe til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble renset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 10:1-løsning tilsatt
 20 0,5 % eddiksyre) for erholdelse av tittelforbindelsen (200 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,35 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 8,08-8,18 (m, 2H), 7,75-7,85 (m, 2H), 7,32 (s, 1H), 7,10 (d, 2H, J = 6,8 Hz), 7,08-7,13 (m, 3H), 6,85-6,95 (br, 1H), 6,40-6,65 (br, 1H), 5,52-5,55 (m, 1H), 5,46 (d, 1H, J = 18,5 Hz), 5,37 (d, 1H, J = 18,5 Hz), 5,24 (s, 2H), 4,44-4,52 (m, 1H), 4,15-4,25 (m, 1H), 3,68-3,72 (m, 2H), 3,40-3,52 (m, 2H), 3,15-3,25 (br, 2H), 2,85-2,95 (m, 1H), 2,65-2,75 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,05-2,25 (m, 1H), 1,80-1,91 (m, 2H), 1,50-1,65 (m, 1H), 1,45 (t, 2H, J = 7,3 Hz), 1,35 (s, 9H), 0,88 (t, 3H, J = 7,4), 0,86 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 0,82 (d, 3H, J = 6,4 Hz).

Eksempel 22

Syntese av 3'-N-(Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) tri- 35 fluoreddiksyresalt

3'-N-(Boc-Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (97 mg) erholdt i eksempel 21 ble løst i trifluoreddiksyre (3 ml) og inkubert i én time. Løsemidlet ble avdampet og restmaterialet behandlet med azeotrop destillasjon, to ganger med

metanol (30 ml) og to ganger med etanol (30 ml), og deretter vasket med eter for erholdelse av tittelforbindelsen (95 mg). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 8,57 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 8,47 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 8,32 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 8,17 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz), 7,81-7,91 (br, 3H), 7,79 (d, 1H, $J = 10,7$ Hz), 7,32 (s, 1H), 7,21-7,23 (m, 5H), 7,12-7,17 (m, 1H), 6,45-6,55 (br, 1H), 5,57 (q, 1H, $J = 4,4$ Hz), 5,43 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz), 5,34 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz), 5,23 (s, 2H), 4,67 (dt, 1H, $J = 4,0$ Hz, $J = 9,0$ Hz), 4,31 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 15,0$ Hz), 4,0-4,4 (br, 1H), 3,74-3,76 (m, 2H), 3,56 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz, $J = 16,0$ Hz), 3,41 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz, $J = 16,0$ Hz), 3,17-3,19 (br, 2H), 3,02 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, $J = 14,0$ Hz), 2,70 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 14,0$ Hz), 2,40 (s, 3H), 2,05-2,15 (m, 1H), 1,85 (dt, 2H, $J = 7,0$ Hz, $J = 14,0$ Hz), 1,50-1,55 (m, 1H), 1,45 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz), 1,35 (s, 9H), 0,88 (t, 3H, $J = 7,4$), 0,85 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz), 0,80 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz).

Eksempel 23

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Phe-Leu-Gly-

20 NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 13 (690 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (50 ml). Til denne løsning ble en løsning av trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (95 mg) erholdt i eksempel 22 i N,N-dimetylformamid (10 ml), trietylammin (0,03 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (690 mg) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Blandingene ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering. Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid, justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid og dialysert mot rensert vann ved bruk av en dialysemembran (Spektrapore 1, molekylvektgrense 6 000-8 000). Dialysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 μm), hvoretter filtratet ble frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (600 mg). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var

4,8 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 24

5 Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol

Dekstran T500 (50 g, Pharmacia, molekylvekt: 500K) ble løst i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5, 5 000 ml), og en vandig løsning (5 000 ml) av natriumperjodat (165,0 g) ble tilsatt. 10 Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager under fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol (35,0 ml) og omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid. Natriumborhydrid (70 g) ble tilsatt og oppløst, hvorefter blandingen ble omrørt over natten. Reak- 15 sjonsblandingen ble avkjølt på is, justert til pH 5,5 med eddiksyre og omrørt ved 4 °C i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid. Den resulterende løsning ble ultrafiltrert ved benyttelse av en Biomaks-50-membran for fjerning av fraksjonen med lav molekylvekt. Poly- 20 merfraksjonen ble frysetørket for erholdelse av dekstranpolyalkohol (27,1 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 140K (gelfiltrering, pullulanstandard).

Denne dekstranpolyalkohol (5 g) ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (21 g) i 25 vann (150 ml), og oppløst ved romtemperatur. Til løsningen ble monokloreddiksyre (30 g) tilsatt under isavkjøling og oppløst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 8, med eddiksyre og deretter avsaltet ved ultrafiltrering gjennom en 30 Biomaks-50-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (5,6 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 263K (gelfiltrering, pullulanstandard), og karboksymetyleringsgraden var 0,4.

35 Dette natriumsalt av karboksymetyldekstran-polyalkohol (2,0 g) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 mesh, H⁺-form)-kolonne (diameter: 44 mm, lengde 210 mm) og eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (4 ml) og frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (2,2 g).

Eksempel 25Syntese av trimetylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol

Natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol
 5 (1,0 g) erholdt i eksempel 24 ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AB 50W-X2 (200-400 mesh, $\text{Me}_3\text{N H}^+$ -form)-kolonne og eluert med vann. Eluatet ble frysetørket for erholdelse av tittel-forbindelsen (950 mg).

10 Eksempel 26Syntese av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) hydroklorid

På tilsvarende måte som i eksempel 14 ble 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A-trifluoreddiksyresaltet erholdt fra 3'-N-
 15 (Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (400 mg) løst i vann/MeOH (1:4), påsatt en Bio-Rad AG 1-X8 (200-400 mesh, Cl^- -form)-kolonne (1,5 cm x 8,6 cm) og eluert med løsemidlet ovenfor. Eluatet ble konsentrert og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (310 mg).

20 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 8,53 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,46-8,48 (m, 1H), 8,37-8,39 (m, 1H), 7,95 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,80 (s, 3H), 7,78 (d, 1H, J = 11,1 Hz), 7,34 (s, 1H), 7,14-7,24 (m, 5H), 6,50 (s, 1H), 5,56-5,60 (m, 1H), 5,35-5,40 (m, 2H), 5,24 (s, 2H), 4,51-4,56 (m, 1H), 3,86 (dd, J = 4,8, 13,5 Hz, 1H),
 25 3,68-3,79 (m, 3H), 3,54 (s, 2H), 3,15-3,22 (m, 2H), 3,01 (dd, J = 5,6, 13,5 Hz, 1H), 2,78 (dd, J = 9,6, 3,5 Hz, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,12-2,23 (m, 2H), 1,81-1,89 (m, 2H), 0,88 (t, 3H, J = 7,2 Hz).

Masse (FAB); m/e 753 (M+1).

30

Eksempel 27Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trimetylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-poly-
 35 alkohol erholdt i eksempel 25 (0,1 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (6 ml). Til denne løsning ble en løsning av hydrokloridet av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (24 mg) erholdt i eksempel 26 i en N,N-dimetylformamid (10 ml), trietylamin (5 μ l) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksy-

kinolin (0,1 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Blandingen ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-30-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (90 mg). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 11 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 28

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trimetylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 25 (0,1 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (6 ml). Til denne løsning ble en løsning av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)-hydroklorid (36 mg) erholdt i eksempel 26 i N,N-dimetylformamid (10 ml), trietylamin (8 µl) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (0,1 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Blandingen ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), og den dannede utfelling ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 12 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-30-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (80 mg). Resultatet er-

holdt ved GPC-analyse etter å ha løst denne forbindelse i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK Gel PW-4000XL, Tosoh, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min), og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum av forbindelse 5 bindelsen (0,1 M tris-buffer, pH 9,0, 36 µg/ml) er vist i figur 8 hhv. figur 9. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 15 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

10 Eksempel 29

Syntese av karboksymetyldexstran-polyalkohol-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Dekstran T250 (20 g, EXTRASYNTHESE, gjennomsnittlig molekylvekt: 250K) ble løst i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5, 15 2 000 ml) og tilsatt en vandig løsning (2 000 ml) av natriumperjodat (66,0 g). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager ved fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol (14,0 ml) og omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Natriumbor- 20 hydrid (28 g) ble tilsatt og oppløst, hvorefter blandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble isavkjølt, justert til pH 5,5 med eddiksyre og omrørt ved 4 °C i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Fraksjonen med lav 25 molekylvekt ble fjernet fra den resulterende vandige løsning ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-30-membran for erholdelse av tilbakeholdt løsning 1 som ikke passerte gjennom membranen. Separat ble Dekstran T250 (50 g, EXTRASYNTHESE, gjennomsnittlig molekylvekt: 250K) løst i 0,1 M 30 acetatbuffer (pH 5,5, 5 000 ml) og tilsatt en vandig løsning (5 000 ml) av natriumperjodat (165 g). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager ved fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol (35,0 ml) og omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under 35 isavkjøling. Natriumborhydrid (70 g) ble tilsatt og oppløst, hvorefter blandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble isavkjølt, justert til pH 5,5 med eddiksyre og omrørt ved 4 °C i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling.

Fraksjonen med lav molekylvekt ble fjernet fra den resulterende vandige løsning ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-30-membran for erholdelse av tilbakeholdt løsning 2, som ikke passerte gjennom membranen. Tilbakeholdt løsning 1 og 2 ble slått sammen, behandlet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-30-membran for fjerning av fraksjonen med lav molekylvekt fra fraksjonen som hadde passert gjennom Biomaks-50-membranen, og frysetørket for erholdelse av dekstranpolyalkohol (25,7 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 47K (gelfiltrering, pullulanstandard).

Denne dekstranpolyalkohol (5 g) ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (35 g) i vann (150 ml) og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble monokloreddiksyre (50 g) tilsatt under isavkjøling og oppløst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 18 timer. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 8 med eddiksyre og avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-50-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (7,2 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 127K (gelfiltrering, pullulanstandard), og karboksymetyleringsgraden var 0,8. Dette natriumsalt av karboksymetyldekstran-polyalkohol (2,2 g) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 mesh, H⁺-form)-kolonne (diameter: 44 mm, lengde: 210 mm) og eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (4 ml) og deretter frysetørket for erholdelse av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (2,69 g).

Dette trietylammoniumsalt av karboksymetyldekstran-polyalkohol (2,67 g) ble løst i N,N-dietylformamid (200 ml). Til denne løsning ble en løsning erholdt ved å løse trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A, erholdt ved å fjerne Boc-gruppen ifølge en fremgangsmåte tilsvarende den i eksempel 16 fra 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (350 mg), fremstilt på tilsvarende måte som i eksempel 2, og trietylamin (0,116 ml) i N,N-dimetylformamid (10 ml), og en løsning erholdt ved å løse 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (2,67 g) i N,N-dimetylformamid (10 ml) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur

over natten under omrøring. Denne reaksjonsblanding ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (100 ml), og porsjoner på 8 ml av blandingen ble hver tilsatt dråpevis til 30 ml etanol. Til hver blanding ble 3 M vandig natriumklorid (1 ml) og dietyl-
 eter (5 ml) tilsatt, og den dannede utfelling ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble vasket med aceton og deretter løst i vann og tilsatt 3 M vandig natriumklorid (10 ml), og så justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid og videre behandlet ved 37 °C i én
 time. Den behandlede løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-10-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (2,30 g). Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter oppløsning av denne forbindelse i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK Gel PW-4000XL, Tosoh, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum av forbindelsen (0,1 M tris-buffer, pH 9,0, 0,20 mg/ml) er vist i figur 10 hhv. figur 11. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 5,8 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 30

25 Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldexstranpolyalkohol

Til en løsning (2 000 ml) av Dekstran T10 (20 g, Pharmacia, gjennomsnittlig molekylvekt: 10K) i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5) ble tilsatt en vandig løsning (2 000 ml) av
 natriumperjodat (66,0 g). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager under fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol (14,0 ml) og omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Natriumborhydrid (28 g) ble tilsatt og oppløst, og
 blandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble isavkjølt, justert til pH 5,5 med eddiksyre og omrørt ved 4 °C i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble behandlet ved ultrafiltrering

ved benyttelse av en Biomaks-5-membran (Millipore) for å fjerne fraksjonen med lav molekylvekt, og den gjenværende løsning som ikke hadde passert gjennom membranen ble passert gjennom en Biomaks-30-membran. Det resulterende filtrat ble
 5 frysetørket for erholdelse av dekstranpolyalkohol (8,0 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 13K (gelfiltrering, pullulanstandard).

Denne dekstranpolyalkohol (3,7 g) ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (25,9 g) i
 10 vann (111 ml), og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble monoklorediksyre (37 g) tilsatt under isavkjøling og oppløst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 20 timer. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 8 med eddiksyre og avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en
 15 Biomaks-5-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (6,2 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 37K (gelfiltrering, pullulanstandard) og karboksymetyleringsgraden var 0,9.

20 Dette natriumsalt av karboksymetyldekstran-polyalkohol (6,0 g) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 mesh, H⁺-form)-kolonne og deretter eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (9,3 ml) og deretter frysetørker for erholdelse av tittelforbindelsen (7,2 g).

25

Eksempel 31

Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol

Dekstranpolyalkoholen (3,9 g) erholdt i eksempel 30
 30 ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (16,3 g) i vann (117 ml), og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble monoklorediksyre (23,4 g) tilsatt under isavkjøling og oppløst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 18 timer. Denne reaksjons-
 35 blanding ble justert til pH 8 med eddiksyre og avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-5-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (5,0 g). Molekylvekten av denne forbind-

else var 28K (gelfiltrering, pullulanstandard), og karboksymetyleringsgraden var 0,5. Dette natriumsalt av karboksymetyldextranen-polyalkohol (4,8 mg) ble overført til trietylammoniumsaltet på tilsvarende måte som i eksempel 30, for
 5 erholdelse av tittelforbindelsen (5,6 g).

Eksempel 32

Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldextranpolyalkohol

10 En vandig løsning (2 000 ml) av natriumperjodat (66,0 g) ble tilsatt til en løsning (2 000 ml) av Dekstran 4 (20 g, Funakoshi, gjennomsnittlig molekylvekt: 4K-6K) i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager under fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol
 15 (14,0 ml) og omrørt over natten. Reaksjonsblanding ble justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Natriumborhydrid (28 g) ble tilsatt og oppløst, og blandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble isavkjølt, justert til pH 5,5 med eddiksyre og omrørt ved
 20 4 °C i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble behandlet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-3-membran (Millipore) for å fjerne fraksjonen med lav molekylvekt. Filtratet ble frysetørket for erholdelse av
 25 dekstranpolyalkohol (6,0 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 9K (gelfiltrering, pullulanstandard). Denne dekstranpolyalkohol (2,7 g) ble tilsatt til en vandig løsning erholdt å løse natriumhydroksid (18,9 g) i vann (81 ml), og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble monokloredikksyre
 30 (27 g) tilsatt under isavkjøling og oppløst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 20 timer. Reaksjonsblanding ble justert til pH 8 med eddiksyre og avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-5-membran. Den resulterende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble
 35 frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldextran-polyalkohol (4,2 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 20K (gelfiltrering, pullulanstandard) og karboksymetyleringsgraden var 0,9.

Dette natriumsalt av karboksymetyldekstran-polyalkohol (4,0 g) ble overført til trietylammoniumsaltet på tilsvarende måte som i eksempel 30 for erholdelse av tittelforbindelsen (4,8 g).

5

Eksempel 33

Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol

Dekstranpolyalkoholen (2,7 g) erholdt i eksempel 32
 10 ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (11,3 g) i vann (81 ml) ved romtemperatur. Til denne løsning ble monokloreddiksyre (16,2 g) tilsatt under isavkjøling og oppløst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 18 timer. Reaksjonsblandingen ble justert til pH
 15 8 med eddiksyre og avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-5-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (2,7 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 16K (gelfiltrering,
 20 pullulanstandard), og karboksymetyleringsgraden var 0,5. Dette natriumsalt av karboksymetyldekstranen-polyalkohol (2,7 g) ble overført til trietylammoniumsaltet på tilsvarende måte som i eksempel 30, for erholdelse av tittelforbindelsen (3,1 g).

25 Eksempel 34

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 30 (1,5 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (90 ml). Til denne løsning ble en løsning av trietylamin (0,07 ml) og trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (210 mg) i N,N-dimetylformamid (40 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (1,5 g) tilsatt etter hverandre, hvorefter blandingen fikk
 35 reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Hver løsning ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), hvorefter det dannede bunnfall ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm,

8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse en Biomaks-3-

5 membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 μm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (1,3 g). Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter å ha oppløst denne forbindelse i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK

10 Gel PW-4000XL, Tosho, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for forbindelsen (0,1 M tris-buffer, pH 9,0, 65 $\mu\text{g/ml}$) er vist i figur 12 hhv. figur 13. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 6,4 %

15 (vekt/vekt) basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 35

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-

20 NH-A' (A-NH₂-DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkoholen erholdt i eksempel 31 (1,2 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (90 ml). Til denne løsning ble en løsning av trietylammin (0,056 ml) og trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-

25 (Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂-DX-8951) (168 mg) i N,N-dimetylformamid (30 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (1,2 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble

30 hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Hver ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid

35 under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-3-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 μm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen

(1,0 g). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 4,8 % (vekt/vekt) basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

5 Eksempel 36

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 32 (1,2 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (90 ml). Til denne løsning ble en løsning av trietylamin (0,056 ml) og trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (168 mg) i N,N-dimetylformamid (30 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydrokinolin (1,2 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Hver ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-3-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (1,0 g). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 5,9 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

30

Eksempel 37

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 33 (1,5 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (90 ml). Til denne løsning ble en løsning av trietylamin (0,07 ml) og trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (210 mg) i N,N-dimetylformamid (40 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydrokinolin

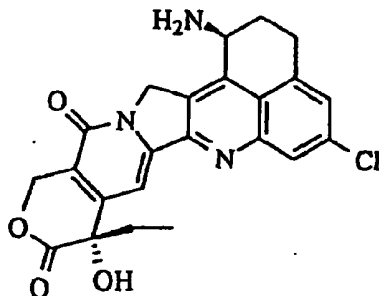
35

(1,5 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Hver ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-3-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (1,3 g). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 4,6 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 38

Syntese av Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A (A-NH₂=DW-8286)

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (42 mg) og N-hydroksysuccinimid (12 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (2 ml) og avkjølt til 4 °C, og deretter tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (22 mg). Til denne løsning ble en løsning av N,N-dimetylformamid (6 ml) i hvilken hydrokloridet av forbindelsen representert ved følgende formel:



[(1s,9s)-1-amino-5-klor-9-etyl-2,3-dihydro-9-hydroksy-1H,12H-benzo[de]pyrano-[3',4':6,7]indolizin[1,2-b]kinolin-10,13(9H,15H)-dion: DW-8286] (50 mg) og trietylamin (0,01 ml) var oppløst ble tilsatt, og blandingen fikk reagere under omrøring og fravær av lys ved romtemperatur i 16 timer. Denne

reaksjonsblanding ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble renset ved kiselgelkolonne-kromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 10:1-løsning tilsatt 0,5 % eddiksyre) for erholdelse av tittelforbindelsen (27 mg).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,10-8,20 (br, 1H), 7,95-8,05 (br, 1H), 7,70-7,80 (br, 2H), 7,50-7,60 (br, 1H), 7,40-7,50 (br, 1H), 7,10-7,25 (m, 5H), 7,05-7,15 (br, 1H), 5,85-5,95 (br, 1H), 5,50-5,60 (br, 1H), 5,40-5,50 (m, 1H), 5,25-5,35 (m, 1H), 5,05-5,15 (m, 1H), 4,90-5,00 (m, 1H), 4,70-4,80 (br, 1H), 4,10-4,25 (br, 2H), 3,60-3,90 (m, 4H), 3,10-3,40 (m, 3H), 2,95-3,05 (br, 1H), 2,15-2,30 (br, 1H), 1,75-1,90 (br, 2H), 1,39 (s, 9H), 0,80-1,00 (m, 3H).

15 Eksempel 39

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DW-8286)

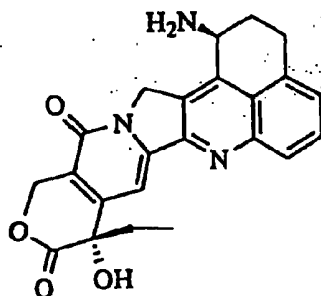
Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (175 mg) erholdt i eksempel 24 ble løst i N,N-dimetylformamid (20 ml). Til denne løsning ble en løsning av trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NHA-(A-NH₂=DW-8286) (29 mg), erholdt fra 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (27 mg) fremstilt i eksempel 38 ved å fjerne Boc-gruppen på tilsvarende måte som i eksempel 4, og trietylamin (9 μl) i N,N-dimetylformamid (5 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (175 mg) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Blandingene ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (20 ml), og utfelt materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble oppløst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomax-30-membranen. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 μm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (135 mg). Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter å

ha løst denne forbindelse i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK Gel PW-4000XL, Tosoh, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum av forbindelsen (0,1 M tris-buffer, pH 9,0, 99 µg/ml) er vist i figur 14 hhv. figur 15. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 6,1 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 40

Syntese av 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DW-8089)

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (163 mg) og N-hydroksysuccinimid (45 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (10 ml), avkjølt til 4 °C og så tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (79 mg). Til denne løsning ble tilsatt en N,N-dimetylformamid (30 ml) i hvilket tosylatet av forbindelsen representert ved følgende formel:



[(1s,9s)-1-amino-9-ethyl-2,3-dihydro-9-hydroksy-1H,12H-benzo-[de]pyrano-[3',4':6,7]indolizin[1,2-b]kinolin-10,13(9H,15H)-dion: DW-8089] (170 mg) og trietylamin (0,054 ml) var oppløst tilsatt, og blandingen fikk reagere under omrøring ved romtemperatur over natten under fravær av lys. Denne reaksjonsblanding ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble rensert ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 94:6-løsning tilsatt 0,5 % eddiksyre) for erholdelse av tittelforbindelsen (100 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,51 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,41 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 8,29 (s, 1H), 8,17 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 8,03 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,90 (dd, 1H, J = 4,8, 5,6 Hz), 7,79 (t, 1H, J =

5,6 Hz), 7,53 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz), 7,36 (s, 1H), 7,13-7,25 (m, 5H), 6,94-6,95 (m, 1H), 5,60-5,63 (m, 1H), 5,36-5,47 (m, 2H), 5,21-5,30 (m, 2H), 4,42-4,47 (m, 1H), 3,63-3,96 (m, 3H), 3,51-3,59 (m, 3H), 3,31-3,40 (m, 1H), 3,09-3,21 (m, 1H), 3,02 (dd, 1H, $J = 4,8, 13,5$ Hz), 2,76-2,81 (m, 1H), 2,13-2,17 (m, 2H), 1,85-1,90 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 0,89 (t, 3H, $J = 8,0$ Hz).
 Masse (FAB); m/e 822 ($M+1$).

Eksempel 41

10 Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DW-8089)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (1,6 g) erholdt i eksempel 24 ble løst i *N,N*-dimetylformamid (60 ml). Til denne løsning ble en løsning erholdt ved å løse trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DW-8089), erholdt fra 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (200 mg) fremstilt i eksempel 40 ved å fjerne Boc-gruppen på tilsvarende måte som i eksempel 4, og trietylamin (0,07 ml) i *N,N*-dimetylformamid (20 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroxykinolin (1,6 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Hver ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,5 ml) og dietyleter (25 ml), og dannet bunnfall ble oppsamlet ved sentrifugering (2 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble vasket med etanol og løst i vann, tilsatt 3 M vandig natriumklorid (20 ml) og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid. Denne løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering gjennom en Biomaks-10-membranen. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 μ m) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (1,20 g). Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter å ha løst forbindelsen i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK Gel PW-4000XL, Tosoh, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum for forbindelsen (0,1 M tris-buffer, pH 9,0, 0,26 mg/ml) er vist i figur 16 hhv. figur 17. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 5,0 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M

tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 42

Syntese av trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran- 5 polyalkohol

Dekstran T150 (20 g, Pharmacia, gjennomsnittlig
molekylvekt: 150K) ble løst i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5,
2 000 ml) og tilsatt en vandig løsning (2 000 ml) av natrium-
perjodat (66,0 g). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager under
10 fravær av lys ble blandingen tilsatt etylenglykol (14,0 ml) og
omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7,5
med 8 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Natriumbor-
hydrid (28 g) ble tilsatt og oppløst, hvorefter blandingen ble
omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble
15 avkjølt på is, justert til pH 5,5 med eddiksyre og omrørt ved
4 °C i én time. pH av blandingen ble justert til 7,5 med 8 M
vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende
vandige løsning ble konsentrert til 500 ml ved ultrafiltrering
ved benyttelse av en Biomaks-5-membran (Millipore) for erhold-
20 else av løsning 1. Separat ble fremgangsmåten beskrevet oven-
for utført ved benyttelse av dekstran T110 (20 g) for erhold-
else av løsning 2. Løsning 1 og løsning 2 ble slått sammen, og
den sammenslåtte løsning ble justert til pH 3,0 og inkubert
ved 40 °C i 4 timer, og deretter justert til pH 7 for erhold-
25 else av en løsning som inneholdt dekstranpolyalkoholen med
reduisert molekulvekt. Løsningen ble passert gjennom en
Biomaks-30-membran og avsaltet ved ultrafiltrering ved be-
nyttelse av en Biomaks-5-membran, og deretter frysetørket for
erholdelse av dekstranpolyalkohol (4,6 g). Molekylvekten av
30 denne forbindelse var 17K (gelfiltrering, pullulanstandard).

Denne dekstranpolyalkohol (2,5 g) ble tilsatt til en
vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (17,5 g) i
vann (75 ml) og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning
ble monokloreddiksyre (25 g) tilsatt under isavkjøling og opp-
35 løst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i
20 timer. Denne reaksjonsblanding ble justert til pH 9 med
eddiksyre og deretter avsaltet ved ultrafiltrering ved be-
nyttelse av en Biomaks-5-membran. Den gjenværende løsning som
ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse

av natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (4,0 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 45K (gelfiltrering, pullulanstandard), og karboksymetyleringsgraden var 0,9.

Dette natriumsalt av karboksymetyldekstran-poly-
 5 alkohol (3,7 g) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 mesh, H⁺-form)-kolonne og eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (5,8 ml) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (4,4 g).

10 Eksempel 43

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 42 (4,4 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (300 ml). Til denne løsning ble en løsning av
 15 trietylamin (0,19 ml) og trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (580 mg) i N,N-dimetylformamid (45 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (4,4 g) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk
 20 reagere ved romtemperatur over natten under omrøring og fravær av lys. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 10 med 1 M vandig natriumhydroksid, hvorefter porsjoner på 5 ml av blandingen ble hver tilsatt dråpevis til 25 ml etanol. Blandingene ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (1 ml) og dietyleter
 25 (5 ml), og det dannede bunnfall ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i vann og dialysert mot rensert vann ved benyttelse av en dialysemembran (Spectrapore 1, molekylvektgrense: 6 000-8 000), og dialysatet ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm)
 30 og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (3,4 g). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 4,6 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

35 Eksempel 44

Syntese av α-metylkarboksydekstran-polyalkohol-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Dekstranpolyalkoholen (2 g) erholdt i eksempel 42 ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natrium-

hydroksid (14 g) i vann (60 ml) og oppløst ved romtemperatur. Til denne løsning ble α -brompropionsyre (19 ml) tilsatt under isavkjøling og oppløst, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur i 18 timer. Reaksjonsblandingen ble justert til

5 pH 8 med eddiksyre og avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-50-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natriumsaltet av α -metylkarboksymetyldekstran-polyalkohol (2,95 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 45K (gel-

10 filtrering, pullulanstandard). α -metylkarboksymetyleringsgraden pr. sukkerrest ble bestemt som for karboksymetyldekstran-polyalkohol som følger. En vandig løsning av natriumsaltet av α -metylkarboksymetyldekstran-polyalkohol ble påsatt en Bio-Rad AG 50W-X2 (H^+ -form)-kolonne, og eluatet ble fryse-

15 tørket og benyttet som analyseprøve. Denne prøve ble oppløst i en angitt overskuddsmengde av 0,1 N vandig natriumhydroksidløsning og titrert med 0,1 N saltsyre med fenolftalein som indikator. α -metylkarboksymetyleringsgraden ble erholdt ifølge ligningen: α -metylkarboksymetyleringsgrad = $13,4(a-b)/[s-$

20 $7,2(a-b)]$ hvori "s" er mengden prøve benyttet (mg), "a" er den tilsatte overskuddsmengden av 0,1 N vandig natriumhydroksidløsning (ml) og "b" er mengden 0,1 N saltsyre benyttet i titreringen (ml). Resultatet var at α -metylkarboksymetyleringsgraden ble funnet å være 0,8.

25 Dette natriumsalt av α -metylkarboksymetyldekstran-polyalkohol (2,2 g) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 mesh, H^+ -form)-kolonne (diameter: 44 mm, lengde: 210 mm) og så eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (4 ml) og deretter frysetørket for erholdelse av trimetyl-

30 ammoniumsaltet av α -metylkarboksymetyldekstran-polyalkohol (2,69 g).

Trietylammoniumsaltet av α -metylkarboksymetyldekstran-polyalkohol (2,68 g) ble løst i N,N-dimetylformamid (60 ml). Til denne løsning ble en løsning erholdt ved å løse

35 trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH₂=DX-8951), erholdt på tilsvarende måte som i eksempel 16 ved å fjerne Boc-gruppen fra 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (350 mg), syntetisert på tilsvarende måte som i eksempel 2, og trietylamin (0,116 ml) i N,N-dimetylformamid (10 ml), og en

løsning erholdt ved å løse 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-di-hydroksykinolin (2,68 g) i N,N-dimetylformamid (10 ml) ble tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Denne reaksjonsblanding

5 ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (40 ml), og porsjoner på 6 ml av blandingen ble hver tilsatt dråpevis til 30 ml etanol. Hver løsning ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (1 ml) og dietyleter (5 ml), og den dannede utfelling ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble

10 vasket med aceton og løst i vann, tilsatt 3 M vandig natriumklorid (10 ml), justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid og inkubert ved 37 °C i én time. Løsningen ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-10-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom

15 membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (2,15 g). Resultatet erholdt ved GPC-analyse etter å ha løst denne forbindelse i 0,1 M vandig natriumklorid (kolonne: TSK Gel PW-4000XL, Tosoh, løsemiddel: 0,1 M NaCl, gjennomstrømningshastighet: 0,8 ml/min) og det ultrafiolette absorpsjonsspektrum av forbindelsen (0,1 M tris-buffer, pH 9,0, 0,21 mg/ml) er vist i figur 18 hhv. figur 19. Innholdet av medikamentforbindelsesrest i produktet var 5,9 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH

25 9,0).

Eksempel 45

Syntese av 3'-N-(Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)-trifluoreddiksyresalt

30 En blanding av p-toluensulfonsyresaltet av Phe-Gly-OBzl (3,06 g), Boc-Gly-OH (1,10 g), N-hydroksysuccinimid (941 mg), N-metylmorfolin (0,725 ml), og N,N-dimetylformamid (40 ml) ble avkjølt til 4 °C og tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (1,56 g). Blandingens fikk reagere over natten ved

35 romtemperatur under omrøring, og ble så inndampet til tørrhet under redusert trykk. Restmaterialet ble renset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 98:2) for erholdelse av Boc-Gly-Phe-Gly-OBzl (1,93 g).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,52 (dd, 1H, J = 5,6, 6,4 Hz), 7,97 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,30-7,39 (m, 5H), 7,15-7,26 (m, 5H), 6,83 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 5,14 (s, 1H), 4,52-4,57 (m, 1H), 3,87-3,96 (m, 2H), 3,57 (dd, 1H, J = 5,6, 16,7 Hz), 3,43 (dd, 1H, J = 5,6, 16,7 Hz), 3,01 (dd, 1H, J = 4,8, 14,3 Hz), 2,77 (dd, 1H, J = 5,6, 14,3 Hz), 1,37 (s, 9H).

Det resulterende Boc-Gly-Phe-Gly-OBzl (1,78 g) ble løst i etylacetat (60 ml) og behandlet ved katalytisk reduksjon i 24 timer i nærvær av 5 %-Pd-C (1,8 g). Katalysatoren ble fjernet ved filtrering og filtratet konsentrert under redusert trykk for erholdelse av Boc-Gly-Phe-Gly-OH (1,41 g). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,35 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 7,94 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,15-7,26 (m, 5H), 6,85 (dd, 1H, J = 5,6, 6,4 Hz), 4,52-4,58 (m, 1H), 3,76 (d, 2H, J = 5,6 Hz), 3,56 (dd, 1H, J = 6,4, 16,7 Hz), 3,43 (dd, 1H, J = 5,6, 16,7 Hz), 3,03 (dd, 1H, J = 5,0, 13,5 Hz), 2,79 (dd, 1H, J = 9,5, 13,5 Hz), 1,37 (s, 9H).

Boc-Gly-Phe-Gly-OH (500 mg) erholdt ovenfor og N-hydroksysuccinimid (161 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (10 ml). Til denne løsning ble tilsatt N,N-dimetylformamid (50 ml) i hvilket metansulfonatet av DX-8951 (530 mg) og trietylamin (0,146 ml) var oppløst. Blandingen ble avkjølt til 4 °C, tilsatt N,N'-disykloheksylkarbodiimid (268 mg) og inkubert over natten under omrøring ved romtemperatur under fravær av lys. Denne reaksjonsblanding ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble rensset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklor-metan:metanol = 96:4) for erholdelse av 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (100 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,39 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 8,34 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 7,98 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 7,78 (d, 1H, J = 10,3 Hz), 7,33 (s, 1H), 7,13-7,24 (m, 5H), 6,80 (dd, 1H, J = 5,6, 6,4 Hz), 5,55-5,61 (m, 1H), 5,44 (d, 1H, J = 16,0 Hz), 5,41 (d, 1H, J = 16,0 Hz), 5,25 (s, 2H), 4,43-4,46 (m, 1H), 3,69-3,79 (m, 2H), 3,50 (dd, 1H, J = 5,6, 16,7 Hz), 3,41 (dd, 1H, J = 5,6, 16,7 Hz), 3,16-3,19 (m, 2H), 2,98 (dd, 1H, J = 4,8, 14,3 Hz), 2,79 (dd, 1H, J = 9,5, 14,3 Hz), 2,41 (s, 3H), 2,19-2,25 (m, 1H), 2,10-2,15 (m, 1H), 1,82-1,90 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 0,88 (t, 3H, J = 8,0 Hz).

Masse (FAB); m/e 797 (M+1).

Det resulterende 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (100 mg) ble løst i trifluoreddiksyre (3 ml) og inkubert i én time. Løsemidlet ble avdampet og restmaterialet
 5 behandlet ved azeotrop destillasjon, to ganger med metanol (30 ml) og to ganger med etanol (30 ml), og deretter vasket med eter for erholdelse av tittelforbindelsen (80 mg).
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,52-8,62 (m, 1H), 7,94 (s, 3H), 7,79 (t, 1H, J = 11,1 Hz), 7,34 (s, 1H), 7,15-7,27 (m, 5H), 6,52 (s,
 10 1H), 5,57-5,61 (m, 1H), 5,36-5,46 (m, 2H), 5,24 (s, 2H), 4,66-4,70 (m, 1H), 3,69-3,81 (m, 2H), 3,61-3,68 (m, 1H), 3,40-3,47 (m, 1H), 3,15-3,23 (m, 1H), 3,01 (dd, 1H, J = 4,0, 13,5 Hz), 2,77 (dd, 1H, J = 9,5, 13,5 Hz), 2,12-2,23 (m, 2H), 1,81-1,91 (m, 2H), 0,89 (t, 3H, J = 7,2 Hz).
 15 Masse (FAB); m/e 697 (M+1).

Eksempel 46

Syntese av 3'-N-(Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951)-trifluoreddiksyresalt

20 Boc-Phe-Gly (771 mg) og N-hydroksysuccinimid (300 mg) ble oppløst i N,N-dimetylformamid (10 ml). Til denne løsning ble tilsatt N,N-dimetylformamid (50 ml) i hvilket metansulfonatet av DX-8951 (1058 mg) og trietylamin (0,293 ml) var oppløst. Blandingen ble avkjølt til 4 °C og deretter tilsatt
 25 N,N'-disykloheksylkarbodiimid (494 mg) og inkubert under omrøring ved romtemperatur over natten under fravær av lys. Reaksjonsblandingen ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, og restmaterialet ble renset ved kiselgelkolonnekromatografi (elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 98:2) for
 30 erholdelse av 3'-N-(Boc-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (1,20 g).
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,29 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 8,21 (t, 1H, J = 4,8 Hz), 7,76 (d, 1H, J = 10,3 Hz), 7,32 (s, 1H), 7,13-7,25 (m, 5H), 6,92 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 6,49 (s, 1H), 5,56-5,61 (m, 1H), 5,44 (d, 1H, J = 15,9 Hz), 5,38 (d, 1H, J = 15,9 Hz),
 35 5,25 (s, 2H), 4,08-4,12 (m, 1H), 3,78 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 3,16-3,25 (m, 2H), 2,99 (dd, 1H, J = 4,0, 13,5 Hz), 2,72 (dd, 1H, J = 10,3, 13,5 Hz), 2,40 (s, 3H), 2,09-2,35 (m, 2H), 1,80-1,91 (m, 2H), 1,16 (s, 9H), 0,88 (t, 3H, J = 8,0 Hz).
 Masse (FAB); m/e 741 (M+1).

3'-N-(Boc-Phe-Gly)-NH-A (170 mg) erholdt ovenfor ble løst i trifluoreddiksyre (4 ml) og inkubert i én time. Løse-
midlet ble avdampet og restmaterialet behandlet ved azeotrop
destillasjon, to ganger med metanol (10 ml) og to ganger med
5 etanol (10 ml), og deretter vasket med eter for erholdelse av
tittelforbindelse (100 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,88 (t, 1H, J = 4,8 Hz), 8,68 (d, 1H, J =
8,7 Hz), 8,05-8,15 (m, 3H), 7,79 (d, 1H, J = 11,1 Hz), 7,26-
7,36 (m, 5H), 6,52 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 5,57-5,62 (m, 1H),
10 5,43 (d, 1H, J = 15,9 Hz), 5,38 (d, 1H, J = 15,9 Hz), 5,19-
5,28 (m, 1H), 4,10-4,18 (m, 1H), 3,93 (dd, 1H, J = 4,8,
16,7 Hz), 3,82 (dd, 1H, J = 4,8, 16,7 Hz), 3,17-3,24 (m, 2H),
3,14 (dd, 1H, J = 4,8, 13,5 Hz), 2,95 (dd, 1H, J = 8,0,
13,5 Hz), 2,42 (s, 3H), 2,14-2,25 (m, 2H), 1,83-1,91 (m, 2H),
15 0,89 (t, 3H, J = 8,0 Hz).

Masse (FAB); m/e 640 (M+1).

Eksempel 47

Syntese av 3'-N-Gly-NH-A (A-NH₂=DX-8951)-trifluoreddiksyresalt

20 Metansulfonatet av DX-8951 (530 mg) og trietylamin
(0,28 ml) ble løst i N,N-dimetylformamid (10 ml), avkjølt til
4 °C og tilsatt N-hydroksysuccinimidesteren av Boc-Gly
(327 mg). Blandingen ble inkubert under omrøring ved rom-
temperatur over natten i fravær av lys. Reaksjonsblandingen
25 ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, hvorefter
restmaterialet ble renset ved kiselgelkolonnekromatografi
(elueringsmiddel: diklormetan:metanol = 98:2) for erholdelse
av 3'-N-(Boc-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (500 mg).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,38 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,77 (d, 1H, J =
30 10,7 Hz), 7,31 (s, 1H), 6,89-6,91 (m, 1H), 6,49 (s, 1H), 5,55-
5,59 (m, 1H), 5,45 (d, 1H, J = 16,1 Hz), 5,38 (d, 1H, J =
16,1 Hz), 5,27 (d, 1H, J = 19,0 Hz), 5,18 (d, 1H, J =
19,0 Hz), 3,50-3,62 (m, 2H), 3,15-3,19 (m, 2H), 2,41 (s, 3H),
2,18-2,24 (m, 1H), 2,08-2,12 (m, 1H), 1,81-1,91 (m, 2H), 1,31
35 (s, 9H), 0,87 (t, 3H, J = 8,0 Hz).

Masse (FAB); m/e 593 (M+1).

3'-N-(Boc-Gly)-NH-A (100 mg) erholdt ovenfor ble løst
i trifluoreddiksyre (2 ml) og inkubert i én time. Løsemidlet
ble inndampet og restmaterialet behandlet ved azeotrop

destillasjon, to ganger med metanol (10 ml) og to ganger med etanol (10 ml), og deretter vasket med eter for erholdelse av tittelforbindelsen (70 mg).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 8,88 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,08 (s, 3H),
 5 7,81 (d, 1H, $J = 11,2$ Hz), 7,34 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,63-
 5,67 (m, 1H), 5,45 (d, 1H, $J = 16,7$ Hz), 5,40 (d, 1H, $J =$
 16,7 Hz), 5,36 (d, 1H, $J = 19,1$ Hz), 5,25 (d, 1H, $J =$
 19,1 Hz), 3,56 (s, 2H), 3,11-3,19 (m, 2H), 2,43 (s, 3H), 2,23-
 2,28 (m, 1H), 2,11-2,19 (m, 1H), 1,81-1,91 (m, 2H), 0,88 (t,
 10 3H, $J = 8,0$ Hz).

Masse (FAB); m/e 493 ($M+1$).

Eksempel 48

Syntese av trimetylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran- 15 polyalkohol

Dekstran T500 (50 g, Pharmacia, molekylvekt: 500K) ble løst i 0,1 M acetatbuffer (pH 5,5, 5 000 ml) og tilsatt en vandig løsning (5 000 ml) av natriumperjodat (165,0 g). Etter omrøring ved 4 °C i 10 dager under fravær av lys ble bland-
 20 ingen tilsatt etylenglykol (35,0 ml) og omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 7 med 8 M vandig natriumhydroksid. Natriumborhydrid (70 g) ble tilsatt og oppløst, og blandingen ble omrørt over natten. Reaksjonsblandingen ble avkjølt på is, justert til pH 5,5 med eddiksyre og
 25 omrørt ved 4 °C i én time, og deretter justert til pH 7,5 med 8 M vandig natriumhydroksid. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-50-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av dekstranpoly-
 30 alkohol (20,2 g). Molekylvekten av denne forbindelse var 159K (gelfiltrering, pullulanstandard).

Denne dekstranpolyalkohol (7,5 g) ble tilsatt til en vandig løsning erholdt ved å løse natriumhydroksid (31,5 g) i vann (225 ml), og oppløst ved romtemperatur. Til løsningen ble
 35 monokloreddiksyre (45 g) tilsatt under isavkjøling og oppløst, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblanding ble justert til pH 8 med eddiksyre og deretter avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-50-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte

gjennom membranen ble frysetørket for erholdelse av natrium-saltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (8,5 g). Molekyl-vekten av denne forbindelse var 274K (gelfiltrering, pullulan-standard), og karboksymetyleringsgraden var 0,4. Dette

5 natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (2,0 g) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 mesh, H⁺-form)-kolonne (diameter: 44 mm, lengde: 210 mm), og eluert med vann. Eluatet ble tilsatt trietylamin (4 ml) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (2,2 g).

10

Eksempel 49

Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂-DX-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-poly-

15 alkohol erholdt i eksempel 48 (200 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (7 ml). Til denne løsning ble en løsning av trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂-DX-8951) erholdt i eksempel 45 (41 mg) i N,N-dimetylformamid (5 ml), trietylamin (0,014 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-di-

20 hydroksykinolin (100 mg) tilsatt etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring. Porsjoner på 5 ml av reaksjonsblandingen ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Blandingen ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,0 ml) og dietyleter (25 ml), og utfelt

25 materiale ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-50-

30 membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (190 mg). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 4,5 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved

35 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 50Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Phe-Gly-NH-A' (A-NH₂=DX-8951)

Natriumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol
 5 erholdt i eksempel 24 (2,5 g) ble løst i vann, påsatt en Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 mesh, Et₃N, H⁺-form)-kolonne og eluert med vann. Eluatet ble frysetørket for erholdelse av trietyl-ammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol (2,5 g).

Dette trietylammoniumsalt av karboksymetyldekstran-
 10 polyalkohol (200 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (12 ml). Til denne løsning ble en løsning av trifluoreddiksyresaltet av 3'-N-(Phe-Gly)-NH-A (A-NH₂=DX-8951) (42 mg) erholdt i eksempel 46 og trietylamin (0,016) i N,N-dimetylformamid (5 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (200 mg) tilsatt
 15 etter hverandre, og blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring og i fravær av lys. Reaksjonsblandingen ble tilsatt vann (300 ml) og ultrafiltrert ved benyttelse av en ultrafiltreringsmembran 10K (Filtron). Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble
 20 justert til pH 10 med 0,1 N vandig natriumhydroksid og passert gjennom en filtreringsmembran (0,16 µm, Filtron). Filtratet ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-50-membran, og deretter filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen
 25 (180 mg). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i forbindelsen var 6,1 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 51

30 Syntese av karboksymetyldekstran-polyalkohol-Gly-NH-A' (A-NH₂=DW-8951)

Trietylammoniumsaltet av karboksymetyldekstran-polyalkohol erholdt i eksempel 48 (370 mg) ble løst i N,N-dimetylformamid (10 ml). Til denne løsning ble en løsning av tri-
 35 fluoreddiksyresaltet av 3'-N-Gly-NH-A (A-NH₂=DX-8951) erholdt i eksempel 47 (57 mg) i N,N-dimetylformamid (3 ml), trietylamin (0,027 ml) og 1-etoksykarbonyl-2-etoksy-1,2-dihydroksykinolin (185 mg) tilsatt etter hverandre, hvorefter blandingen fikk reagere ved romtemperatur over natten under omrøring.

Porsjoner på 5 ml av denne reaksjonsblanding ble hver tilsatt dråpevis til 10 ml etanol. Blandingen ble tilsatt 3 M vandig natriumklorid (2,0 ml) og dietyleter (25 ml), og det dannede bunnfall ble oppsamlet ved sentrifugering (3 500 rpm, 8 minutter). Utfelt materiale ble løst i 0,5 M vandig natriumklorid og justert til pH 9 med 0,1 M vandig natriumhydroksid under isavkjøling. Den resulterende vandige løsning ble avsaltet ved ultrafiltrering ved benyttelse av en Biomaks-50-membran. Den gjenværende løsning som ikke passerte gjennom membranen ble filtrert gjennom et Millipore-filter (0,22 µm) og deretter frysetørket for erholdelse av tittelforbindelsen (290 mg). Innholdet av medikamentforbindelsesrest i denne forbindelse var 0,5 % (vekt/vekt), basert på absorpsjonen ved 362 nm i 0,1 M tris-buffer (pH 9,0).

Eksempel 52

Antitumoraktivitet av medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse

Meth A-tumorbærende mus (6 mus pr. gruppe) ble fremstilt på tilsvarende måte som i eksempel 11, og antitumoraktiviteten av medikamentkomplekset ifølge eksempel 15 ble undersøkt ved en enkel tilførsel på tilsvarende måte som i eksempel 12. Resultatet var at medikamentkomplekset ifølge eksempel 15 viste bemerkelsesverdig forhøyet antitumoraktivitet og et bredere effektivt doseområde enn medikamentforbindelsen ifølge eksempel 12 alene.

Analyseforbindelse	Dose (mg/kg) ¹⁾	Inhiberingsgrad (%)
Forbindelse fra eksempel 15	10	100
	5	99
	2,5	95
	1,25	83

¹⁾ Beregnet ut fra medikamentforbindelsen

Eksempel 53Antitumoraktivitet av medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse

SC-6-tumorbærende nakne mus (5 mus pr. gruppe) ble fremstilt ved subkutan transplantasjon av en bit av SC-6 human magetumor i høyre lyske hos nakne mus (BALB/c-nu/nu, hannmus). På dag 27 etter transplantasjonen ble medikamentkomplekset ifølge eksempel 15, oppløst i destillert injeksjonsvann, gitt som en enkelt intravenøs tilførsel, og antitumoraktiviteten sammenlignet med aktiviteten av medikamentforbindelsen alene. Resultatet var at medikamentkomplekset ifølge eksempel 15 viste høyere antitumoraktivitet enn medikamentforbindelsen alene, mens ingen mus døde grunnet toksisitet.

15

Analyse-forbindelse	Dose (mg/kg)	Inhibisjons-grad (%)	Antall døde mus/antall anvendte mus
Medikament-forbindelse alene	60	98	2/5
	15	61	0/5
Forbindelse fra eksempel 15	8 ¹⁾	100	0/5
	2 ¹⁾	71	0/5

25 ¹⁾ Beregnet ut fra medikamentforbindelsen

Eksempel 54Antitumoraktivitet av medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse

Human luncancer QG-90-bærende nakne mus (5 mus pr. gruppe) ble fremstilt på tilsvarende måte som i eksempel 53. På dag 16 etter transplantasjonen ble medikamentkomplekset ifølge eksempel 15, løst i destillert injeksjonsvann gitt som en enkelt intravenøs tilførsel, og antitumoraktiviteten sammenlignet med aktiviteten av medikamentforbindelsen alene. Resultatet var at medikamentkomplekset fra eksempel 15 viste en bemerkelsesverdig forhøyet antitumoraktivitet og et bredere effektivt doseområde enn medikamentforbindelsen alene.

Analyseforbindelse	Dose (mg/kg)	Inhibisjonsgrad (%)	Antall døde mus/antall anvendte mus
Medikamentforbindelse alene	50	65	0/5
	12,5	51	0/5
Forbindelse fra eksempel 15	7 ¹⁾	98	0/5
	1,75 ¹⁾	97	0/5

¹⁾ Beregnet ut fra medikamentforbindelsen

Eksempel 55

Antitumoraktivitet av medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse

Meth A-tumorbærende mus (6 mus pr. gruppe) ble fremstilt på tilsvarende måte som i eksempel 11, og antitumoraktiviteten av medikamentkomplekset ifølge eksempel 41 ble undersøkt ved enkeltinjeksjoner på tilsvarende måte som i eksempel 12, og antitumoraktiviteten ble sammenlignet med aktiviteten av medikamentforbindelse alene. Resultatet var at medikamentkomplekset ifølge eksempel 41 viste en bemerkelsesverdig forhøyet antitumoraktivitet og et bredere effektivt doseområde enn medikamentforbindelsen alene.

Analyseforbindelse	Dose (mg/kg)	Inhibisjonsgrad (%)
Medikamentforbindelse alene	100	64
	50	56
	25	34
Forbindelse fra eksempel 41	25 ¹⁾	99
	12,5 ¹⁾	95
	6,25 ¹⁾	81
	3,125 ¹⁾	61

¹⁾ Beregnet ut fra medikamentforbindelsen

Eksempel 56**Antitumoraktivitet av medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse**

Meth A-tumorbærende mus (6 mus pr. gruppe) ble fremstilt på tilsvarende måte som i eksempel 11, og antitumoraktiviteten ble undersøkt ifølge en fremgangsmåte som tilsvarende den i eksempel 12 ved en enkel tilførsel av medikamentkompleksene fra eksemplene 29, 43 hhv. 44. Resultatet var at alle medikamentkomplekser viste høy antitumoraktivitet og et bredere effektivt doseområde.

Analyseforbindelse	Dose (mg/kg) ¹⁾	Inhibisjonsgrad (%)
15 Forbindelse fra eksempel 29	30	99
	20	99
	10	89
	5	79
20 Forbindelse fra eksempel 46	100	94
	80	92
	40	82
	20	75
25 Forbindelse fra eksempel 47	100	96
	80	94
	40	97
	20	75

¹⁾ Beregnet ut fra medikamentforbindelsen

Eksempel 57**Farmakokinetikk for medikamentkomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse**

Meth A-tumorbærende mus ble fremstilt på tilsvarende måte som i eksempel 11, medikamentkomplekset ifølge eksempel 15 ble gitt som en enkel tilførsel på tilsvarende måte som i eksempel 12 (10 mg/kg, beregnet som medikamentforbindelse), og endringen i konsentrasjon av medikamentkomplekset i forskjell-

lige vev ble bestemt. Resultatet var at medikamentkomplekset ifølge eksempel 15 viste seg å opprettholde blodnivået i blodet i ekstremt lang tid, høy fordeling i tumorvev, og høy tumorselektivitet sammenlignet med lever og tynntarm. Resultatene er vist i figur 20.

Industriell anvendbarhet

Reaksjonen mellom polysakkaridderivatet med karboksylgrupper og medikamentforbindelsen bundet til "spaceren" eller tilsvarende kan utføres med høy utbytte, og dersom en medikamentforbindelse med en laktonring utsettes for reaksjonen kan bireaksjoner reduseres, og fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er derfor ganske anvendbar som en fremgangsmåte for fremstilling av medikamentkomplekset.

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et medikament-
5 kompleks i hvilket et polysakkaridderivat med karboksylgrupper
og en medikamentforbindelsesrest er sammenbundet ved hjelp av
en "spacer" som omfatter en aminosyre, eller en "spacer" som
omfatter 2 til 8 aminosyrer sammenbundet med peptidbindinger,
eller et medikamentkompleks i hvilket et polysakkaridderivat
10 med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest er
sammenbundet uten bruk av "spacer",
k a r a k t e r i s e r t v e d at et organisk aminsalt av
polysakkaridderivatet med karboksylgruppen omsettes med
medikamentforbindelsen eller "spaceren" bundet til medika-
15 mentforbindelsen i et ikke-vandig system.

2. Fremgangsmåte for fremstilling av et medikament-
kompleks i hvilket et polysakkaridderivat med karboksylgrupper
og en medikamentforbindelsesrest er sammenbundet ved hjelp av
20 en "spacer" som omfatter en aminosyre, eller en "spacer" som
omfatter 2 til 8 aminosyrer sammenbundet med peptidbindinger,
eller et medikamentkompleks i hvilket et polysakkaridderivat
med karboksylgrupper og en medikamentforbindelsesrest er
sammenbundet uten bruk av "spacer",
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter følgende
trinn:

(1) overføring av et alkalimetallsalt av poly-
sakkaridderivatet med karboksylgrupper til et organisk amin-
salt av dette, og

30 (2) omsetning av det organiske aminsalt med medika-
mentforbindelsen eller "spaceren" bundet til medikamentfor-
bindelsen i et ikke-vandig system.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkaridderivatet
med karboksylgruppen er en karboksy-(C₁₋₄)-alkyldekstran-poly-
alkohol.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at dekstranpolyalkoholen
som utgjør karboksy-(C₁₋₄)-alkyldekstranen-polyalkoholen er en
dekstranpolyalkohol erholdt ved å behandle et dekstran under
s betingelser som tillater i det vesentlige fullstendig poly-
alkoholisering.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 3 eller krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at karboksy-(C₁₋₄)-alkyl-
10 dekstran-polyalkoholen er en karboksymetyldekstran-poly-
alkohol.

6. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at medikamentforbindelsen
15 er et antineoplastisk middel eller et antiinflammasjonsmiddel.

7. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at medikamentforbindelsen
er en medikamentforbindelse som kan danne en laktonring.

20 8. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at en medikamentforbind-
else med en dannet laktonring, eller en "spacer" bundet til en
medikamentforbindelse med en dannet laktonring, benyttes for
25 omsetning av det organiske aminsalt med medikamentforbindelsen
eller "spaceren" bundet til medikamentforbindelsen.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at medikamentforbindelsen
30 som kan danne en laktonring ifølge krav 7 er (1S,9S)-1-amino-
9-etyl-5-fluor-2,3-dihydro-9-hydroksy-4-metyl-1H,12H-
benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolozino[1,2-b]kinolin-
10,13(9H,15H)-dion.