NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **305368** (13) B1

(51) Int Cl[6] C 08 B 37/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19921083	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	24.07.1991, PCT/JP91/00995
(22) Inng. dag	19.03.1992	(85) Videreføringsdag	19.03.1992
(24) Løpedag	24.07.1991	(30) Prioritet	24.07.1990, JP, 193816/90
(41) Alm. tilgj.	21.05.1992		24.07.1990, JP, 193817/90
(45) Meddelt dato	18.05.1999		24.07.1990, JP, 193818/90

(73) Patenthaver Seikagaku Kogyo KK (Seikagaku Corp),
1-5, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103, JP

(72) Oppfinner Katsukiyo Sakurai, Tokyo, JP
Nobuo Sugiura, Hashima-gun, Gifu, JP
Koji Kimata, Nagoya-shi, Aichi, JP
Sakaru Suzuki, Nagoya-shi, Aichi, JP

(74) Fullmektig J.K. Thorsens Patentbureau AS, 0134 Oslo

(54) Benevnelse **Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Forbindelse som omfatter et glykosaminglykan kombinert med et fosfolipid eller lipid, og som har en farmakologisk aktivitet ved at den inhiberer kreftmetastase fordi den effektivt kan innhibere adhesjonen av kreftceller til hemangioendoteliocytter eller ekstracellulære matrikser. Forbindelsen er fremstilt ved spalting og oksydasjon av terminalen i et glykosaminglykan til å gi et derivat derav, og hvor den primære aminogruppe i et fosfolipid enten reageres med aldehyd- eller laktongruppen i derivatet eller med karboksylgruppen tilstede i glykosaminglykankjeden, eller den primære aminogruppe i glykosaminglykanderivatet reageres med karboksylgruppen i et fosfolipid- eller lipidderivat. Produktet er ikke giftig og er anvendbart som en kreftmetastaseinhibitor.

Foreliggende oppfinnelse vedrører analogifremgangsmåter for fremstilling av fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner.

Disse og andre trekk ved oppfinnelsen fremgår av patentkravene.

Som en prosedyre for utvikling av metastase er det kjent at en kreftcelle som spres til et blodkar eller lymfebanen fester seg til en endotelcelle eller til dens ekstracellulære matriks (såkalt basismembran) og den således fastholdte kreftcelle trenger inn i den ekstracellulære matriks og utvikler en ny metastaselesjon i vevet. S. Korach et al. (Cancer Research, 46, 3624-3629, 1986) rapporterte f.eks. at de har oppdelt kreftcellene i en høymetastasegruppe og en lavmetastasegruppe og gjennom deres kreftcellekloningsstudier har de gjennomført in vitro adhesjonstester av kreftceller til dyrkede endotelceller, og som et resultat ble det funnet at festing av kreftceller til blodkarendotelceller eller til deres ekstracellulære matrikser var nær beslektet med metastase av kreftceller fordi høymetastasegruppen av kreftceller viste en høy klebrighet mens lavmetastasecellene viste en lav klebrighet.

På den annen side vil en peptidsekvens GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) av celleadhesjonsdelen i fibronektin som er en komponent i den ekstracellulære matriks, på konkurrerende måte inhibere bindingen mellom kreftceller og ekstracellulær matriks. Yamada et al. (Science, 233, 467-470, 1986) rapporterte at peptidet GRGDS inhiberte lungemetastase av B16F10-celler i mus. Disse resultater indikerer at en substans som har en celleadhesjonsinhiberende aktivitet i en liten mengde kunne anvendes som en metastaseinhibitor.

I forbindelse med den foreliggende oppfinnelse har man funnet at visse typer fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner kan inhibere adhesjon av kreftceller til blodkarendotelceller og deres ekstracellulære matrikser, og som et resultat kan de inhibere metastase av kreftceller.

Som vist i tabell 1 er glykosaminglykan et polysakkarid med lang kjede som omfatter gjentatte enheter av disakkarider eller tetrasakkarider inkluderende D-glukosamin eller D-galaktosamin, D-glukuronsyre, L-iduronsyre og/eller D-galaktose. Eksempler på kjente glykosaminglykaner inkluderer hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, chondroitinsulfat C, chondroitinsulfat D, chondroitinsulfat E, chondroitinsulfat K, chondroitinpolysulfat, dermatansulfat, heparin, heparansulfat, keratansulfat og keratanpolysulfat.

TABELL 1

Glykosaminglykan	**Heksosamin**	**Uronsyre**
Hyaluronsyre (MW, 1.000-10.000.000)	GlcNaC	GlcUA
Chondroitin (MW, 1.000-100.000)	GalNAc	GlcUA
Chondroitinsulfat A (MW, 1.000-100.000)	GalNAc (4S)	GlcUA
Chondroitinsulfat C (MW, 1.000-100.000)	GalNAc (6S)	GlcUA
Chondroitinsulfat D (MW, 1.000-100.000)	GalNAc (6S)	GlcUA (2S)
Chondroitinsulfat E (MW, 1.000-100.000)	GalNAc (4S,6S)	GlcUA
Chondroitinsulfat K (MW, 1.000-100.000)	GalNAc (4S)	GlcUA (3S)
Chondroitinpolysulfat (MW, 1.000-150.000)	GalNAc (S)	GlcUA (S)
Dermatansulfat (MW, 1.000-20.000)	GalNAc (4S)	IduUA, GlcUA

forts.

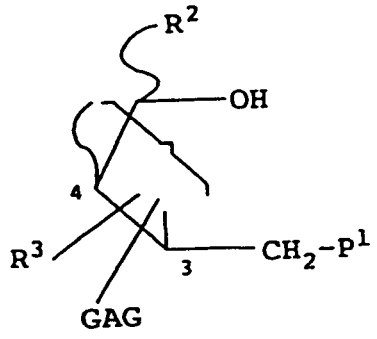
TABELL 1 (forts.)

Glykosaminglykan	Heksosamin	Uronsyre
Heparin (MW, 1.000-20.000)	GlcNS (6S)	GlcUA, IduUA (2S)
Heparansulfat (MW, 1.000-20.000)	GlcNS (NAc,S)	GlcUA, IduUA (2S)
Keratansulfat (MW, 1.000-20.000)	GlcNAc (6S)	Gal
Keratanpolysulfat (MW, 1.000-20.000)	GlcNAc (6S)	Gal (6S)

GlcNAc:	N-acetyl-D-glukosamin
GalNAc:	N-acetyl-D-galaktosamin
GlcNS:	D-glukosamin-N-sulfat
GlcUA:	D-glukuronsyre
IduUA:	L-iduronsyre
Gal:	D-galaktose
S:	O-sulfat

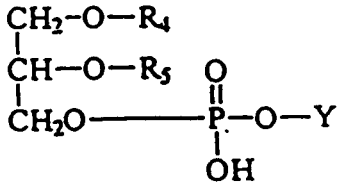
Fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan anvendes som et salt, foretrukket med et alkalimetall som natrium, kalium eller lignende, et jordalkalimetall som kalsium, magnesium eller lignende, og et amin som trialkylamin, pyridin eller lignende.

Foreliggende oppfinnelse vedrører således en analogi-fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



(I)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)



(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\underset{COOH}{|}}{C}HNH-$, og

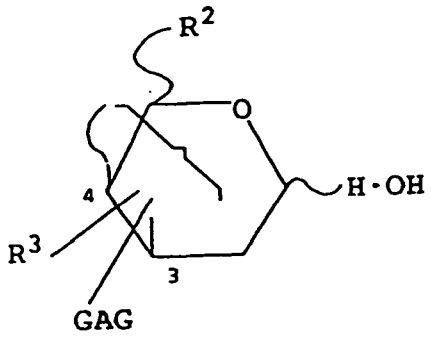
(1) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat eller heparin med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel eller når GAG er en glykosaminglykanrest av dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

2) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat K eller chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

3) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OH-gruppe, og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel, og

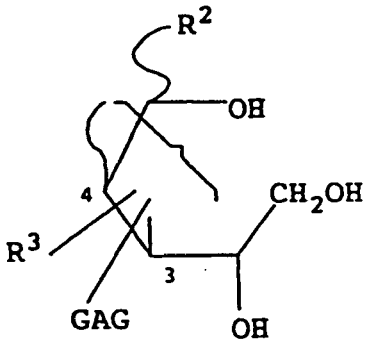
4) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel; eller et farmasøytisk tålbart salt derav som er kjennetegnet ved trinnene med:

reduksjon og spalting av den reduserende terminale gruppe i et glykosaminglykan med formelen (I-1):



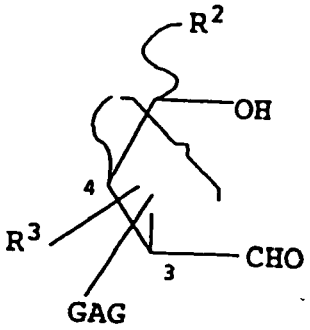
(I-1)

med oppnåelse av et redusert produkt med formelen (I-2):



(I-2)

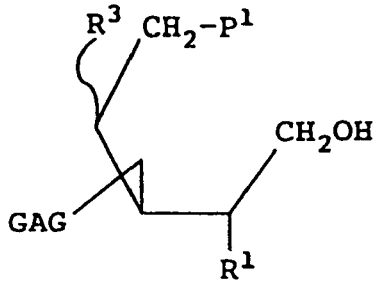
hvoretter det reduserte produkt oksyderes for å oppnå et oksydert produkt med formelen (I-3):



(I-3)

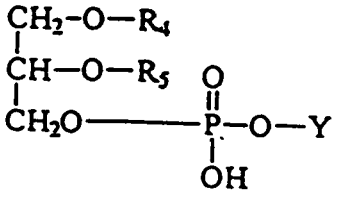
og hvoretter den således dannede aldehydgruppe i det oksyderte produkt får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, hvori GAG, R^2 og R^3 i de ovennevnte formler er som angitt i det foregående, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til farmasøytisk tålbart salt derav.

Oppfinnelsen vedrører også en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



(II)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)



(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\underset{COOH}{|}}{C}HNH-$, og

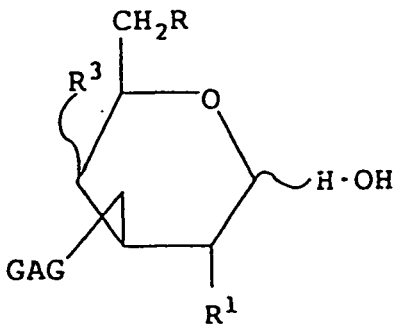
1) R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre eller chondroitin med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

2) R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat A eller K, chondroitinpolysulfat eller dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel, og

3) hver av R^1 og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat eller keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel;

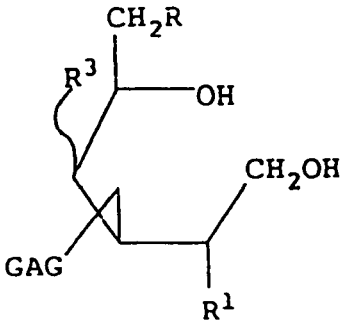
eller et farmasøytisk tålbart salt derav, som er kjennetegnet ved trinnene med:

reduksjon og spalting av den reduserende terminale gruppe i et glykosaminglykan med formelen (II-1):



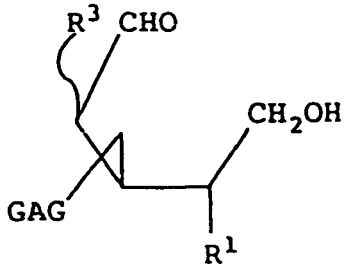
(II-1)

med oppnåelse av et redusert produkt med formelen (II-2):



(II-2)

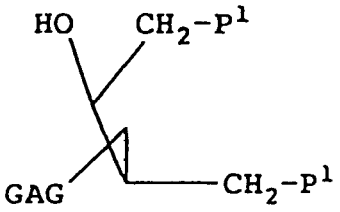
hvoretter det reduserte produkt oksyderes for å oppnå et oksydert produkt med formelen (II-3):



(II-3)

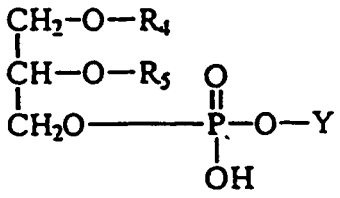
og hvoretter den således dannede aldehydgruppe i det oksyderte produkt får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, hvori GAG, R^1 og R^3 i de ovennevnte formler er som angitt i det foregående og R er en OH- eller OSO_3H-gruppe, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

Oppfinnelsen vedrører også en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



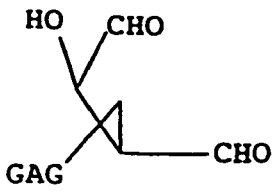
(III)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)



(IX)

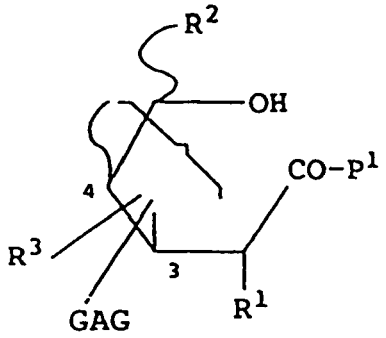
hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\underset{COOH}{|}}{C}HNH-$, og GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat eller keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel; eller et farmasøytisk tålbart salt derav, som er kjennetegnet ved at den omfatter trinnene med: oksydasjon av det reduserte produkt med den ovenfor angitte formel (II-2) for å oppnå et oksydert produkt med formelen (11):



(11)

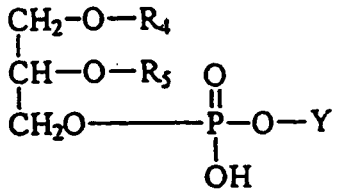
hvori GAG er som angitt i det foregående og hvoretter den således dannede aldehydgruppe i det oksyderte produkt får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

Oppfinnelsen vedrører også en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



(IV)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)



(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{C}}HNH-$, og

1) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en OH-gruppe, R^2 er en COOH-gruppe, og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin eller heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel eller når GAG er en glykosaminglykanrest av dermatansulfat, med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

2) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en OSO_3H-gruppe, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat D med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel eller når GAG er en glykosaminglykanrest av heparin eller heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

3) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en OH-gruppe, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat K med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

4) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, minst en av R^1 og R^3 er en OSO_3H-gruppe, mens den andre er en OH-gruppe, og R^2 er en COOH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

5) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, hver av R^1 og R^3 er en OH-gruppe og R^2 er en CH_2OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel,

6) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, hver av R^1 og R^3 er en OH-gruppe og R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel,

7) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre eller chondroitin med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

8) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat A eller K, eller dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

9) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat C eller D med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

10) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R_2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av

chondroitinsulfat E med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

11) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe, eller R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe eller en OSO_3H-gruppe, når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

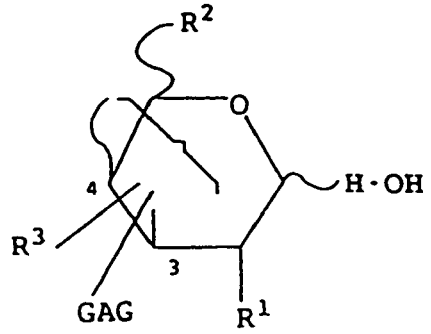
12) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en $NHSO_3H$-gruppe, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av heparin med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

13) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe eller en $NHSO_3H$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe, og R^3 er en OSO_3H-gruppe, eller R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe eller en OSO_3H-gruppe, når GAG er en glykosaminglykanrest av heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel, og

14) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe, og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat eller keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

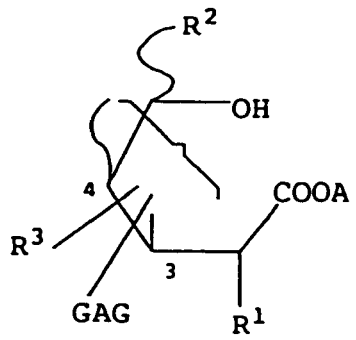
eller et farmasøytisk tålbart salt derav, som er kjennetegnet ved at den omfatter trinnene med:

oksydasjon og spalting av den reduserende terminale gruppe i et glykosaminglykan med formelen (12):



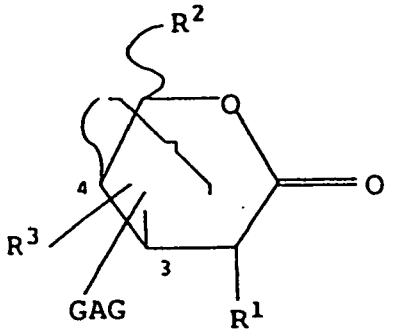
(12)

for derved å oppnå et oksydert produkt med formelen (13):



(13)

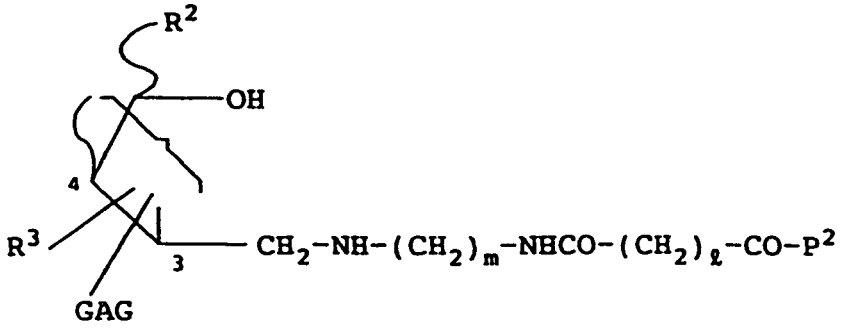
og hvoretter det fra det oksyderte produkt fremstilles et lakton med formelen (14):



(14)

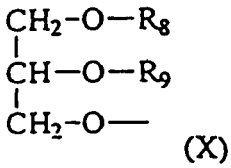
og hvoretter det således fremstilte lakton får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, hvori GAG, R^1, R^2 og R^3 i de ovennevnte formler er som angitt i det foregående og A er et alkalimetall, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

Oppfinnelsen vedrører også en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan med formelen

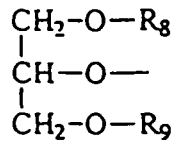


(V)

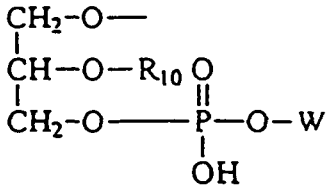
hvori P^2 er et fosfolipid eller et lipid med formelen (X), (XI), (XII) eller (XIII)



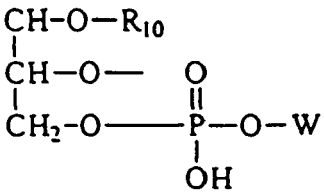
(X)



(XI)



(XII)



(XIII)

hvori R_8 er hydrogen, R_9 er en alkylgruppe, R_{10} er $-CH=CHR_6$ eller $-COR_7$, hvori hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe og W er $-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ eller en inositolrest, m er et helt tall fra 1 til 8, og ℓ er et helt tall fra 1 til 10, og

1) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin eller heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel, eller når GAG er en glykosaminglykanrest av dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

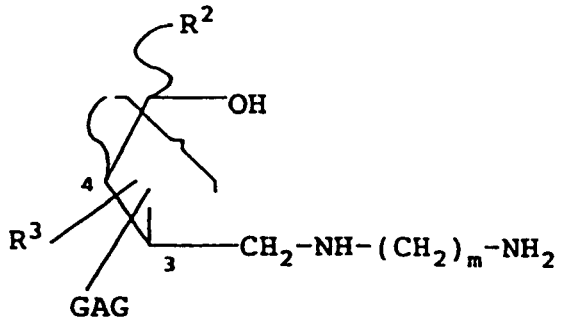
2) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat K eller chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

3) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel, og

4) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel,

eller et farmasøytisk tålbart salt derav, som er kjennetegnet ved at den omfatter trinnene med:

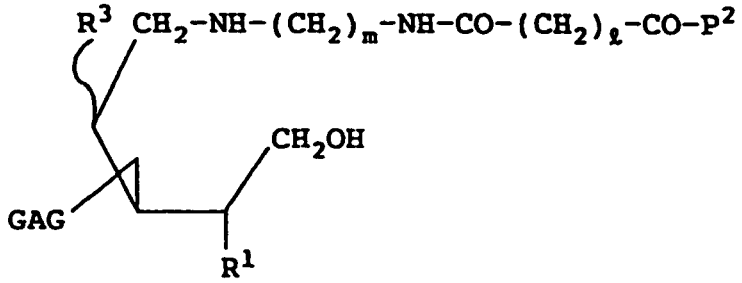
reaksjon av en aldehydforbindelse med formelen (I-3) som angitt i krav 1 med et alkylendiamin for oppnåelse av et derivat med formel (15):



(15)

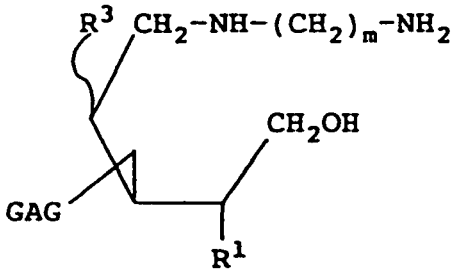
hvori GAG, R^2, R^3 og m er som angitt i det foregående, og hvor et fosfolipid eller et lipid separat får reagere med en dikarboksylsyre eller et dikarboksylsyreanhydrid for å oppnå et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe, og hvor en primær aminogruppe i derivatet med formel (15) får reagere med karboksylgruppen i fosfolipid- eller lipidderivatet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

Oppfinnelsen vedrører også en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan med formelen



(VI)

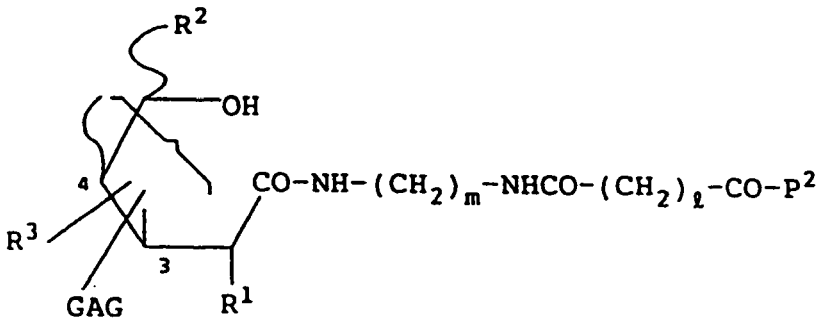
hvori GAG, R^1 og R^3 er som angitt i forbindelse med den ovennevnte formel (II), og m, ℓ og P^2 er som angitt i forbindelse med den ovennevnte formel (V),
eller et farmasøytisk tålbart salt derav,
som er kjennetegnet ved trinnene med:
reaksjon av en aldehydforbindelse med formel (II-3) som angitt i det foregående med et alkylendiamin med oppnåelse av et derivat med formel (16):



(16)

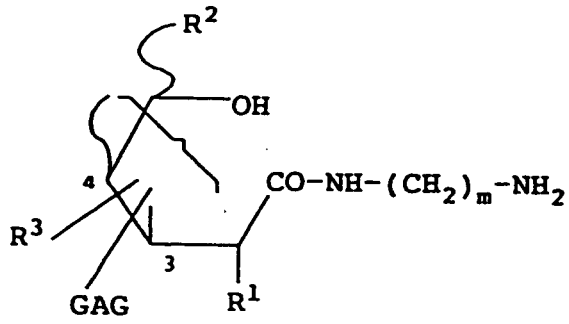
hvori GAG, R^1, R^3 og m er som angitt i det foregående, og hvor et fosfolipid eller et lipid separat får reagere med en dikarboksylsyre eller et dikarboksylsyreanhydrid for å oppnå et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe, og hvoretter en primær aminogruppe i derivatet med formel (16) får reagere med karboksylgruppen i fosfolipid- eller lipid-derivatet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

Oppfinnelsen vedrører også en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan med formel



(VII)

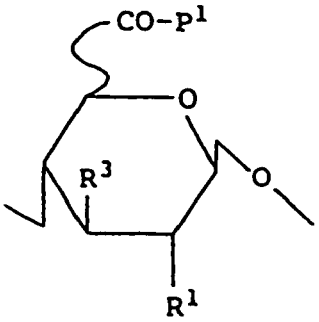
hvori GAG, R^1, R^2 og R^3 er som angitt i forbindelse med den ovennevnte formel (IV), og m, ℓ og P^2 er som angitt i forbindelse med den ovennevnte formel (V),
eller et farmasøytisk tålbart salt derav,
som er kjennetegnet ved trinnene med:
reaksjon av en laktonforbindelse med den ovennevnte formel (14) med et alkylendiamin for oppnåelse av et derivat med formel (17):



(17)

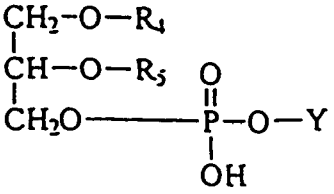
hvori GAG, R^1, R^2, R^3 og m er som angitt i det foregående, og hvor et fosfolipid eller lipid separat får reagere med en dikarboksylsyre eller et dikarboksylsyreanhydrid for å oppnå et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe, og hvorpå en primær aminogruppe i derivatet med formel (17) får reagere med karboksylgruppen i fosfolipid- eller lipid-derivatet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

Endelig vedrører oppfinnelsen en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med en uronsyredel med formel (VIII)



(VIII)

hvor P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formel (IX)

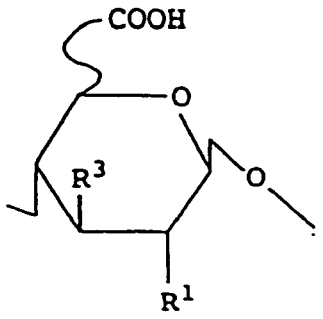


(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller $-COR_7$ (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH-$ eller

$-CH_2CHNH-$, og R_1 og R_3 er uavhengig en OH-gruppe
|
COOH

eller en OSO_3H-gruppe,
eller et farmasøytisk tålbart salt derav, som er kjennetegnet ved trinnene med:
reaksjon av et glykosaminglykan med en uronsyredel med formel (18)



(18)

hvori R^1 og R^3 er som angitt i det foregående,
med en primær aminogruppe i fosfolipidet i nærvær av et kondensasjonsmiddel, eller
aktivering av en karboksylgruppe i glykosaminglykanet med formel (18) hvorpå den aktiverte karboksylgruppe i glykosaminglykanet deretter får reagere med en primær aminogruppe i fosfolipidet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

De foretrukne molekylvekter for glykosaminglykaner er angitt i tabell 1.

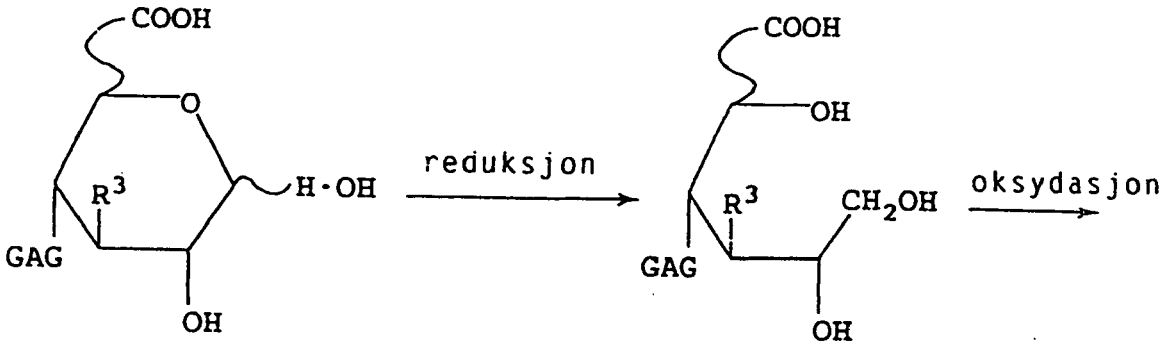
Fosfolipidet med en primær aminogruppe representert ved P^1 i de ovennevnte formler (I), (II), (III), (IV) og (VIII) har den ovenfor angitte formel (IX), og særlig foretrukne forbindelser med formel (IX) er dem hvori hver av R^4 og R^5 er $-COR^7$ som heksadekanoyl eller oktadekanoyl eller hvori R^4 er en $-CH=CHR^6$-gruppe og R^5 er en $-COR^7$-gruppe.

Fremgangsmåtene for fremstilling av de fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner i samsvar med oppfinnelsen er beskrevet mer detaljert i det etterfølgende.

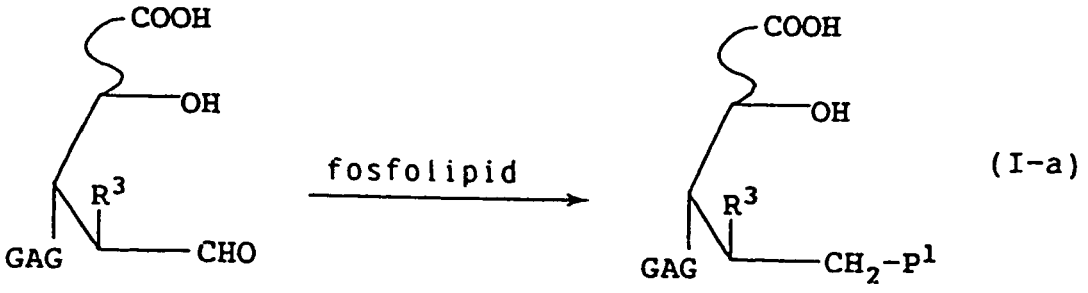
Begrenset oksydasjon av reduserende terminal gruppe

I denne fremgangsmåte blir den reduserende terminale uronsyre-, galaktose- eller heksosamindel i et glykosaminglykan delvis oksydert og spaltet til å danne en aldehydgruppe, og den således dannede aldehydgruppe underkastes en reduktiv alkyleringsreaksjon med en primær aminogruppe i et fosfolipid til å gi et fosfolipidbundet glykosaminglykan. Reaksjonsskjemaet for denne fremgangsmåte er beskrevet i det etterfølgende.

(A) I det tilfellet hvor glukuron- eller iduronsyre i et reduserende terminalt sukker underkastes reaksjonen:



(1) (2)



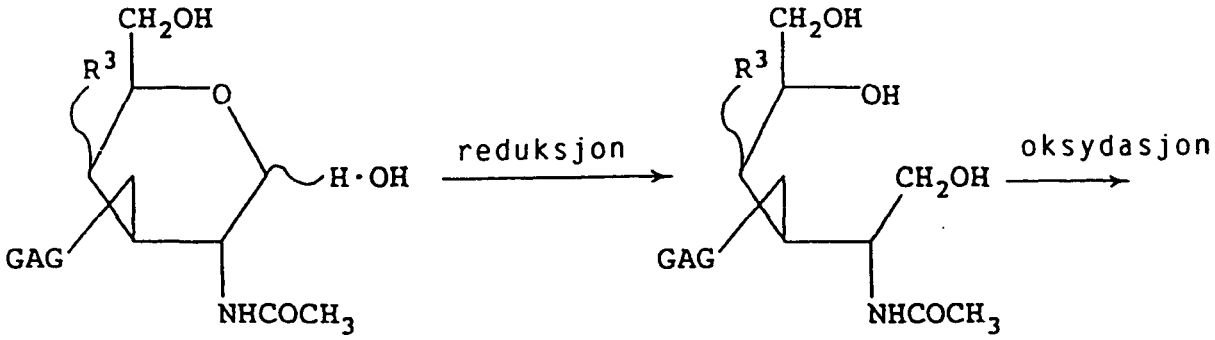
(3) (I-a)

hvori R^3 er som angitt i det foregående og P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe.

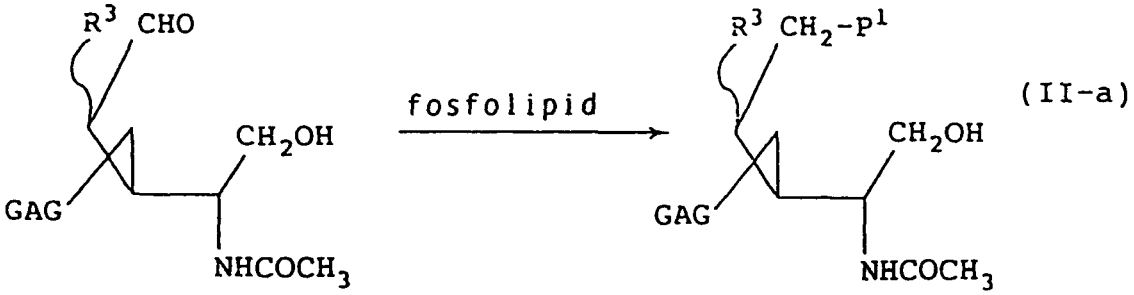
I det tilfellet hvor det som utgangsmaterial anvendes hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, chondroitinsulfat C, chondroitinsulfat E, chondroitinsulfat K, chondroitinpolysulfat, dermatansulfat og heparin, representert ved formelen (1) med den reduserende terminale D-glukuronsyre eller L-iduronsyre hvori OH-gruppen er bundet

til karbonatomet i 2-stillingen, fremstilles et fosfolipid-bundet glykosaminglykan med formelen (I-a) i overensstemmelse med det ovennevnte reaksjonsskjema.

(B) I det tilfellet at glukosamin eller galaktosamin i et reduserende terminalt sukker underkastes reaksjonen:



(4) (5)

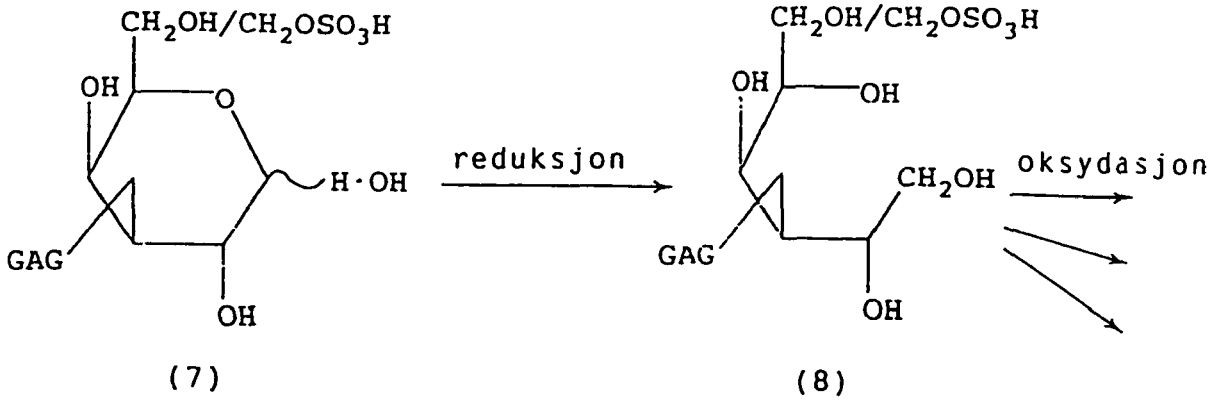


(6) (II-a)

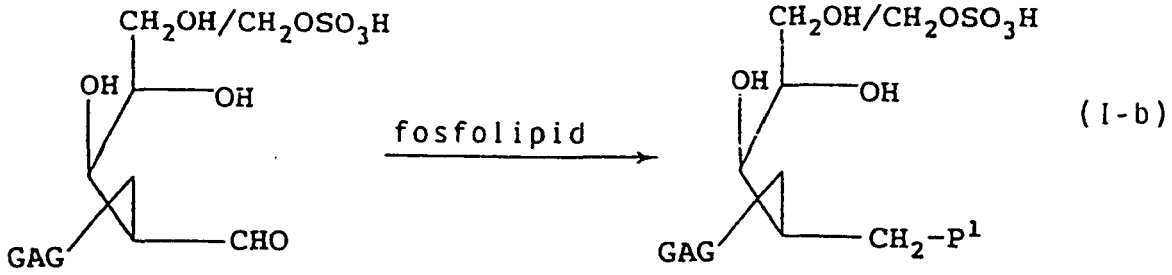
hvori R^3 er som definert i det foregående og P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe.

I det tilfellet at det som utgangsmaterial anvendes hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, chondroitinsulfat K, chondroitinpolysulfat og dermatansulfat, representert ved formelen (4) med glukosamin eller galaktosamin som den reduserende terminale gruppe hvori en CH_2OH-gruppe er bundet til karbonatomet i 5-stillingen, dannes et fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen (II-a) i overensstemmelse med det ovennevnte reaksjonsskjema.

(C) I det tilfellet at galaktose i et reduserende terminalt sukker underkastes reaksjonen:

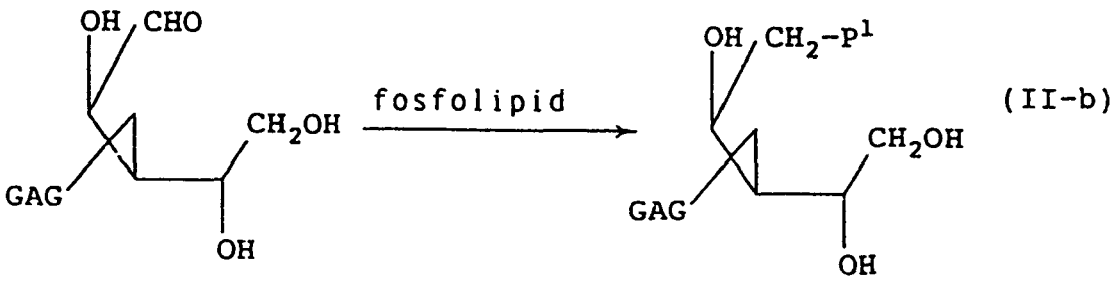


(7) (8)



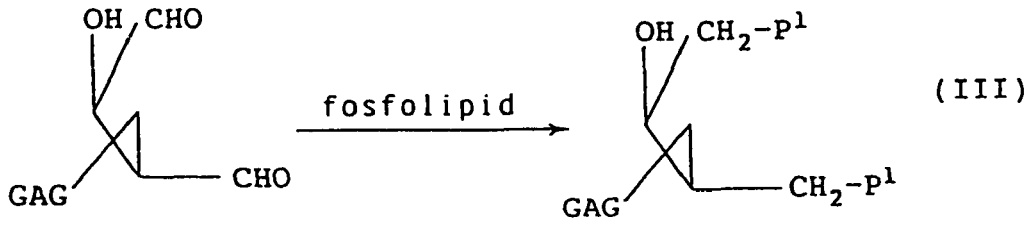
(I-b)

(9)



(II-b)

(6)



(III)

(11)

hvori R^3 er som angitt i det foregående og P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe.

I det tilfellet at det anvendes keratansulfat og keratan-polysulfat som er representert ved den ovennevnte formel (7)

med galaktose som det reduserende terminale sukker som utgangsmaterial, dannes et fosfolipidbundet glykosaminglykan med formler (I-b), (II-b) eller (III) i overensstemmelse med ovennevnte reaksjonsskjema.

I de ovennevnte fremgangsmåter (A), (B) og (C) blir de reduserende terminale sukkerenheter av glykosaminglykaner med formel (1), (4) og (7) først underkastet reduksjonsspalting for å oppnå de tilsvarende forbindelser (2), (5) og (8).

Som et reduksjonsmiddel i reduksjonstrinnet kan det anvendes et alkalisalt av borhydrid som natriumborhydrid, natrium-cyanoborhydrid eller lignende.

Som løsningsmiddel i den ovennevnte reduksjonsreaksjon kan det anvendes vann eller en 0,05 % boratbuffer (pH 8,3).

Reduksjonsreaksjonen kan gjennomføres ved en temperatur fra 10 til 30°C, foretrukket fra 15 til 25°C.

Mengden reduksjonsmiddel som varierer avhengig av typen strekker seg fra 5 til 50 ekvivalenter, foretrukket fra 25 til 30 ekvivalenter, pr. mol av forbindelsen (1), (4) eller (7).

De således oppnådde forbindelser med formel (2), (5) og (8) underkastes deretter partiell oksydasjon til å danne aldehyd-forbindelser med formel (3), (6), (9), (10) og (11).

Som oksydasjonsmiddel i oksydasjonsreaksjonen kan det anvendes et alkalisalt av en perjodsyre som natriumperjodat, kaliumperjodat eller lignende.

Mengden oksydasjonsmiddel strekker seg fra 1 til 10 ekvivalenter, foretrukket fra 3 til 6 ekvivalenter, pr. mol av forbindelsen (2), (5) eller (8). Oksydasjonsreaksjonen kan gjennomføres ved en temperatur fra 0 til 10°C, foretrukket fra 0 til 4°C.

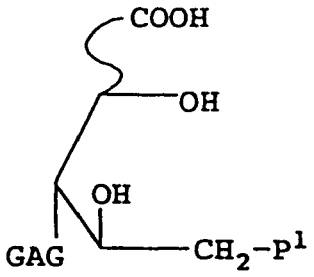
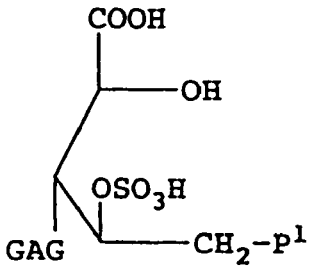
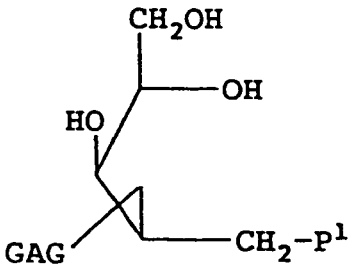
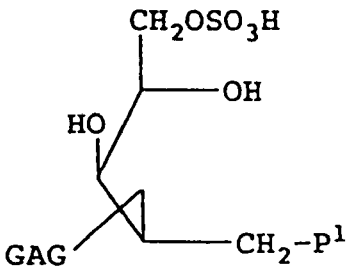
Hver av de således dannede aldehydforbindelser (3), (6), (9), (10) og (11) kan reageres med en primær aminogruppe av et fosfolipid i overensstemmelse med den kjente reduktive alkylering. Således oppnås de fosfolipidbundne glykosaminglykaner som er representert ved formlene (I-a), (II-a), (I-b), (II-b) og (III).

Eksempler på fosfolipid som kan anvendes i den ovennevnte reaksjon inkluderer L-(α-fosfatidyl)etanolamin, DL-fosfatidyl-L-serin, etanolaminplasmalogen, serinplasmalogen og lignende.

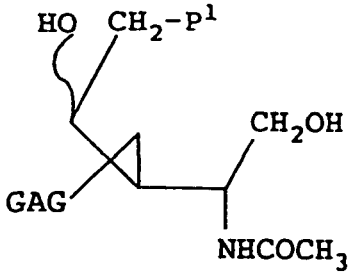
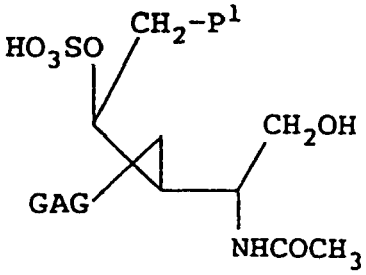
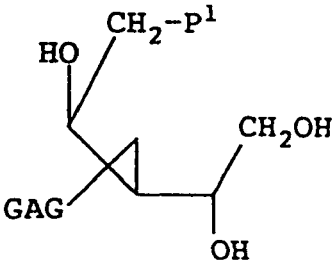
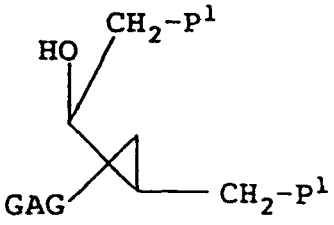
Den reduktive alkyleringsreaksjon for fremstilling av forbindelsene med formler (I-a), (II-a), (I-b), (II-b) og (III) kan gjennomføres ved at aldehydforbindelsen (3), (6), (9), (10) eller (11) blandes med et fosfolipid oppløst i kloroform eller lignende, i et løsningsmiddel som vann, 0,05 M fosfatbuffer (pH 7,0) eller dimetylformamid og hvor reaksjonsblandingen får reagere ved en temperatur fra 15 til 60°C, idet man samtidig eller påfølgende gjennomfører en reduksjonsreaksjon ved anvendelse av et reduksjonsmiddel som natriumcyanoborhydrid eller lignende.

Eksempler på forbindelser som fremstilles ved den begrensede oksydasjon av reduserende terminal gruppe er vist i tabell A.

TABELL A

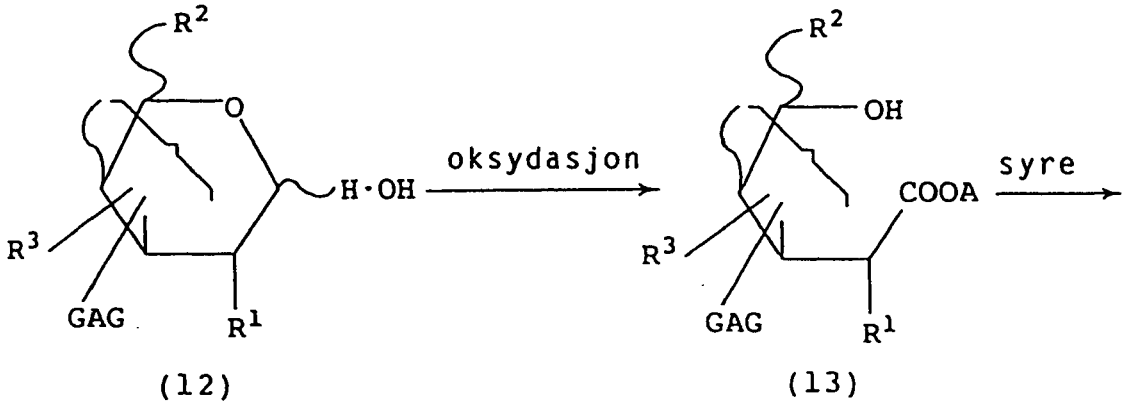
Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
I-(1)		hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin, heparansulfat
I-(2)		chondroitinsulfat K, chondroitinpolysulfat
I-(3)		keratansulfat
I-(4)		keratanpolysulfat

TABELL A (forts.)

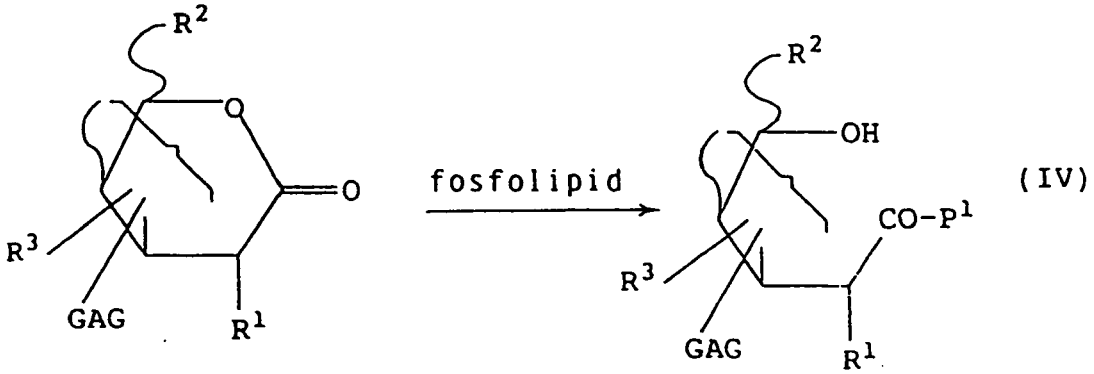
Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
II-(1)		hyaluronsyre, chondroitin
II-(2)		chondroitinsulfat A eller K, chondroitinpolysulfat, dermatansulfat
II-(3)		keratansulfat, keratanpolysulfat
III		keratansulfat, keratanpolysulfat

Laktonisering av reduserende terminal gruppe

I denne fremgangsmåte blir den reduserende terminale uronsyre-, galaktose- eller heksosamindel i et glykosaminglykan underkastet oksydasjon for å spalte den reduserende terminale sukkerenhet og det spaltede produkt laktoniseres og reageres med en primær aminogruppe i et fosfolipid for å oppnå et fosfolipidbundet glykosaminglykan. Reaksjonsskjemaet er illustrert i det etterfølgende.



(12) (13)



(14) (IV)

hvori R^1, R^2 og R^3 er som angitt i det foregående, P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe og A er et alkalimetall.

I henhold til denne fremgangsmåte blir et glykosaminglykan med formel (12) først underkastet oksydasjon for å spalte den reduserende terminale enhet for derved å oppnå en karboksylforbindelse med formel (13).

Som utgangsmaterial kan det anvendes forbindelser med formel (12) inkluderende hyaluronsyre, chondroitin, chondroitin-

sulfat A, chondroitinsulfat C, chondroitinsulfat D, chondroitinsulfat E, chondroitinsulfat K, chondroitinpolysulfat, dermatansulfat, heparin, heparansulfat, keratansulfat og keratanpolysulfat.

Som oksydasjonsmiddel kan jod, brom eller lignende anvendes i oksydasjonstrinnet.

Mengden oksydasjonsmiddel strekker seg fra 2 til 20 ekvivalenter, foretrukket fra 5 til 15 ekvivalenter, pr. mol av forbindelsen med formel (12).

Som løsningsmiddel for anvendelse i oksydasjonsreaksjonen kan vann eller en 0,05 M fosfatbuffer (pH 7,0) anvendes.

Oksydasjonsreaksjonen kan gjennomføres ved en temperatur fra 0 til 40°C, foretrukket fra 15 til 20°C.

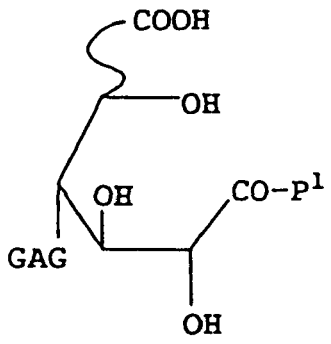
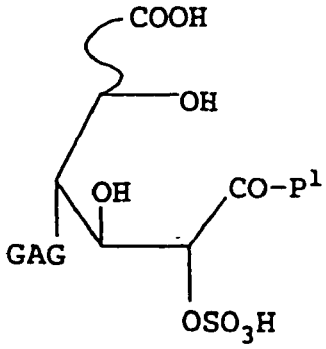
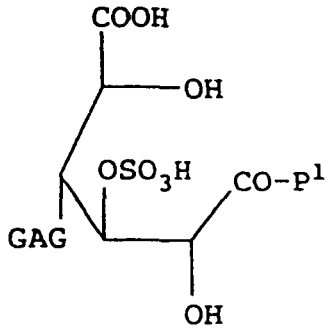
Den således oppnådde forbindelse med formel (13) underkastes deretter en syrebehandling til å danne en laktonforbindelse med formel (14).

En sterk sur kationbytterharpiks som Dowex 50, Amberlite IR 120 eller lignende kan anvendes i syrebehandlingen. Den således dannede laktonforbindelse med formel (14) får deretter reagere med et fosfolipid for å danne et fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen (IV).

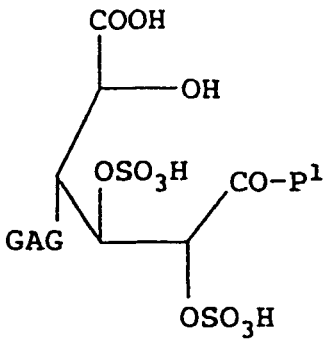
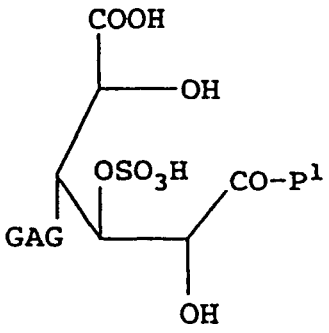
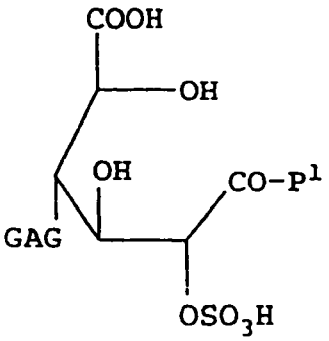
De samme fosfolipidforbindelser som beskrevet i den foregående oksydasjonsprosess kan anvendes i dette reaksjonstrinn. Reaksjonen av laktonforbindelsen med formel (14) med fosfolipid for fremstilling av forbindelsen med formel (IV) kan gjennomføres ved at laktonforbindelsen med formel (14) oppløses i et løsningsmiddel som vann, 0,05 M fosfatbuffer (pH 7,0) eller dimetylformamid hvorpå oppløsningen blandes med et fosfolipid som er oppløst i kloroform eller lignende, og hvoretter blandingen får reagere ved en temperatur fra 5 til 80°C, foretrukket fra 30 til 60°C.

Eksempler på forbindelser som er fremstilt ved denne fremgangsmåte for laktonisering av den reduserende terminale gruppe er vist i tabell B.

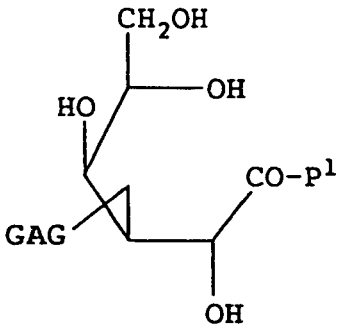
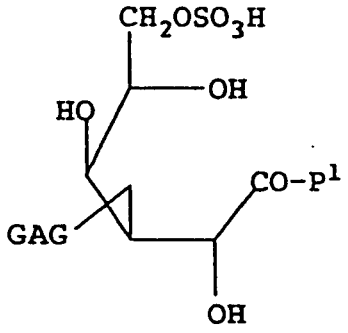
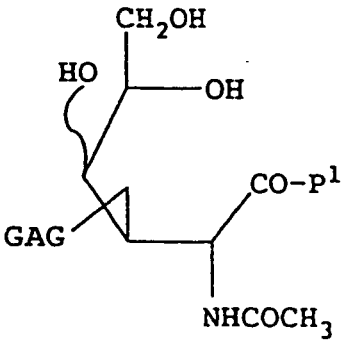
TABELL B

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(1)		hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin, heparansulfat
IV-(2)		chondroitinsulfat D, heparin, heparansulfat
IV-(3)		chondroitinsulfat K

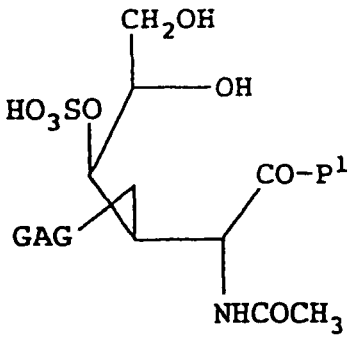
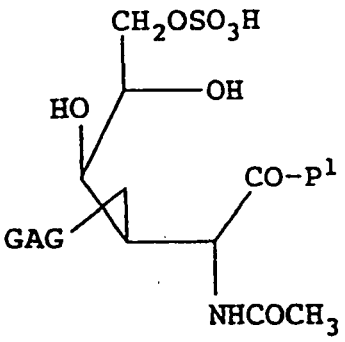
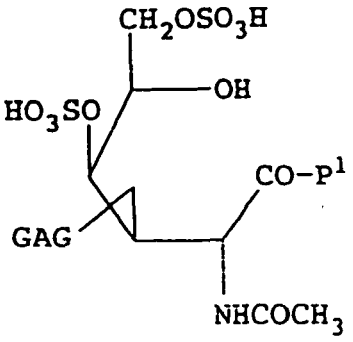
TABELL B (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(4)-a		chondroitinpolysulfat
IV-(4)-b		chondroitinpolysulfat
IV-(4)-c		chondroitinpolysulfat

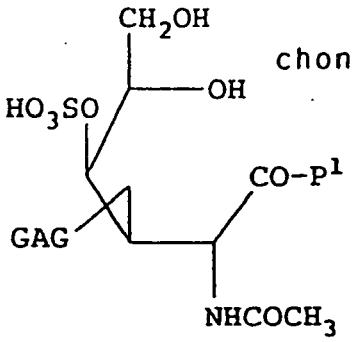
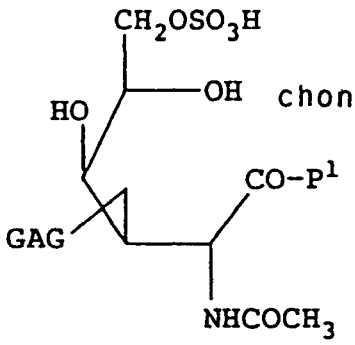
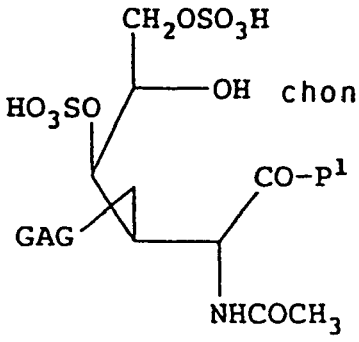
TABELL B (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(5)		keratansulfat
IV-(6)		keratanpolysulfat
IV-(7)		hyaluronsyre, chondroitin

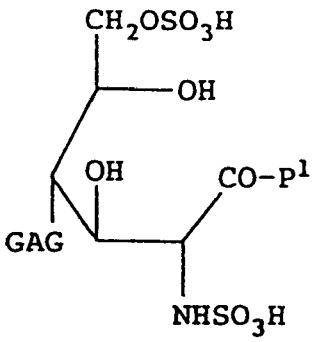
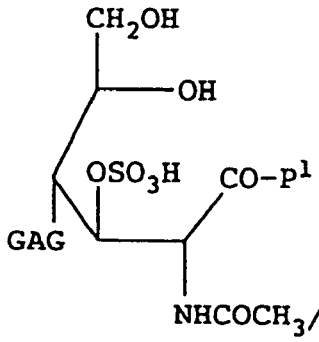
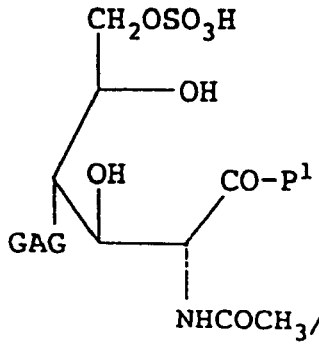
TABELL B (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(8)		chondroitinsulfat A eller K, dermatansulfat
IV-(9)		chondroitinsulfat C eller D
IV-(10)		chondroitinsulfat E

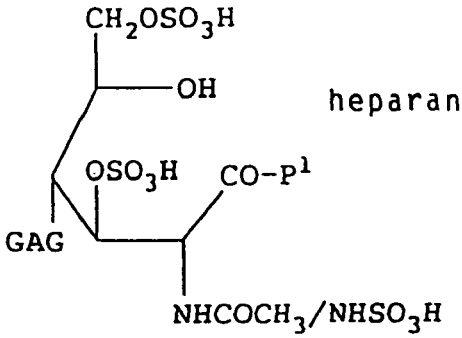
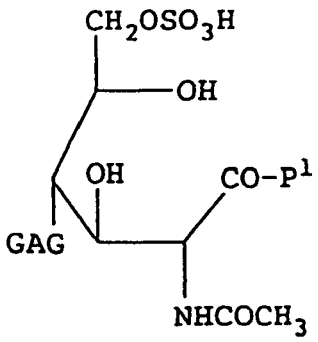
TABELL B (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(11)-a		chondroitinpolysulfat
IV-(11)-b		chondroitinpolysulfat
IV-(11)-c		chondroitinpolysulfat

TABELL B (forts.)

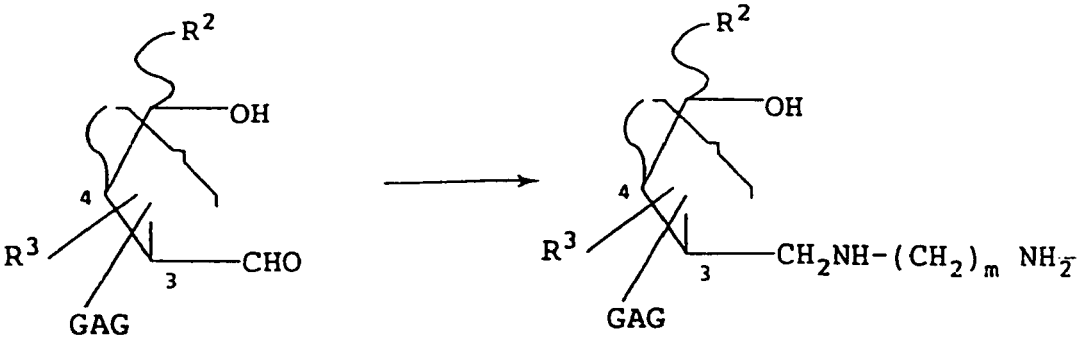
Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(12)		heparin
IV-(13)-a		heparansulfat
IV-(13)-b		heparansulfat

TABELL B (forts.)

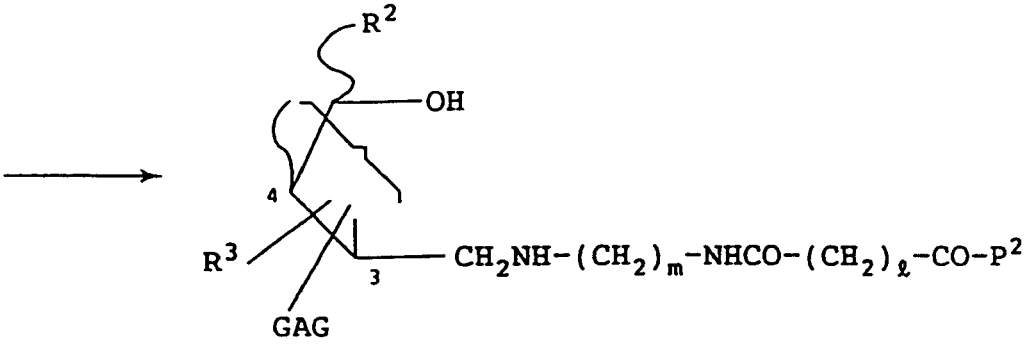
Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(13)-c		heparansulfat
IV-(14)		keratansulfat, keratanpolysulfat

Amidering av reduserende terminal gruppe

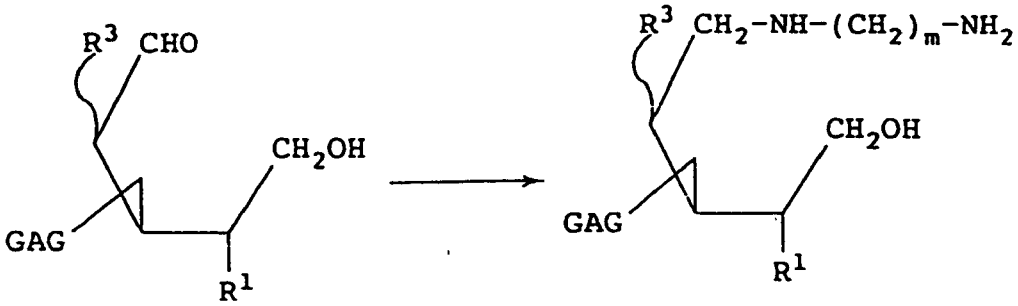
I denne fremgangsmåte får hver av aldehydforbindelsene med formler (3), (6), (9) og (10) og laktonforbindelsen med formel (14) reagere med en alkylendiaminforbindelse til å gi et glykosaminglykanderivat med en primær aminogruppe i dets reduserende terminale gruppe. Det således oppnådde glykosaminglykanderivat med en primær aminogruppe får deretter reagere med et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe slik at den primære aminogruppe og karboksylgruppen bindes sammen. Det dannes således et fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan. Reaksjonsskjemaet for denne fremgangsmåte er vist i det etterfølgende:


R2
OH
4
R3
3
CHO
GAG
CH2NH-(CH2)m NH2

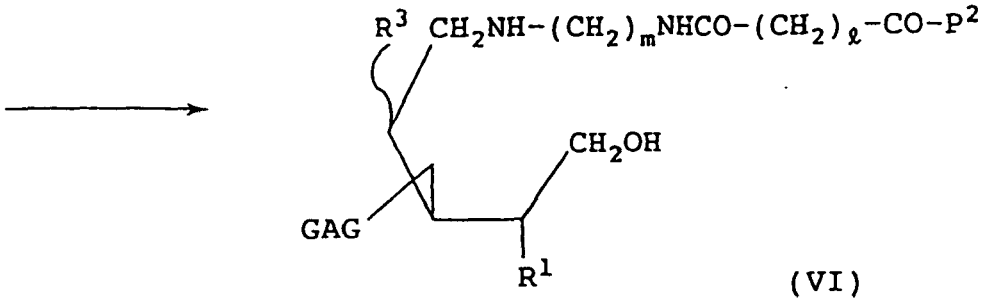
(3)(9) (15)


R2
OH
4
R3
3
CH2NH-(CH2)m-NHCO-(CH2)ℓ-CO-P2
GAG

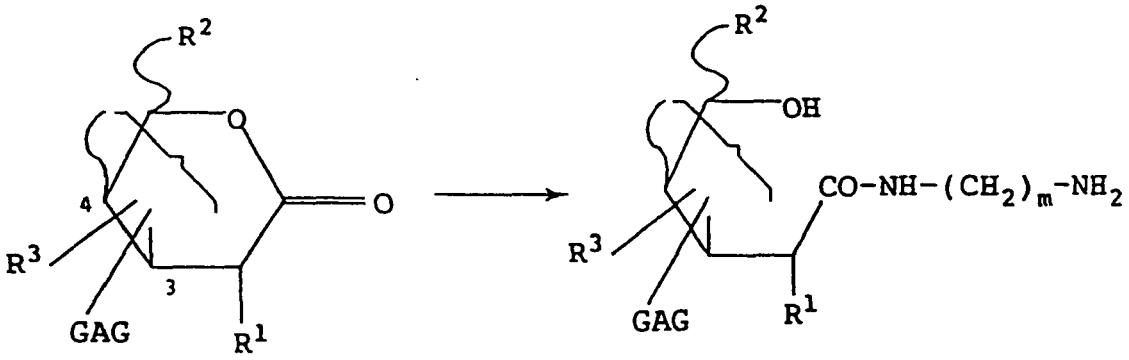
(V)


R3
CHO
CH2OH
GAG
R1
CH2-NH-(CH2)m-NH2

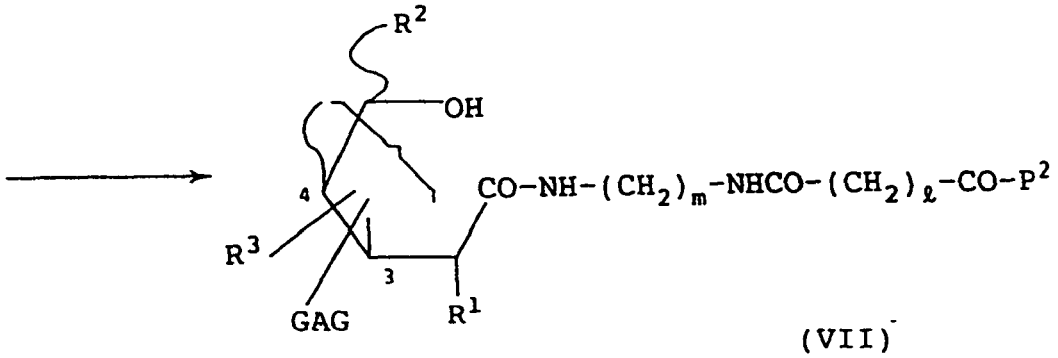
(6)(10) (16)


R3
CH2NH-(CH2)mNHCO-(CH2)ℓ-CO-P2
CH2OH
GAG
R1

(VI)


R2
O
O
4
R3
3
GAG
R1
R2
OH
CO-NH-(CH2)m-NH2
R3
GAG
R1

(14) (17)


R2
OH
CO-NH-(CH2)m-NHCO-(CH2)ℓ-CO-P2
4
R3
3
GAG
R1

(VII)

hvori hver av R^1, R^2 og R^3 er som angitt i det foregående og P^2 er et fosfolipid eller et lipid.

Et glykosaminglykanderivat med en primær aminogruppe i dets reduksjonsterminus, som representert ved formel (15), (16) eller (17) oppnås ved at hver at forbindelsene (3), (6), (9) og (10) fremstilles ved den ovennevnte begrensede reduserende terminale oksydasjonsprosess og forbindelsen (14) som fremstilt ved den ovennevnte reduserende terminale laktoniseringsprosess får reagere med en alkylendiaminforbindelse i nærvær av et reduksjonsmiddel.

En alkylendiaminforbindelse som kan anvendes i denne reaksjon kan velges fra forbindelser som er representert ved formelen:

$$NH_2\text{-}(CH_2)_m\text{-}NH_2$$

hvori m er et helt tall fra 1 til 8.

Som reduksjonsmiddel kan natriumcyanoborhydrid eller lignende anvendes.

Mengden av reduksjonsmiddel strekker seg fra 10 til 100 mol pr. mol av det glykosaminglykan som skal anvendes i reaksjonssystemet.

Som reaksjonsløsningsmiddel kan vann eller en 0,05 M fosfatbuffer anvendes. Reaksjonen kan gjennomføres ved en temperatur fra 0 til 60°C, foretrukket fra 4 til 25°C.

Et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe kan oppnås ved at en fosfolipid- eller lipidforbindelse med en hydroksylgruppe i sin glyserolstruktur får reagere med en dikarboksylsyre eller et dikarboksylsyreanhydrid.

Eksempler på fosfolipid- eller lipidforbindelsen som kan anvendes i denne reaksjon inkluderer monoacylglyserol, diacylglyserol, lysofosfatidylcholin, lysofosfatidylinositol, eterlipider, eterfosfolipider og lignende.

Som dikarboksylsyre kan ravsyre, glutarsyre, adipinsyre eller lignende anvendes. Som dikarboksylsyreanhydrid kan maleinsyreanhydrid, ravsyreanhydrid, fumarsyreanhydrid eller lignende anvendes.

Som kondensasjonsmiddel kan 1-etyl-3-(dimetylaminopropyl)karbodiimid, dicykloheksylkarbodiimid eller lignende anvendes. Kloroform, acetanilid, dimetylformamid eller lignende kan anvendes som reaksjonsløsningsmiddel.

Reaksjonstemperaturen kan strekke seg fra 0 til 60°C når en dikarboksylsyre anvendes i nærvær av et kondensasjonsmiddel, eller fra 20 til 80°C når et dikarboksylsyreanhydrid anvendes.

Reaksjonen mellom et glykosaminglykanderivat med en primær aminogruppe i sin reduserende terminale gruppe med et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe, kan gjennomføres ved at en karboksylgruppe i fosfolipid- eller lipidderivatet først aktiveres i overensstemmelse med vel kjente metoder innen peptidkjemi hvoretter den således aktiverte forbindelse får reagere med glykosaminglykanderivatet.

Aktivering av en karboksylgruppe i fosfolipid- eller lipidderivatet kan gjennomføres ved at karboksylgruppen omdannes til en aktiv ester ved reaksjon av fosfolipid- eller lipidderivatet med N-hydroksysuccinimid, p-nitrofenol, N-hydroksybenzotriazol, N-hydroksypiperidin, N-hydroksysuccinamid, 2,4,5-triklorfenol eller lignende i nærvær av et kondensasjonsmiddel.

Som reaksjonsløsningsmiddel kan kloroform, acetonitril, dimetylformamid eller lignende, eller en blanding derav anvendes. Som kondensasjonsmiddel kan 1-etyl-3-(dimetylaminopropyl)karbodiimid, dicykloheksylkarbodiimid eller lignende anvendes.

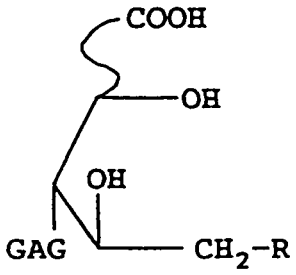
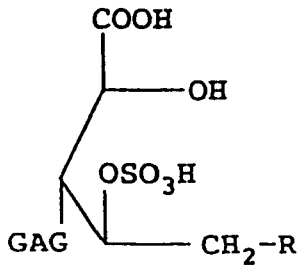
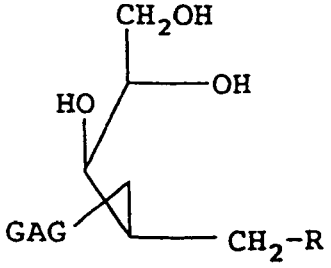
Reaksjonen kan gjennomføres ved en temperatur fra 0 til 60°C.

Det således oppnådde fosfolipid- eller lipidderivat hvor karboksylgruppen er aktivert kan deretter reagere med glykosaminglykanderivatet (15), (16) eller (17) som har en primær aminogruppe for å oppnå fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner (V), (VI) og (VII). Løsningsmiddelet som anvendes i denne reaksjon er kloroform, acetonitril, dimetylformamid eller en blanding derav. Reaksjonstemperaturen strekker seg fra 0 til 60°C.

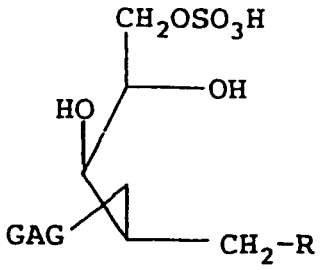
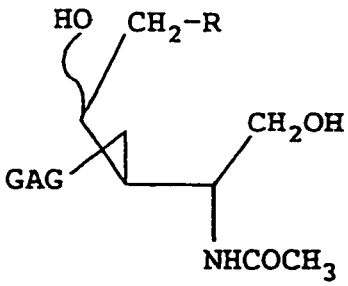
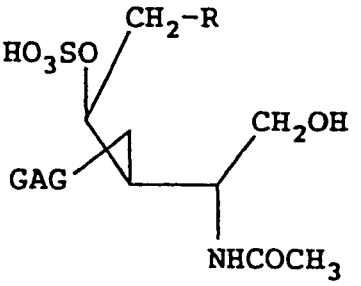
Eksempler som illustrerer forbindelsene som fremstilles ved ovennevnte fremgangsmåte er vist i tabell C.

TABELL C

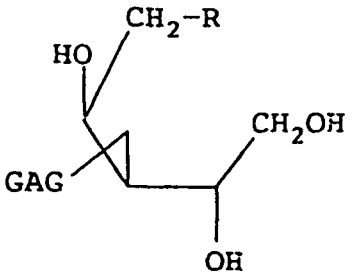
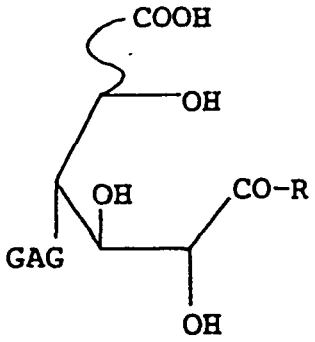
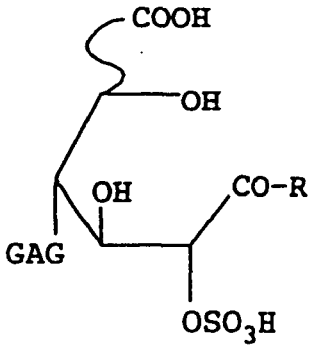
($R=NH-(CH_2)_m-NHCO-(CH_2)_\ell-CO-P^2$)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
V-(1)		hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin, heparansulfat
V-(2)		chondroitinsulfat K, chondroitinpolysulfat
V-(3)		Keratansulfat

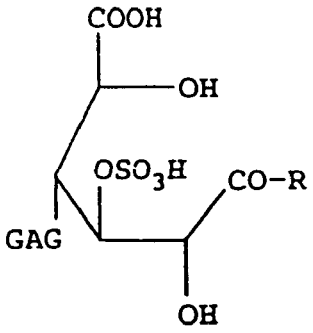
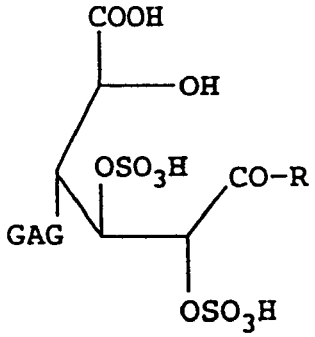
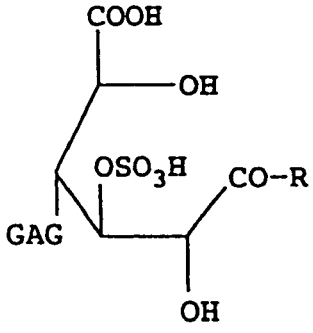
TABELL C (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
V-(4)		keratanpolysulfat
VI-(1)		hyaluronsyre, chondroitin
VI-(2)		chondroitinsulfat A eller K, chondroitinpolysulfat, dermatansulfat

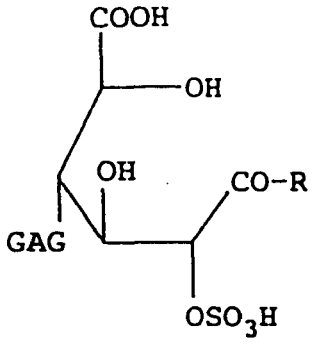
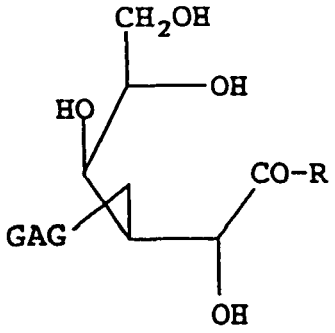
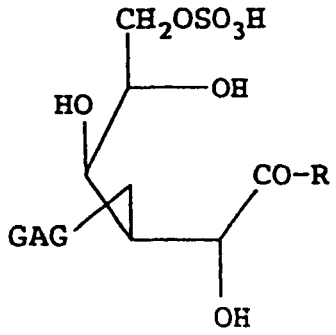
TABELL C (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VI-(3)		keratansulfat keratanpolysulfat
VII-(1)		hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin, heparansulfat
VII-(2)		chondroitinsulfat D, heparin, heparansulfat

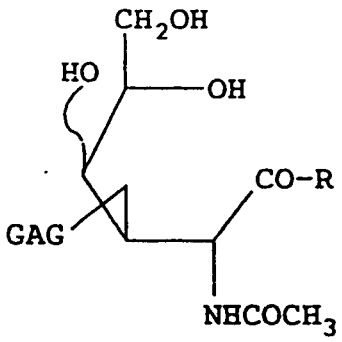
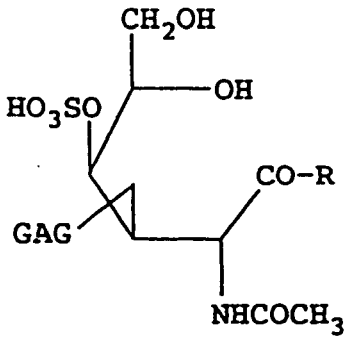
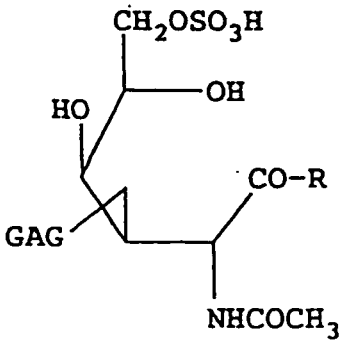
TABELL C (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VII-(3)		chondroitinsulfat K
VII-(4)-a		chondroitinpolysulfat
VII-(4)-b		chondroitinpolysulfat

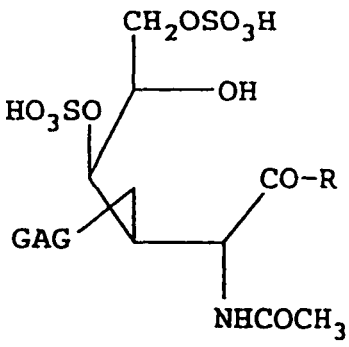
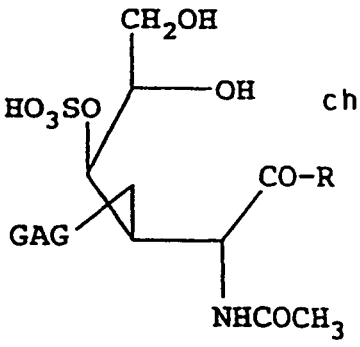
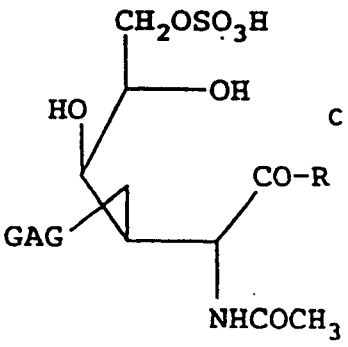
TABELL C (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VII-(4)-c		chondroitinpolysulfat
VII-(5)		keratansulfat
VII-(6)		keratanpolysulfat

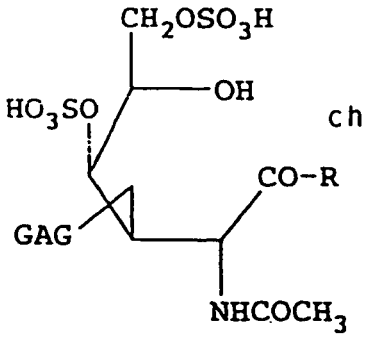
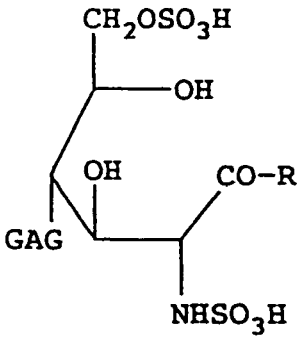
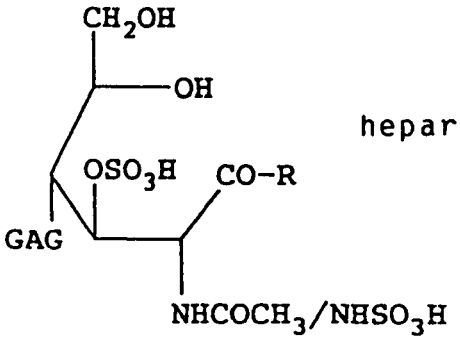
TABELL C (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VII-(7)		hyaluronsyre, chondroitin
VII-(8)		chondroitinsulfat A eller K, dermatansulfat
VII-(9)		chondroitinsulfat C eller D

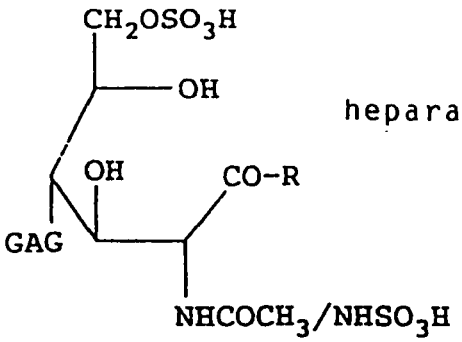
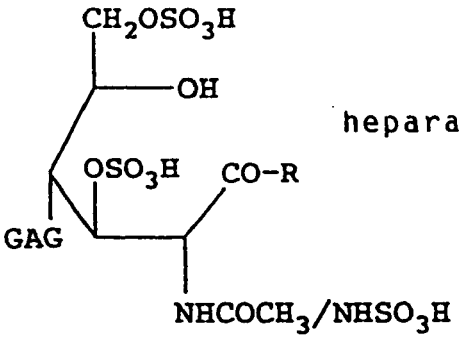
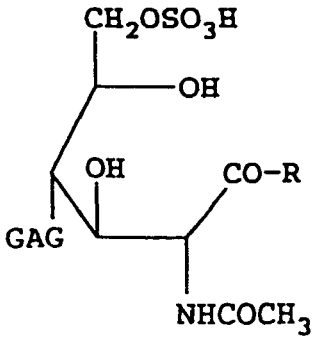
TABELL C (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VII-(10)		chondroitinsulfat E
VII-(11)-a		chondroitinpolysulfat
VII-(11)-b		chondroitinpolysulfat

TABELL C (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VII-(11)-c		chondroitinpolysulfat
VII-(12)		heparin
VI-(13)-a		heparansulfat

TABELL C (forts.)

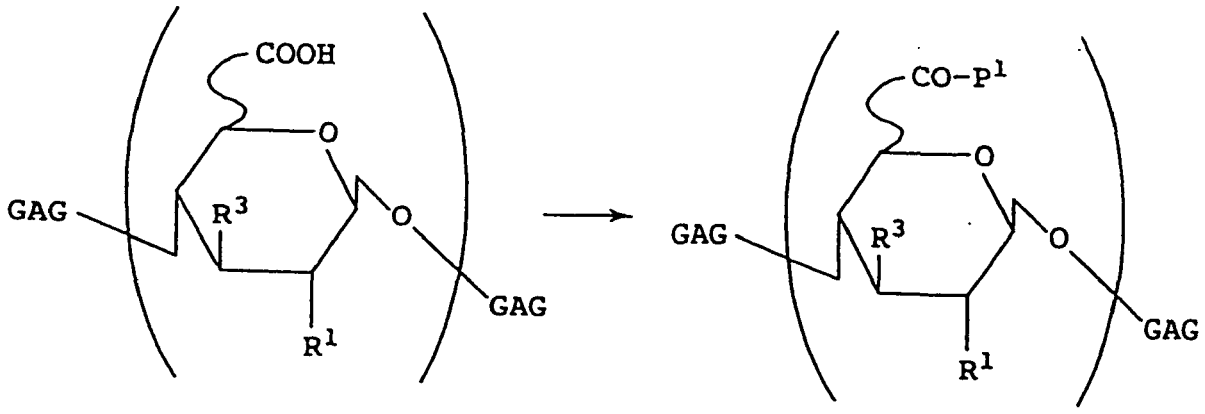
Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
IV-(13)-b		heparansulfat
IV-(13)-c		heparansulfat
IV-(14)		keratansulfat keratanpolysulfat

Anvendelse av et kondensasjonsmiddel

Hvert medlem av glykosaminglykanene, med utelukkelse av keratansulfat og keratanpolysulfat, inneholder D-glukuronsyre eller L-iduronsyre som uronsyredelen, og hver av disse syrer har en karboksylgruppe bundet til karbonatomet i 5-stillingen.

I denne fremgangsmåte dannes et fosfolipidbundet glykosaminglykan ved at uronsyrekarboksylgruppen får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid i nærvær av et kondensasjonsmiddel.

Reaksjonsskjemaet for denne fremgangsmåte er vist i det etterfølgende:



(18)

hvori hver av R^1, R^3 og P^1 er som angitt i det foregående.

Forbindelser med formel (18) som skal anvendes som utgangsmaterial velges fra hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, chondroitinsulfat C, chondroitinsulfat D, chondroitinsulfat E, chondroitinsulfat K, chondroitinpolysulfat, dermatansulfat, heparin og heparansulfat.

Enhver av forbindelsene som er beskrevet i den foregående illustrasjon av den begrensede reduserende terminale gruppe oksydasjonsprosess kan anvendes som et fosfolipid.

Eksempler på kondensasjonsmiddelet inkluderer dietylkarbodiimid, diisopropylkarbodiimid, metylpropylkarbodiimid,

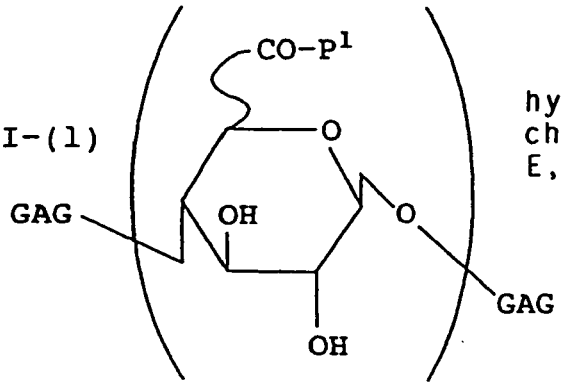
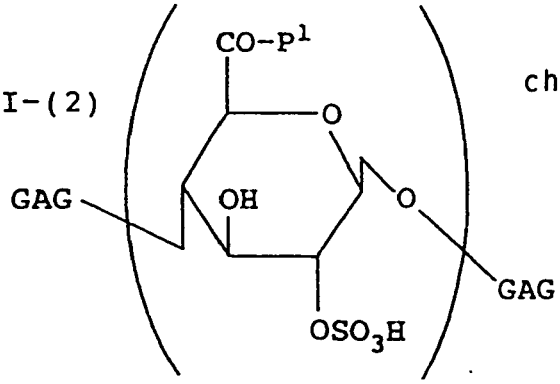
dicykloheksylkarbodiimid, heksametylenkarbodiimid, heptanmetylenkarbodiimid, 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid, 1-cykloheksyl-3-(2-morfolinoetyl)karbodiimid-meso-p-toluensulfonat, 1-t-butyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid, difenylkarbodiimid, 4,4'-dinitrodifenylkarbodiimid, di-p-tolylkarbodiimid, bis-(trimetylsilyl)karbodiimid og lignende.

Kondensasjonsmiddelet kan anvendes i en mengde fra 10 til 100 mol pr. mol av et fosfolipid eller lipid som anvendes.

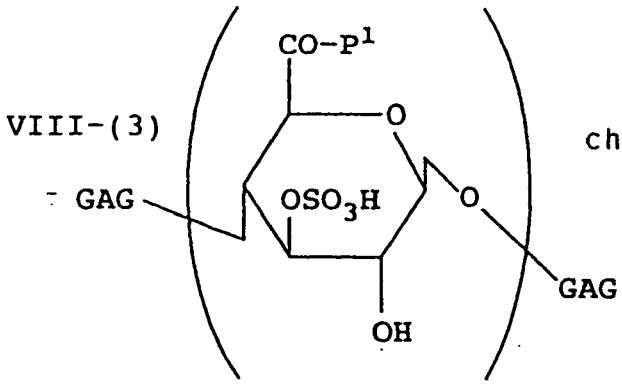
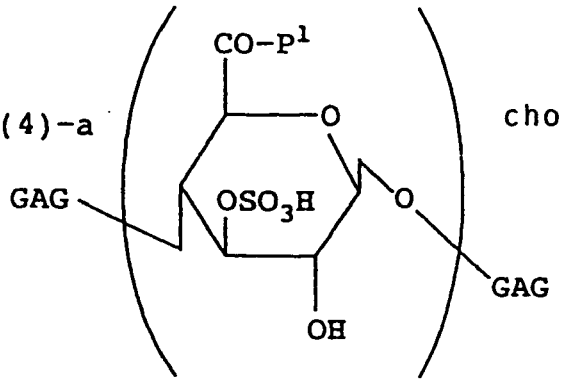
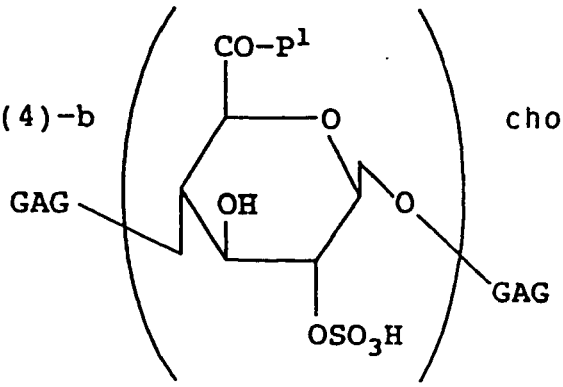
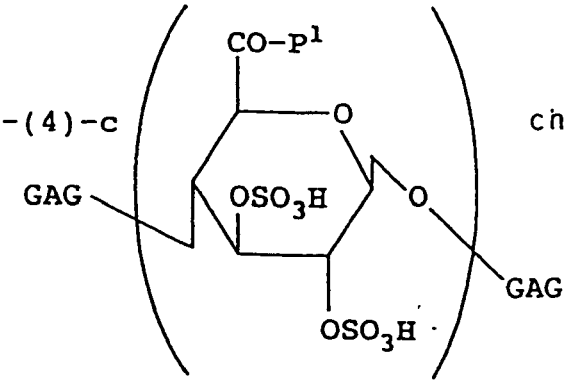
Reaksjonen kan gjennomføres ved en temperatur fra 4 til 60°C, foretrukket fra 15 til 25°C, i et løsningsmiddel som dimetylformamid, kloroform eller en blanding derav.

Eksempler som illustrerer forbindelsene fremstilt ved kondensasjonsprosessen er vist i tabell D.

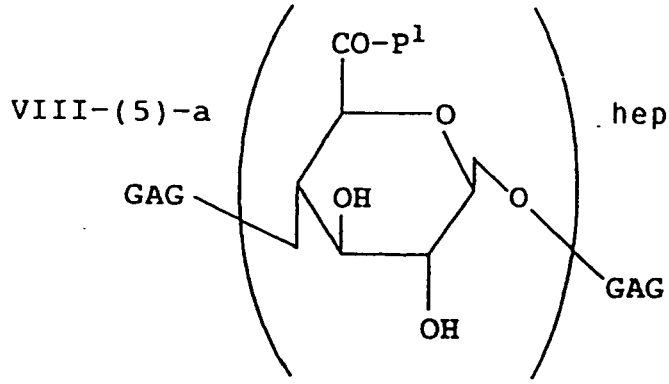
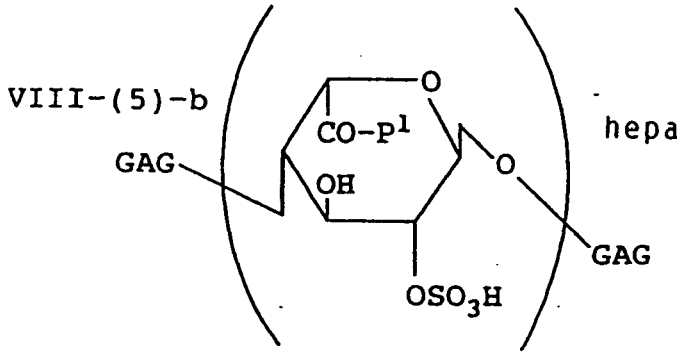
TABELL D

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VIII-(1)		hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat
VIII-(2)		chondroitinsulfat D

TABELL D (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VIII-(3)		chondroitinsulfat K
VIII-(4)-a		chondroitinpolysulfat
VIII-(4)-b		chondroitinpolysulfat
VIII-(4)-c		chondroitinpolysulfat

TABELL D (forts.)

Forbindelse nr.	Formel	Glykosaminglykanmaterial
VIII-(5)-a		heparin, heparansulfat
VIII-(5)-b		heparin, heparansulfat

Aktivering av glykosaminglykan

I denne fremgangsmåte som er lignende den ovennevnte prosess med anvendelse av kondensasjonsmiddel, fremstilles fosfolipid-bundet glykosaminglykan (VIII) ved at uron-syrekarboksylgruppen aktiveres hvoretter den aktiverte karboksylgruppe bindes til den primære aminogruppe i et fosfolipid.

De samme glykosaminglykanforbindelser og fosfolipid-forbindelser som beskrevet i forbindelse med den foregående fremgangsmåte ved anvendelse av et kondensasjonsmiddel, kan anvendes i forbindelse med denne fremgangsmåte.

Aktivering av en karboksylgruppe i uronsyredelen i en glykos-aminglykanforbindelse kan gjennomføres på måter som er vel kjent innen peptidkjemien, f.eks. ved at karboksylgruppen

omdannes til en aktiv ester ved at glykosaminglykan-forbindelsen reageres med N-hydroksysuccinimid, p-nitrofenol, N-hydroksybenzotriazol, N-hydroksypiperidin, N-hydroksy-succinamid, 2,4,5-triklorfenol eller lignende i nærvær av et kondensasjonsmiddel.

Karboksylgruppen i uronsyredelen kan underkastes reaksjonen i form av et aminsalt som tri(n-butyl)aminsalt, trietyl-aminsalt, pyridinsalt eller lignende.

Som reaksjonsløsningsmiddel kan dimetylformamid, pyridin, dimetylsulfoksyd eller lignende anvendes. Som kondensasjons-middel kan 1-etyl-3-(di-metylaminpropyl)karbodiimid, dicyklo-heksylkarbodiimid eller lignende anvendes.

Reaksjonen kan gjennomføres ved en temperatur fra 0 til 60°C, foretrukket fra 4 til 20°C.

Ved å tillate at det således karboksylgruppeaktiverte glykosaminglykan reagerer med fosfolipid, oppnås fosfolipid-bundet glykosaminglykan med formel (VIII).

Denne reaksjon kan gjennomføres ved at det aktiverte glyko-saminglykan får reagere med et fosfolipid ved en temperatur fra 0 til 90°C, foretrukket fra 25 til 60°C, i et løsnings-middel som dimetylformamid, kloroform eller en blanding derav.

Innholdet av fosfolipid- eller lipiddelene i fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminoglykaner fremstilt i samsvar med oppfinnelsen representert ved formel (I) til (VIII) kan strekke seg fra 0,005 til 50 %, foretrukket fra 2 til 10 %.

Separasjon og rensing av de fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner som er oppnådd ved hjelp av de ovennevnte fremgangsmåter kan f.eks. gjennomføres på følgende måte. Den endelige reaksjonsblanding fra hver prosedyre blandes med etanol som er mettet med natriumacetat og det resulterende presipitat utfiltreres for å fjerne ureagert fosfolipid eller

lipid. De således separerte presipitater underkastes hydrofob kromatografi og bæreren vaskes med en vandig løsning av et salt som ammoniumacetat, ammoniumklorid, natriumklorid eller lignende for å fjerne ureagert glykosaminglykan. Deretter elueres det fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykan som er absorbert til bæreren med en vandig oppløsning av 10 til 50 % metanol.

Metastaseinhibitoren fremstilles foretrukket ved at hver av de fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner med formel (I) til (VIII), eller et farmakologisk tålbart salt derav, blandes med faste eller flytende bærere eller fortynningsmidler for medisinsk anvendelse, dvs. tilsetningsmidler som fyllstoffer, stabilisatorer og lignende.

Da saltformen av det fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykan er oppløselig i vann, er det passende å omdanne det til en injiserbar oppløsning. Mengden av aktiv bestanddel i det medisinske preparat kan variere innen området på fra 1 til 90 vekt% basert på vekten av bærere.

Den aktive forbindelse kan tilføres oralt i form av granuler, fine granuler, pulvere, tabletter, kapsler, piller eller oppløsninger, såvel som bulkpulvere, eller den kan tilføres ved intravenøs, intramuskulær eller subkutan injeksjon. Den aktive forbindelse kan også anvendes som eksterne preparater som stikkpiller, salver, kataplasma, plaster, linimenter, lotioner og lignende. Den kan også dannes til pulver for anvendelse ved injeksjon, idet pulveret oppløses i en passende væske ved anvendelse.

For fremstilling av farmasøytiske preparater som inneholder de fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner fremstilt i samsvar med oppfinnelsen eller deres salter, kan enhver organisk eller uorganisk eller fast eller flytende bærer eller fortynningsmiddel anvendes med den betingelse at slike tilsetningsmidler er tålbare for oral, intestinal, parenteral eller topisk tilførsel. Bærere som kan anvendes i denne

forbindelse inkluderer vann, gelatin, laktose, stivelse, magnesiumstearat, talkum, animalske oljer eller planteoljer, benzylalkohol, gummi, polyalkylenglykol, petroleumsharpikser, kokosnøttolje, lanolin og andre bærere for medisinsk anvendelse. I tillegg kan det anvendes stabilisatorer, fuktemidler, emulgeringsmidler, såvel som salter for å justere det osmotiske trykk eller å opprettholde en passende pH-verdi i de farmasøytiske preparater.

Når det gjelder granuler, fine granuler, pulvere, tabletter eller kapsler, kan det farmasøytiske preparat inneholde den aktive bestanddel fremstilt i samsvar med oppfinnelsen i en foretrukket mengde fra 5 til 80 vekt%, mens 1 til 30 vekt% er foretrukket i forbindelse med oppløsninger. Videre kan foretrukne innhold av den aktive bestanddel strekke seg fra 1 til 10 vekt% når det gjelder injeksjoner, fra 1 til 50 vekt% når det gjelder stikkpiller, og fra 0,1 til 10 vekt% når det gjelder salver, kataplasma og lignende for anvendelse ved topisk påføring.

Den kliniske dose er foretrukket i området fra 100 til 2.000 mg uttrykt som mengden av den aktive bestanddel pr. dag pr. voksen person når det gjelder oral tilførsel, skjønt dosen kan varieres avhengig av alder og symptomer. Den ovennevnte daglige dose kan foretrukket tilføres en gang pr. dag eller to eller tre ganger pr. dag ved at dosen oppdeles.

Ved anvendelse i form av injeksjoner, er den foretrukne dose i området fra 100 til 1.000 mg uttrykt som mengden av aktiv bestanddel pr. dag pr. voksen person. Ved anvendelse i form av salver, kataplasma og lignende, kan disse preparater med det ovennevnte innhold av den aktive bestanddel påføres på den angrepne del i en passende mengde.

Når det gjelder akutt giftighet av den aktive bestanddel ble dyreforsøk gjennomført på følgende måte. Fire uker gamle Sic-ddy hannmus og hunnmus ble først foret i en uke, og når hannmusene hadde oppnådd en vekt på 23 til 30 g og hunnmusene en vekt på 20 til 25 g ble HA1-PPEADP (lott nr. 300) og

CS(S3)-PPEADP (lott nr. 302-2, begge PPEADPer er beskrevet senere) oppløst i fysiologisk saltvann som bestemt ved The Pharmacopoea of Japan, til en konsentrasjon på 5 % og tilført intraperitonealt til musene. Den intraperitoneale tilførsel ble gjennomført i forbindelse med dette forsøk fordi den som oftest gir dannelse av giftighetssymptomer. Ti hannmus og ti hunnmus ble anvendt i hver forsøksgruppe. Som et resultat ble det funnet av LD_{50}-verdien i hver forsøksgruppe var 2.000 mg/kg eller større, som viser at forbindelsen fremstilt i samsvar med oppfinnelsen sikkert kan anvendes som et legemiddel.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 - 6 viser data for hydrofob kromatografi av fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner fremstilt i henholdsvis eksempel 1-(2)-1, eksempel 2-(2)-1, eksempel 2-(3), eksempel 4-(1), eksempel 5-(1) og eksempel 5-(2).

Den foreliggende oppfinnelse er beskrevet mer detaljert i de etterfølgende eksempler.

I de etterfølgende eksempler ble innholdene av fosfor, fosfolipid eller lipid og glykosaminglykan (GAG) i fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan målt på følgende måte.

Målemetode

1. Bestemmelse av GAG

(1) GAG som inneholder uronsyre: Karbazolsvovelsyremetoden (Bitter-Muir metode) (Analytical Biochemistry, 4, 330-334, 1962).

(2) Keratansulfat- eller keratanpolysulfatholdig galaktose: Anthrone-metoden (Biochem. J., 50, 298-303, 1952).

2. Bestemmelse av fosfolipid eller lipid

(1) Fosfor: Metoden med molybdenblått (Inorganic Applied Colorimetric Analysis, vol. 4, side 130-135 (representativ utgiver, Shiro Hirano, publisert i Kyoritsu Shuppan).

(2) Fettsyre: En 10 til 50 mg porsjon GAG-lipid ble oppløst i 10 ml av en 1 N natriumhydroksydoppløsning og

hydrolysert ved 100°C i en time. Den oppnådde reaksjonsblanding innstilles til sur pH med 1 N saltsyreoppløsning og ekstraheres med kloroform, og kloroformfasen vaskes med vann. Etter tørking med dehydratisert Glaubers salt fjernes løsningsmiddelet under redusert trykk. Den oppnådde rest forsegles i et rør sammen med et passende volum metanolholdig 3 % HCl (gass), oppvarmes ved 100°C i tre timer og ekstraheres deretter tre ganger med petroleumseter. Den oppnådde petroleumseterfase vaskes tre ganger med vann for å fjerne kontaminert saltsyre. Etter tørking med Glaubers salt konsentreres det oppnådde produkt under redusert trykk og underkastes følgende gass-væskekromatografi.

Gass-væskekromatografi (GLC)
GC-15A (Shimadzu Corp.)

Fyllmaterial:	PEG-HT 5 % Uniport HP 60/80 (Gasukuro Kogyo Inc.)
Driftsbetingelser:	Gasskammer, 350°C
Kolonnetemperatur:	190 til 200°C
Kolonne:	3 ϕ x 2 m
Strømningsmengde:	N_2 45 ml/min.

EKSEMPEL 1

Fremstilling av fosfolipidbundet glykosaminglykan ved begrenset oksydasjon av reduserende terminal gruppe

(1) Fremstilling av reduserende terminal gruppe-begrenset oksydert glykosaminglykan.

1) Fremstilling av reduserende terminal rest-spaltet hyaluronsyre.

En 2.000 mg porsjon hyaluronsyre (HA1, molekylvekt 10.000, fra hanekam) ble oppløst i 200 ml 0,05 M boratbuffer (pH 8,3). Etter tilsetning av 182 mg natriumborhydrid ble den oppnådde blanding inkubert ved romtemperatur i fem timer for å bevirke reaksjonen. Reaksjonsblandingen ble justert til pH 4,5 med eddiksyre og deretter blandet med etanol til å gi et presipitat. Det således oppnådde presipitat ble vasket med etanol til å gi 1.800 mg av en reduserende terminal rest-spaltet hyaluronsyre (R-HA1, lott nr. 100).

2) Fremstilling av reduserende terminal gruppebegrenset oksydert hyaluronsyre.

En 1.700 mg porsjon R-HA1 (lott nr. 100) ble oppløst i 250 ml 40 mM imidazol (pH 6,5). Etter tilsetning av 139,96 mg natriumperjodat ved 0°C ble den oppnådde blanding inkubert ved den samme temperatur i en time for å bevirke reaksjon. Etanol ble tilsatt til reaksjonsblandingen til å danne et presipitat. Det således oppnådde presipitat ble vasket til å gi 1.600 mg reduserende terminal gruppe-begrenset oksydert hyaluronsyre (O-HA, lott nr. 200).

3) Fremstilling av andre reduserende terminal gruppe-begrensede oksyderte glykosaminglykaner (O-GAG).

Reduserende terminal rest-spaltet glykosaminglykaner (R-GAG) ble fremstilt i henhold til den ovennevnte prosedyre 1) under de forhold som er vist i tabell E, ved anvendelse av hver av de etterfølgende utgangsmaterialer: hyaluronsyre (HA5, molekylvekt 50.000: HA15, molekylvekt 150.000: fra hanekam), chondroitin (CH, molekylvekt 15.000: svovelsyrefjernet produkt fra chondroitinsulfat A med sur metanolløsning), chondroitinsulfat C (CS (S1), molekylvekt 10.000: CS (S3), molekylvekt 30.000: CS (S6), molekylvekt 60.000: fra haibrusk), chondroitinsulfat A (CS (W), molekylvekt 30.000: fra haibrusk), dermatansulfat (DS, molekylvekt 15.000: fra svinehud), heparin (Hep, molekylvekt 15.000: fra tynntarmen hos svin), heparansulfat (HS, molekylvekt 15.000: fra oksenyre), og keratansulfat (KS, molekylvekt 15.000: fra oksehornhinne). De således oppnådde R-GAG prøver ble underkastet den ovennevnte prosedyre 2) under de betingelser som er vist i tabell F for fremstilling av reduserende terminal gruppe-begrenset oksyderte glykosaminglykaner (O-GAG).

TABELL E

Lott nr.	Produkt	Reaksjonsbetingelser $GAG/NaBH_4$ (mg/mg)	Utbytte (mg)
100-2	R-HA5	5000/94.58	4720
100-3	R-HA15	1000/6.31	971
101	R-CH	1000/63.05	867
102	R-CS (S1)	1000/94.58	880
102-2	R-CS (S3)	1000/31.50	897
102-3	R-CS (S6)	1000/15.76	869
103	R-CS (W)	1000/31.50	823
104	R-DS	150/9.46	130
105	R-Hep	1000/63.05	772
106	R-HS	40/2.55	35
107	R-KS	20/1.28	14.6

TABELL F

Lott nr.	Produkt	Reaksjonsbetingelser $GAG/NaIO_4$ (mg/mg)	Utbytte (mg)
200-2	O-HA5	4500/77.0	4310
200-3	O-HA15	900/5.14	815
201	O-CH	800/45.65	766
202	O-CS (S1)	800/68.48	715
202-2	O-CS (S3)	800/22.83	774
202-3	O-CS (S6)	800/11.41	699
203	O-CS (W)	800/22.83	697
204	O-DS	100/5.71	82
205	O-Hep	700/39.95	666
206	O-HS	30/1.71	22
207	O-KS	10/0.57	7

(2) Fremstilling av L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoyl-bundet glykosaminglykan (GAG-PPEADP).

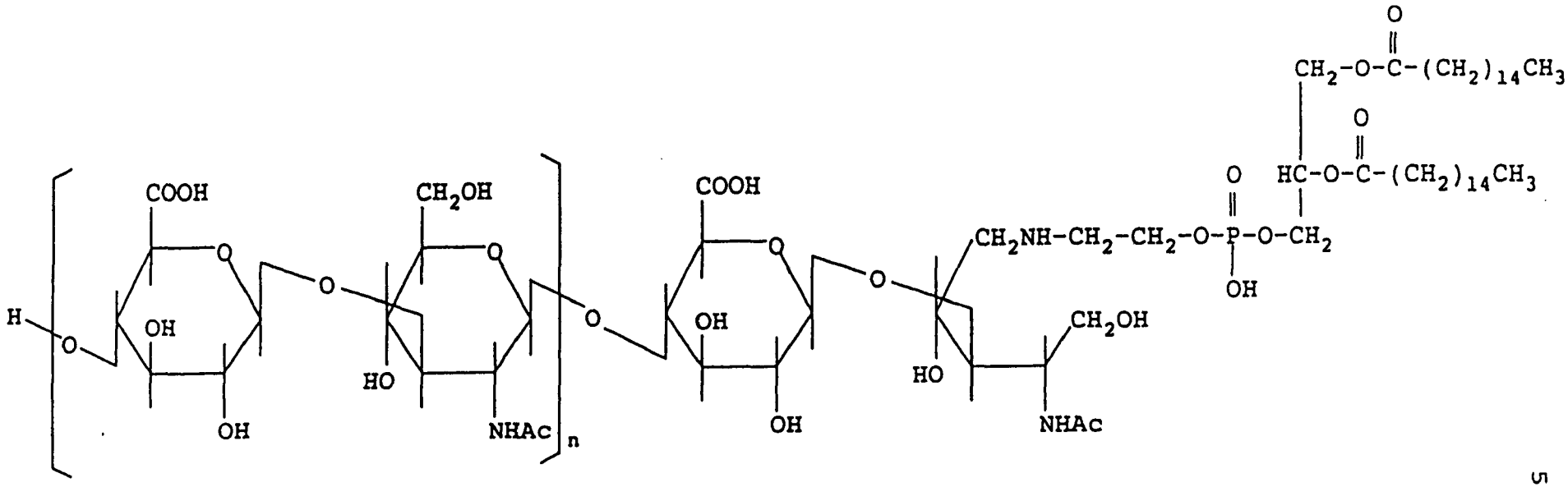
1) Fremstilling av L-(α-fosfatifyl)etanolamin-dipalmitoylbundet hyaluronsyre.

1.000 mg av lott nr. 200 O-HA ble oppløst i 100 ml 0,05 M fosfatbuffer (pH 7,0) og 69,2 ml av et kloroform/metanol løsningssystem (2:1) inneholdende L-(α-fosfatidyl)etanolamin dipalmitoyl (PPEADP) (1 mg/ml) ble tilsatt dertil. Den oppnådde blanding ble videre blandet med metanol for oppnåelse av en ensartet oppløsning, hvoretter oppløsningen ble inkubert ved 50°C i en time. Etter tilsetning av 25 mg natriumcyanoborhydrid til den oppnådde reduksjonsblanding ble inkuberingen fortsatt ved 50°C i to timer etterfulgt av konsentrering under et redusert trykk. Til konsentratet ble det tilsatt fem volumdeler eddiksyremettet etanol til å danne et presipitat og dette presipitat ble fjernet ved filtrering. Det således oppnådde presipitat ble oppløst i 0,3 M ammoniumkloridoppløsning, påført på en hydrofob kromatografikolonne (TSK gel Phenyl Toyopearl 650M, 400 ml), vasket inngående med en 0,3 M ammoniumkloridløsning, og deretter eluert med en 30 % metanolløsning. Reaksjonsproduktet av interesse ble funnet i 30 % metanolfraksjonen, mens ureagert HA1 ble funnet i de uabsorberte og vaskede fraksjoner. Fraksjonen som var eluert med 30 % metanol ble konsentrert under redusert trykk, avsaltet ved dialyse og deretter frysetørket til å gi et hvitt pulver med lott nr. 300.

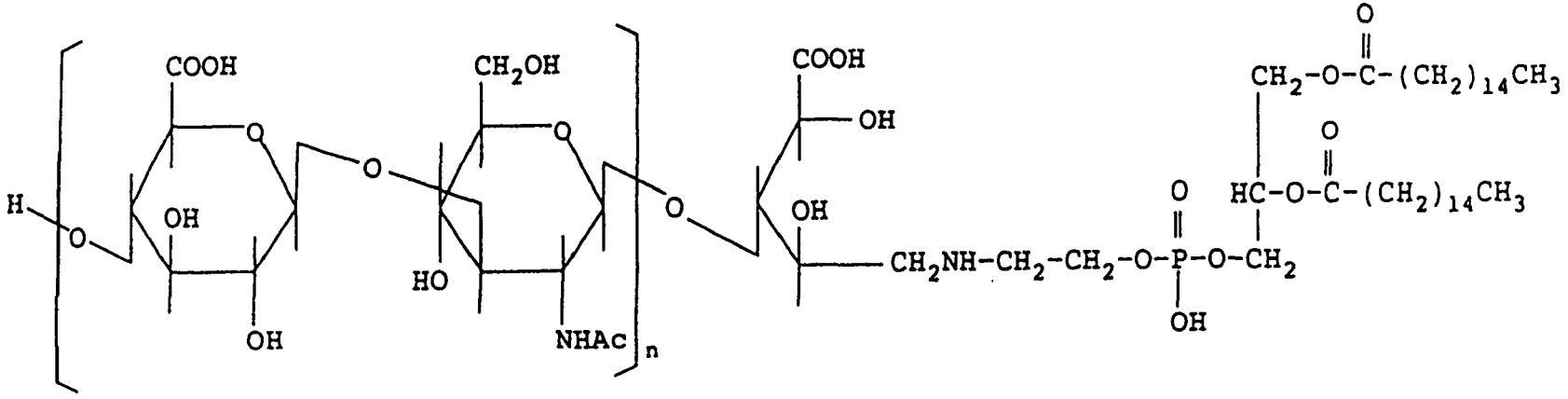
Utbytte:	40 mg
PPEADP-innhold:	6,21 %
Hyaluronsyreinnhold:	62,12 %
Hydrofob kromatogram:	vist i fig. 1

Hydrofob kromatografi ble gjennomført under de følgende betingelser:

Kolonne:	TSK gel Phenyl 5 PW (7,5 ϕ x 7,5 cm)
Løsningsmiddel:	0-5 min., 0,3 M ammoniumklorid 5-50 min., 30 % metanol
Strømningsmengde:	0,5 ml/min.
Trykk:	7 kg/0,5 cm^2



og



n: gjennomsnitt 24

Fraksjonsvolum:	1 ml/rør
Påvisning:	OD_{220} nm
Prøve:	100 µl (1 mg/ml oppløsning i 0,3 M ammoniumklorid)

2) Fremstilling av andre fosfolidpidbundne glykosaminglykaner.

Fosfolipidbundne glykosaminglykaner ble fremstilt i overensstemmelse med den ovennevnte prosedyre (2)-1) fra O-GAG-prøvene vist i tabell F og PPEADP under betingelser som er vist i tabell G. Resultater fra analyser av de således oppnådde produkter er vist i tabell G.

TABELL G

Lott nr.	Produkt	Reaksjonsbetingelser O-GAG/PPEADP/$NaBH_3CN$	Utbytte (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
300-2	R-HA5-PPEADP	1000/13.84/5.03	42	1.33	63.43
300-3	R-HA15-PPEADP	700/3.23/1.17	35	0.46	63.35
301	CH-PPEADP	700/32.29/11.73	30	4.27	59.10
302	CS(S1)-PPEADP	700/48.44/17.60	36	5.89	63.04
302-2	CS(S3)-PPEADP	700/16.15/5.89	29	2.22	65.52
302-3	CS(S6)-PPEADP	500/5.77/2.09	20	1.07	67.13
303	CS(W)-PPEADP	500/11.53/4.19	22	2.23	67.48
304	DS-PPEADP	50/2.31/0.84	3.7	4.21	66.10
305	Hep-PPEADP	500/23.07/8.38	3.8	4.30	74.65
306	HS-PPEADP	20/0.92/0.34	3.3	4.09	68.40
307	KS-PPEADP	7/0.33/0.12	0.5	3.97	66.24

EKSEMPEL 2

Fremstilling av fosfolipidbundet glykosaminglykan ved laktonisering av reduserende terminal gruppe

(1) Fremstilling av reduserende terminal gruppe-oksydert glykosaminglykan.

1) Fremstilling av reduserende terminal gruppe-oksydert hyaluronsyre.

500 mg hyaluronsyre (HA1, molekylvekt 10.000, fra hanekam) ble oppløst i 10 ml vann, og oppløsningen ble blandet med 5 ml av en metanoloppløsning av 0,1 M jod og inkubert ved romtemperatur i seks timer for å bevirke reaksjon. Til den oppnådde reaksjonsblanding ble det tilsatt omtrent 5 ml 0,1 N kaliumhydroksyd for å avfarge frie jodmolekyler. Kaliumacetatmettet etanol ble tilsatt til den oppnådde oppløsning til å danne et presipitat og det presipiterte produkt ble samlet ved filtrering, vasket inngående med etanol og deretter tørket under redusert trykk. Således ble det oppnådd 423 mg reduserende terminal gruppe-oksydert hyaluronsyre (lott nr. 400). Reduserende sukker ble ikke påvist i produktet når dette ble undersøkt ved hjelp av Somogyi-Nelson metoden.

2) Fremstilling av reduserende terminal gruppe-laktonisert hyaluronsyre.

400 mg av lott nr. 400 reduserende terminal gruppe-oksydert hyaluronsyre ble oppløst i 10 ml vann og oppløsningen ble ført gjennom 50 ml av en kolonne av en sterk sur ionebytterharpiks (Dowex 50(H^+)) i løpet av en time. Det ble således oppnådd en oppløsning som inneholdt 390 mg reduserende terminus-laktonisert hyaluronsyre. Reduserende sukker ble ikke påvist i oppløsningen når denne ble undersøkt ved hjelp av Somogyi-Nelson metoden.

Den således oppnådde oppløsning ble nøytralisert med tri-n-butylamin og deretter frysetørket til å gi 400 mg av tri-n-butylaminsalt av reduserende terminus-laktonisert hyaluronsyre (lott nr. 500).

3) Fremstilling av andre reduserende terminus-laktoniserte glykosaminglykaner.

Reduserende terminale gruppe-oksyderte glykosaminglykaner ble fremstilt i henhold til den ovennevnte prosedyre 1) under de betingelser som er vist i tabell H ved anvendelse av hver av de følgende utgangsmaterialer: chondroitin (CH, molekylvekt 15.000), chondroitinsulfat C (CS (S1), molekylvekt 10.000, CS (S3), molekylvekt 30.000, og CS (S6), molekylvekt 60.000), dermatansulfat (DS, molekylvekt 15.000), heparin (Hep, molekylvekt 15.000) og heparansulfat (HS, molekyvekt (HS, molekylvekt 15.000). De således oppnådde prøver ble underkastet den ovennevnte prosedyre 2) under betingelser som vist i tabell I for fremstilling av reduserende terminal gruppe-laktoniserte glykosaminglykaner.

TABELL H

Lott nr.	Produkt	Reaksjonsbetingelser GAG/0,1 M I_2/ 0,1 N KOH (mg/ml/ml)	Utbytte (%)	Somogyi-Nelson
401	CH-COOK	1000/13.4/13.4	828	-
402	CS(S1)-COOK	1000/19.8/19.8	901	-
402-2	CS(S3)-COOK	1000/3.3/3.3	895	-
402-3	CS(S6)-COOK	1000/4.95/4.95	913	-
404	DS-COOK	100/0.67/0.67	91	-
405	Hep-COOK	1000/6.7/6.7	902	-
406	HS-COOK	100/1.34/1.34	88	-

* Somogyi-Nelson: Tilstedeværelse (+) eller fravær (-) av reduserende sukker bestemt ved Somogyi-Nelson metoden.

TABELL I

Lott nr.	Produkt	Reaksjonsbetingelser GAG-COOK/ Dowex 50 (H^+) (mg/ml)	Utbytte (%)	Somogyi-Nelson
501	CH-lakton	800/400	780	-
502	CS(S1)-lakton	900/450	805	-
502-2	CS(S3)-lakton	800/400	850	-
502-3	CS(S6)-lakton	900/450	887	-
504	DS-lakton	90/100	96	-
505	Hep-lakton	900/400	946	-
506	HS-lakton	80/40	72	-

* Somogyi-Nelson: Tilstedeværelse (+) eller fravær (-) av reduserende sukker bestemt ved Somogyi-Nelson metoden.

(2) Fremstilling av L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoyl-bundet glykosaminglykan (GAG-PPAEDP).

1) Fremstilling av L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoylbundet hyaluronsyre.

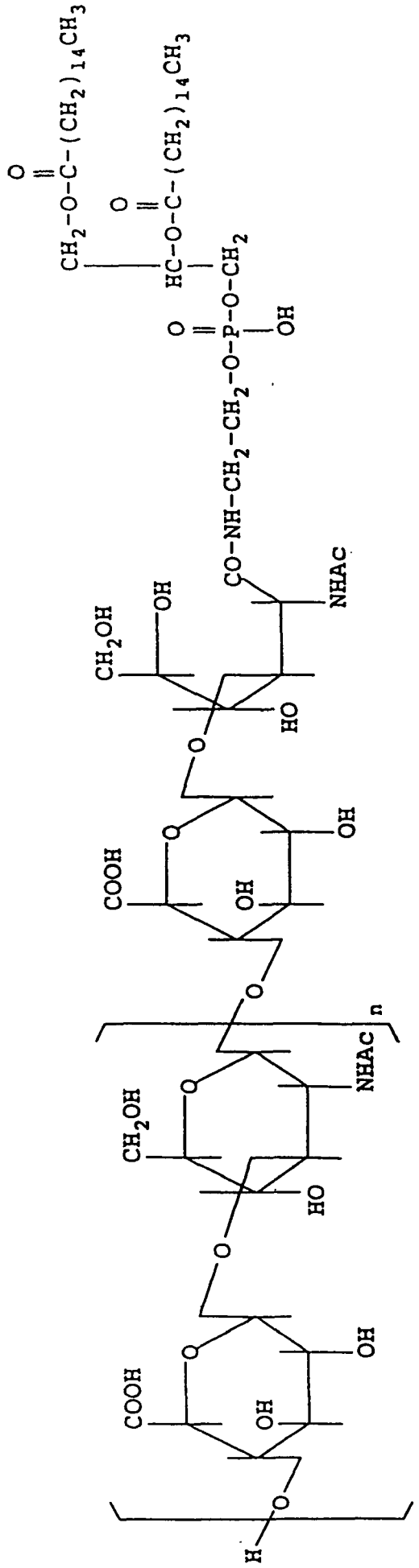
400 mg av lott nr. 500 reduserende terminus-laktonisert hyaluronsyre ble oppløst i 200 ml dimetylformamid og 27,6 mg PPEADP oppløst i kloroform ble tilsatt. Den oppnådde blanding ble inkubert ved 70°C i to timer. Etter fjerning av kloroform fra reaksjonsblandingen ved destillasjon ble et overskuddsvolum av en vandig natriumacetatløsning tilsatt til resten for å omdanne reaksjonsproduktet til natriumsalt. Natriumacetatmettet etanol ble tilsatt dertil for å danne et presipitat og det dannede presipitat ble samlet ved filtrering. Presipitatet ble oppløst i en 0,3 M ammoniumacetatløsning og underkastet rensing i overensstemmelse med eksempel 1-(2) til å oppnå 36 mg av det ønskede produkt (lott nr. 600).

Fosforinnhold: 0,30 %
PPEADP-innhold: 6,44 %
Hyaluronsyreinnhold: 82,37 %
Hydrofobt kromatogram:
Vist i fig. 2.

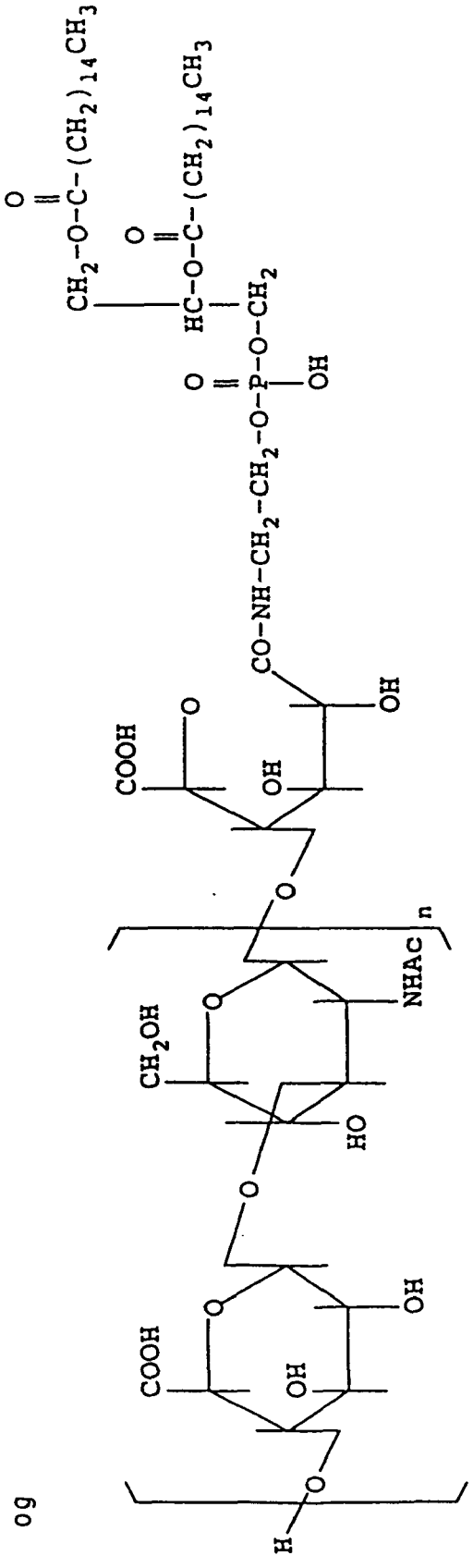
Målebetingelsene er de samme som beskrevet over.

(2) Fremstilling av andre L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoylbundne glykosaminglykaner.

Disse prøver ble fremstilt fra de reduserende terminus-laktoniserte glykosaminglykaner som vist i tabell I og PPEADP i overensstemmelse med den ovennevnte prosedyre (2)-1) under de betingelse som er vist i tabell J. Resultatene av analyser av de således oppnådde produkter er vist i tabell K.



og



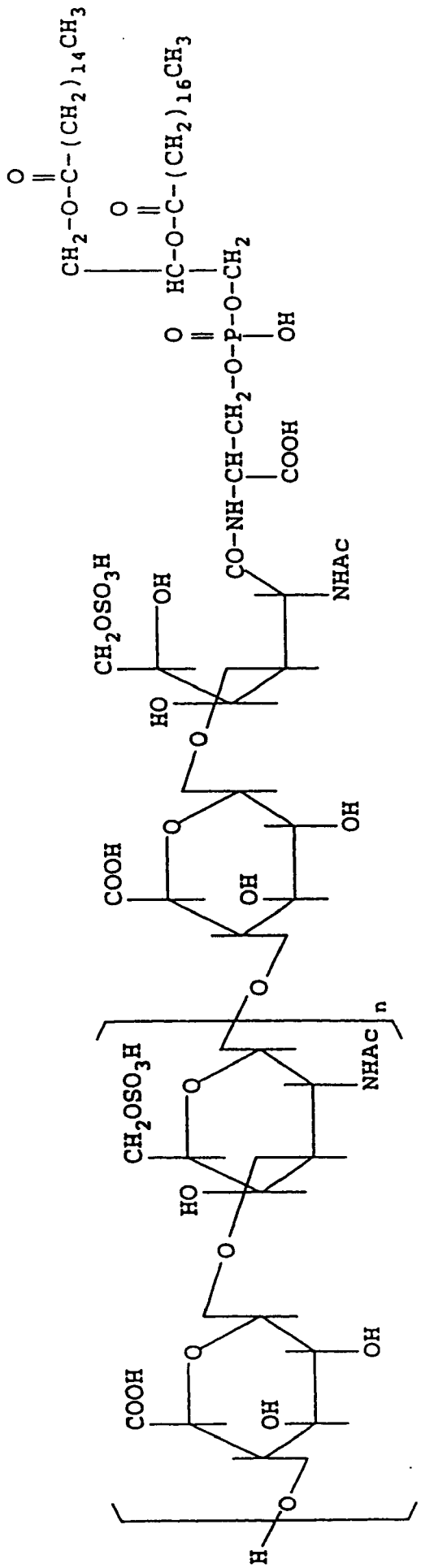
n: gjennomsnitt 25

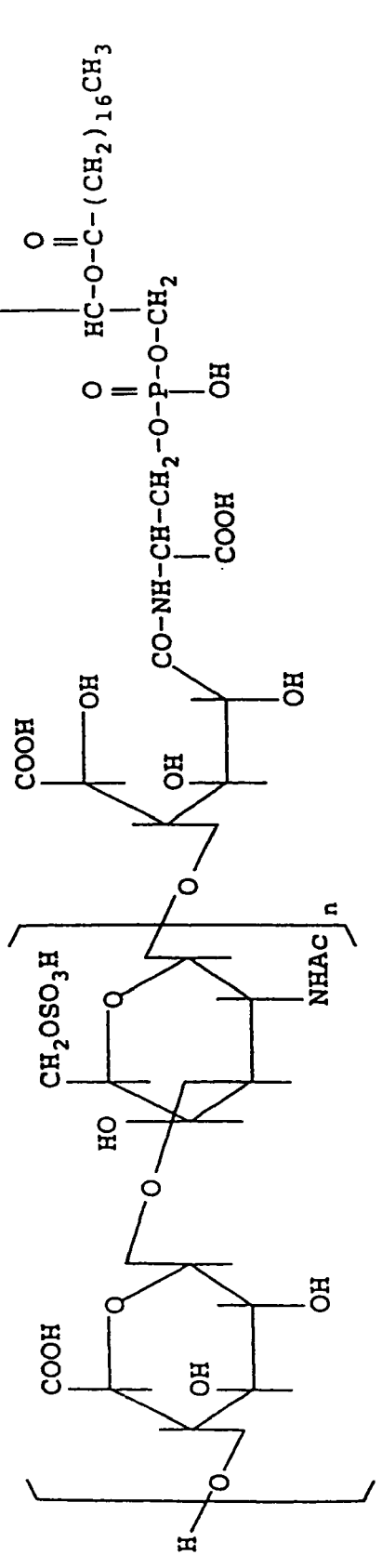
TABELL J

Lott nr.	Produkt	Reaksjonsbetingelser GAG-lakton/PPEADP (mg/mg)
601	CH-PPEADP	700/32.3
602	CS(S1)-PPEADP	800/55.4
602-2	CS(S3)-PPEADP	400/9.26
602-3	CS(S6)-PPEADP	800/9.00
604	DS-PPEADP	90/4.15
605	Hep-PPEADP	800/36.91
606	HS-PPEADP	70/3.31

TABELL K

Lott nr.	Produkt	Utbytte (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
601	CH-PPEADP	70.2	4.30	90.90
602	CS(S1)-PPEADP	88.0	6.41	85.17
602-2	CS(S3)-PPEADP	20	2.01	89.70
602-3	CS(S6)-PPEADP	56.2	1.08	92.00
604	DS-PPEADP	4.5	4.00	90.66
605	Hep-PPEADP	24	4.11	90.01
606	HS-PPEADP	5.74	4.22	88.21





n: gjennomsnitt 60

(3) Fremstilling av fosfatidylserin-stearoylpalmitoylbundet chondroitinsulfat C.

400 mg av det reduserende terminus-laktoniserte chondroitinsulfat C med lott nr. 500-2 ble oppløst i 200 ml dietylformamid og 9 mg fosfatidylserin-stearatpalmitat i kloroform ble tilsatt dertil. Den oppnådde blanding ble inkubert ved 70°C i to timer. Etter at kloroform var fjernet fra reaksjonsblandingen ved destillasjon ble et overskuddsvolum av en vandig natriumacetatløsning tilsatt til resten for å omdanne reaksjonsproduktet til natriumsalt. Natriumacetatmettet etanol ble tilsatt dertil for å danne et presipitat og det dannede presipitat ble samlet ved filtrering. Presipitatet ble oppløst i en 0,3 M ammoniumkloridløsning og deretter underkastet rensing i overensstemmelse med prosedyren i eksempel 1-(2) til å gi 20,8 mg fosfatidylserin-stearoylpalmitoylbundet chondroitinsulfat C (lott nr. 700-2).

Fosforinnhold: 0,10 %

Chondroitinsulfat C innhold: 86,15 %

Hydrofobt kromatogram:

Vist i fig. 3.

Målebetingelser er som beskrevet over.

EKSEMPEL 3

Fremstilling av fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan ved aminering av reduserende terminal gruppe

(1) Fremstilling av reduserende terminal gruppe-aminert glykosaminglykan.

1) Fremstilling av reduserende terminus-aminert chondroitinsulfat C (CS/S3)).

100 mg reduserende terminal gruppe-begrenset oksydert chondroitinsulfat C (lott nr. 202-2) ble oppløst i 50 ml 0,05 M fosfatbuffer (pH 7,0), og oppløsningen ble blandet med 24 mg etylendiaminhydroklorid. Etter at den oppnådde blanding var inkubert ved 50°C i tretti minutter ble 20 mg natriumcyanoborhydrid tilsatt reaksjonsblandingen og inkubasjonen ble fortsatt ved 50°C i to timer for fullstendig reaksjon. Natriumacetatmettet etanol ble tilsatt til den oppnådde reaksjonsblanding for å presipitere reaksjonsproduktet som deretter ble samlet ved filtrering. Presipitatet ble oppløst

i vann og absorbert på 50 ml av DEAE-ionebytterharpiks etterfulgt av gradienteluering med en 0,1 M - 1 M natriumkloridløsning. Det reduserende terminus-aminerte chondroitinsulfat C ble eluert med 0,4 M natriumklorid, mens fritt chondroitinsulfat C ble eluert med 0,75 M natriumklorid. Fraksjonen oppnådd med 0,4 M natriumklorid ble avsaltet ved dialyse og deretter frysetørket til å gi 80 mg reduserende terminal gruppe-aminert chondroitinsulfat C (lott nr. 802-2).

2) Fremstilling av reduserende terminus-aminert heparin (**Hep**). Den ovennevnte prosedyre ble gjentatt unntatt at 100 mg reduserende terminal gruppe-begrenset oksydert heparin med lott nr. 205 ble anvendt. Det ble således oppnådd 77 mg reduserende terminus-aminert heparin (lott nr. 805).

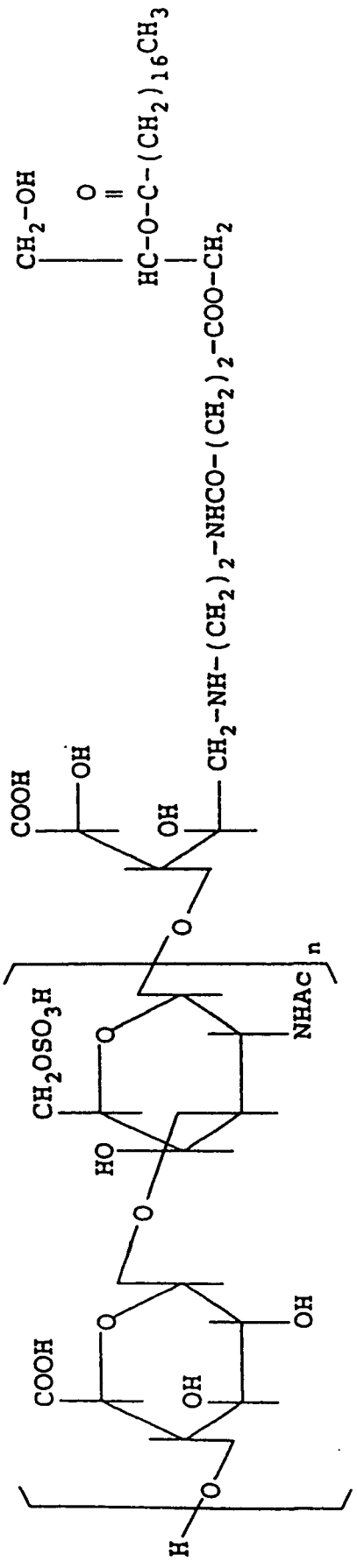
(2) Fremstilling av ravsyrederivat av lipid.

1) Fremstilling av ravsyreester av glyserolmonostearat. 10,74 g glyserolmonostearat ble oppløst i 200 ml benzen som inneholder 3 ml pyridin. Etter tilsetning av 6 g ravsyreanhydrid ble den oppnådde blanding behandlet med tilbakeløp i seks timer. Den oppnådde reaksjonsblanding ble konsentrert under redusert trykk og det dannede presipitat ble underkastet rekrystallisering fra aceton til å gi 8,2 g ravsyreester av glyserolmonostearat.

2) Fremstilling av aktiv ester fra ravsyreester av glyserolmonostearat med N-hydroksyravsyreimid.

8 g av esteren oppnådd i den ovennevnte prosedyre 1) ble oppløst i benzen og oppløsningen ble blandet med 2 g N-hydroksyravsyreimid og 10 g dicykloheksylkarbodiimid. Etter at den oppnådde blanding var inkubert ved romtemperatur i tyve timer ble reaksjonsblandingen konsentrert under redusert trykk for å oppnå et presipitat av reaksjonsproduktet. Presipitatet ble rekrystallisert fra et benzen/n-heksan-løsningsmiddelsystem til å gi 7,4 g av den ønskede aktive ester (lott nr. GMS-1).

(3) Fremstilling av glyserolmonostearatbundet chondroitinsulfat C.



n: gjennomsnitt 60

I 5 ml vann ble oppløst 80 mg av reduserende terminus-aminert chondroitinsulfat C med lott nr. 802-2. Den oppnådde oppløsning ble blandet med 6,95 mg av den aktive ester med lott nr. GMS-1 oppløst i dimetylformamid. Etter inkubasjon av den oppnådde blanding ved romtemperatur i tyve timer ble reaksjonsblandingen blandet med natriumacetatmettet etanol for å presipitere reaksjonsproduktet som deretter ble samlet ved filtrering. Det samlede presipitat ble oppløst i en 0,3 M ammoniumkloridoppløsning og den oppnådde løsning ble underkastet rensing på samme måte som i prosedyren i eksempel 1-(2)-1) til å gi 38 mg av den ønskede forbindelsen (lott nr. 902-2).

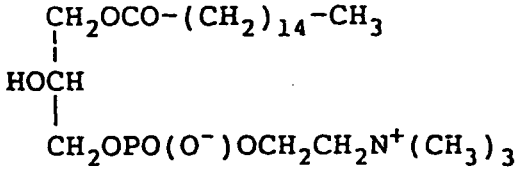
Stearinsyreinnhold: 0,86 %

Chondroitinsulfat C innhold: 98,2 %

(4) Fremstilling av ravsyrederivat av fosfolipid.

1) Fremstilling av ravsyreester av lysolecitin.

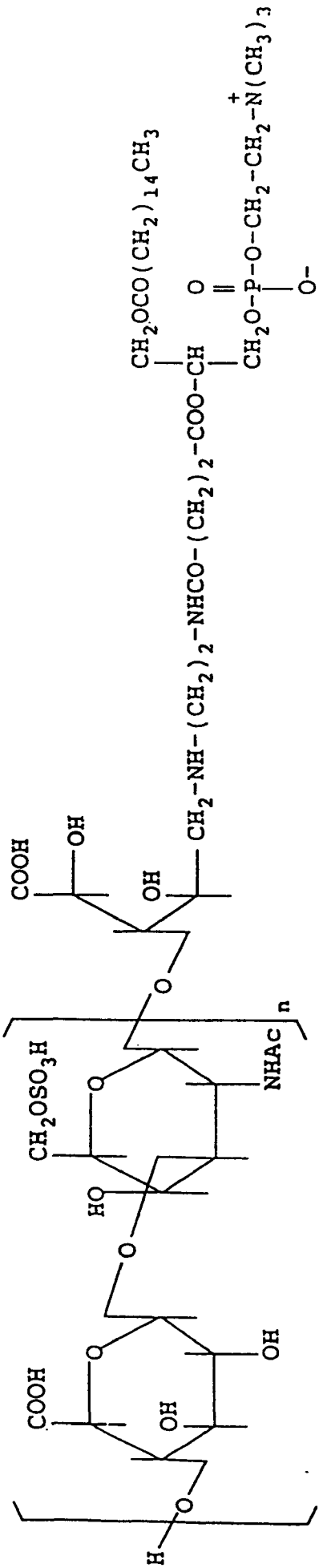
I 200 ml kloroform ble det oppløst 495 mg lysolecitin med den følgende formel:



Til den oppnådde oppløsning ble det tilsatt 100 mg ravsyreanhydrid og 79 mg pyridin. Etter inkubasjon av blandingen ved romtemperatur i tyve timer ble blandingen konsentrert under redusert trykk til å gi et presipitat. Det dannede presipitat ble rekrystallisert fra aceton til å gi en ravsyreester av lysolecitin.

2) Fremstilling av aktiv ester fra ravsyreester av lysolecitin med N-hydroksyravsyreimid.

288,5 mg av esteren oppnådd i det foregående ble oppløst i dimetylformamid, og løsningen ble blandet med 57,5 mg N-hydroksyravsyreimid og 103 mg dicykloheksylkarbodiimid. Etter inkubasjon av den således fremstilte blanding ved romtemperatur i tyve timer ble presipiterte materialer fjernet fra den oppnådde reaksjonsblanding til å gi en dimetylformamidoppløsning av den ønskede aktive ester.



n: gjennomsnitt 60

(5) Fremstilling av lysolecitinbundet glykosaminglykan.

Fremstilling av lysolecitinbundet chondroitinsulfat C.

Dimetylformamidoppløsningen av den aktive ester oppnådd i den ovennevnte prosedyre (4)-2) ble blandet med en vandig løsning av 1 g av den reduserende terminus-aminerte chondroitinsulfat C med lott nr. 802-2, og blandingen ble inkubert ved romtemperatur i tyve timer for å bevirke reaksjonen. Rensing av reaksjonsproduktet ble gjennomført ved hydrofob kromatografi i overensstemmelse med prosedyren i eksempel 1.

Utbytte:	0,52 g
Fosforinnhold:	0,105 %
Lysolecitininnhold:	1,96 %
Chondroitinsulfatinnhold:	98,04 %
Svovelinnhold:	5,78 %

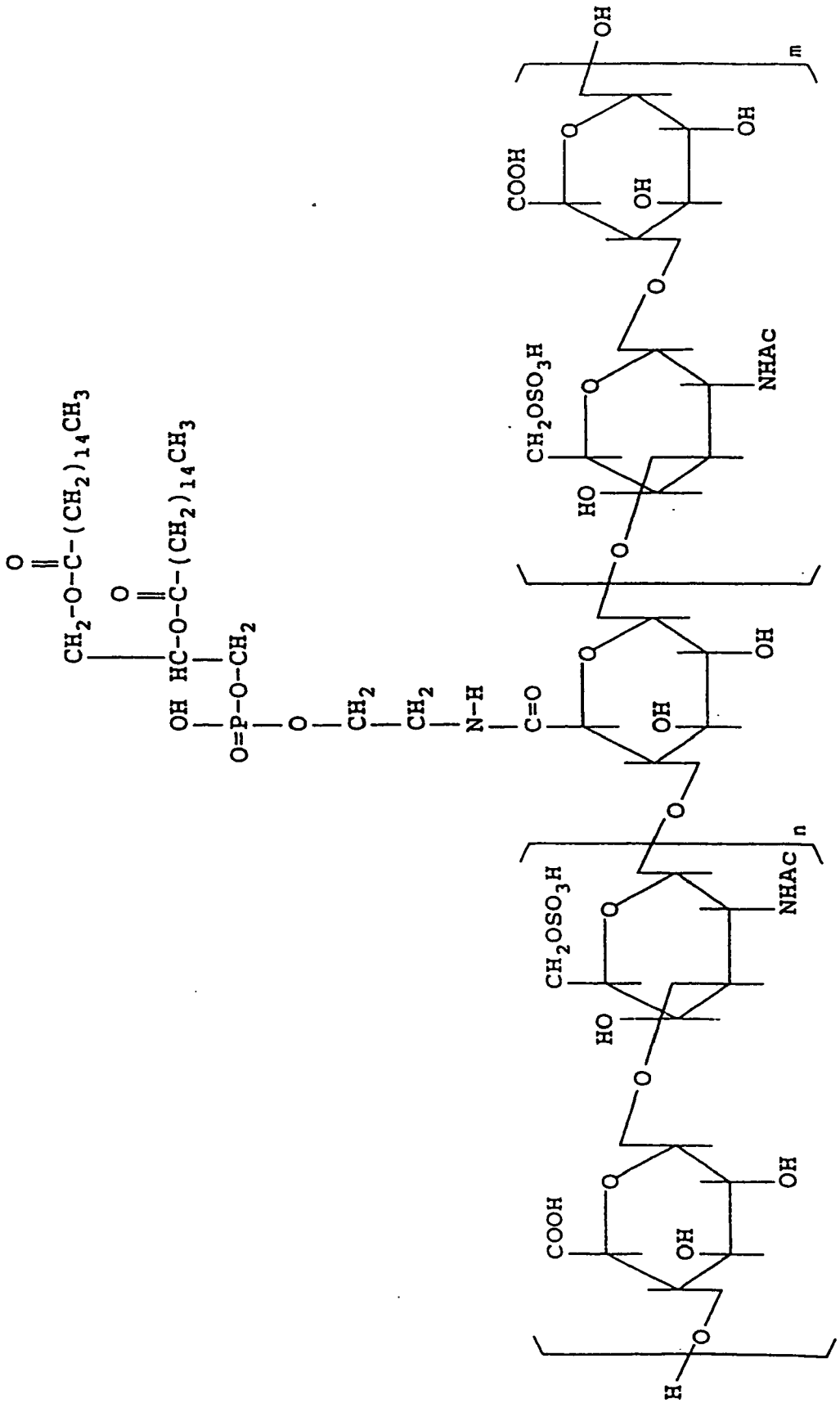
(6) Fremstilling av glyseroldistearatbundet chondroitinsulfat C.

En aktiv ester av en ravsyreester av glyseroldistearat ble fremstilt i henhold til den ovennevnte prosedyre (2)-2) (lott nr. GDS-2). Denne fikk reagere med reduserende terminus-aminert chondroitinsulfat C (lott nr. 802-2) oppnådd i den ovennevnte prosedyre (1)-1) i overensstemmelse med den ovennevnte prosedyre (3), med etterfølgende rensing. 27 mg av den ønskede forbindelse ble således oppnådd (lott nr. 904).

EKSEMPEL 4

Fremstilling av fosfolipidbundet glykosaminglykan ved anvendelse av kondensasjonsmiddel

(1) Fremstilling av L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoyl-bundet chondroitinsulfat C.



m+n: gjennomsnitt 60

400 mg tri-n-butylaminsalt av chondroitinsulfat C (CS(S3)) ble oppløst i 100 ml dimetylformamid. Til den oppnådde oppløsning ble det tilsatt 6,92 mg PPEADP oppløst i kloroform og 38,4 mg 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid-hydroklorid. Den oppnådde blanding ble inkubert ved romtemperatur i tyve timer for å bevirke reaksjonen. Etter konsentrering under redusert trykk ble et overskuddsvolum av en natriumacetatløsning tilsatt til konsentratet for å omdanne reaksjonsproduktet til natriumsalt. Etanol ble tilsatt dertil for å presipitere saltet og det således dannede presipitat ble samlet ved filtrering. Presipitatet ble oppløst i en 0,3 M ammoniumkloridløsning og deretter underkastet rensing i overensstemmelse med prosedyren i eksempel 1-(2)-1). Det ble således oppnådd 63 mg av den ønskede forbindelse (lott nr. 1002-2).

Fosforinnhold:	0,099 %
PPEADP innhold:	2,25 %
Chondroitinsulfat C innhold:	96,61 %

Hydrofobt kromatogram:

Vist i fig. 4.

Målebetingelser er de samme som beskrevet over.

(2) Fremstilling av andre L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoylbundne glykosaminglykaner (GAG-PPEADP).

Fosfolipidbundne glykosaminglykaner ble fremstilt fra forskjellige glykosaminglykaner og PPEADP i overensstemmelse med den ovennevnte prosedyre (1) under de betingelser som er vist i tabell L. Resultatene fra analysene av de således oppnådde produkter er vist i tabell M.

TABELL L

Lott nr.	Produkt	Reaksjonsbetingelser GAG*/PPEADP/WSC (mg/mg/mg)
1000	HAl-PPEADP	420/20.76/103
1001	CH-PPEADP	420/13.84/68.8
1002-1	CS(S1)-PPEADP	400/20.76/103
1002-3	CS(S6)-PPEADP	400/3.46/17.2
1003	CS(2)-PPEADP	400/6.92/34.3
1004	DS-PPEADP	40/1.38/6.88
1005	Hep-PPEADP	400/13.8/68.8
1006	HS-PPEADP	13/0.46/2.3

*1: tri-n-butylaminsalt

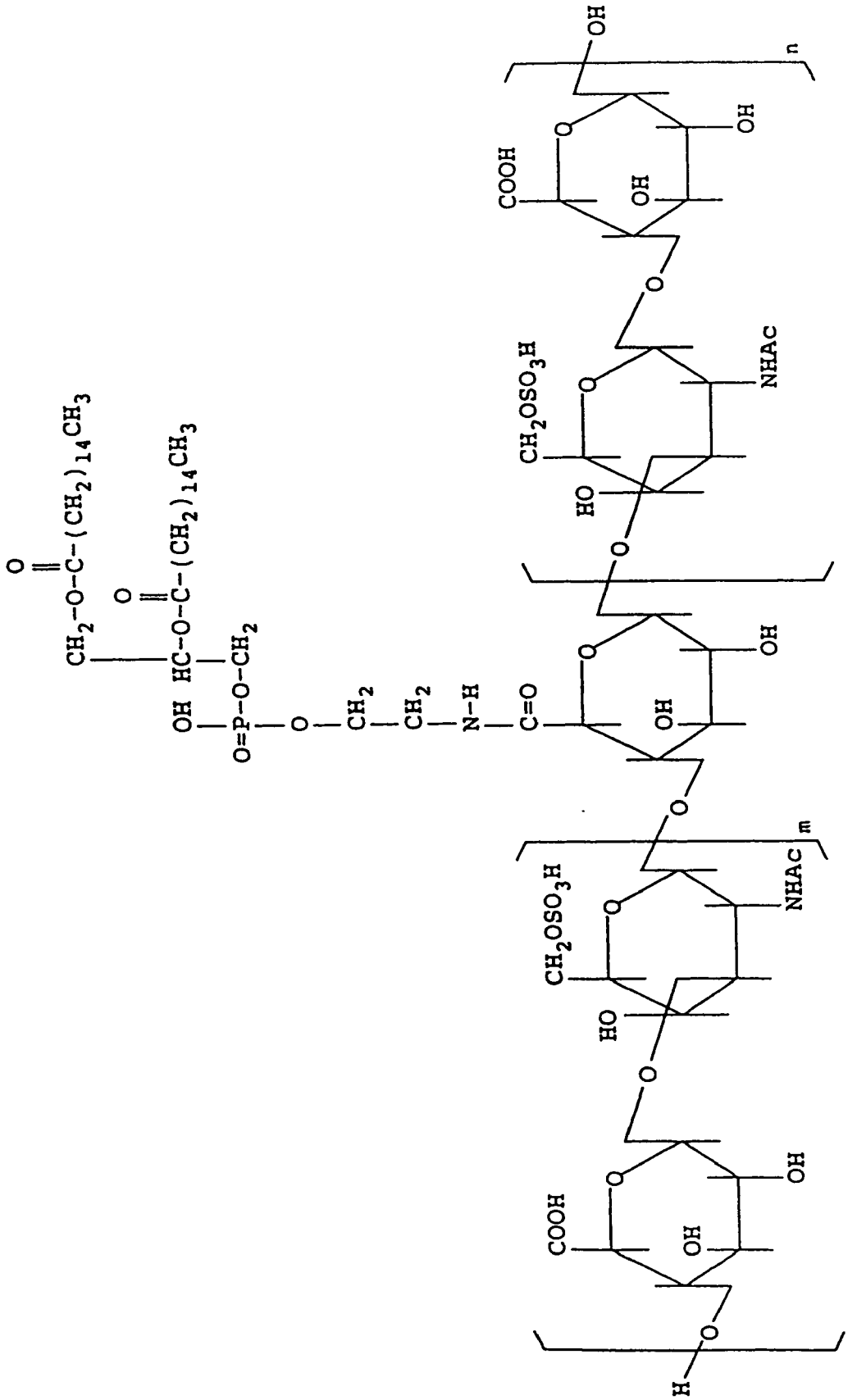
TABELL M

Lott nr.	Produkt	Utbytte (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
1000	HAl-PPEADP	28	6.21	90.05
1001	CH-PPEADP	25.8	4.01	88.64
1002-1	CS(S1)-PPEADP	51.9	5.28	92.40
1002-3	CS(S6)-PPEADP	42.2	1.04	97.81
1003	CS(W)-PPEADP	41.9	2.17	96.62
1004	DS-PPEADP	29	4.41	89.12
1005	Hep-PPEADP	101.3	4.04	90.03
1006	HS-PPEADP	1.2	4.00	88.22

EKSEMPEL 5

Fremstilling av fosfolipidbundet glykosaminglykan ved glykosaminglykanaktiveringsmetoden.

(1) Fremstilling av L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoyl-bundet chondroitinsulfat C.



m+n: gjennomsnitt 60

400 mg tri-n-butylaminsalt av chondroitinsulfat C (CS(S3)) ble oppløst i 300 ml DMF. Til den oppnådde oppløsning ble det tilsatt 9,9 mg N-hydroksysuccinimid og 20,6 mg dicykloheksylkarbodiimid. Den oppnådde blanding ble inkubert ved romtemperatur i tyve timer. Et overskuddsvolum av en vandig natriumacetatløsning ble tilsatt til den oppnådde reaksjonsblanding for å omdanne reaksjonsproduktet til natriumsalt, etterfulgt av tilsetning av etanol for å samle dannet presipitat ved filtrering. Det således samlede presipitat ble umiddelbart oppløst i 30 ml vann, og løsningen ble blandet med 6,92 g PPEADP oppløst i kloroform. Dimetylformamid ble videre tilsatt dertil for å oppnå en ensartet løsning. Etter inkubasjon av den således oppnådde løsning ved romtemperatur i seks timer ble reaksjonsblandingen konsentrert under redusert trykk og deretter blandet med eddiksyremettet etanol til å danne et presipitat. Det således dannede presipitat ble deretter samlet ved filtrering og oppløst i en 0,3 M ammoniumacetatløsning med etterfølgende rensing i overensstemmelse med prosedyren i eksempel 1-(2)-1). 29,7 mg av den ønskede forbindelse (lott nr. 1102-2) ble oppnådd.

Fosforinnhold:	0,100 %
PPEADP innhold:	2,16 %
Chondroitinsulfat C innhold:	95,68 %

Hydrofobt kromatogram:

Vist i fig. 5.

Målebetingelser er de samme som beskrevet over.

(2) Fremstilling av L-(α-fosfatidyl)etanolamin-dipalmitoyl-bundet chondroitinpolysulfat.

1 g tri-n-butylaminsalt (svovelinnhold 13,0 %, molekylvekt 10.000) av chondroitinpolysulfat (CSP(II)) ble oppløst i 50 ml dimetylformamid. Til den oppnådde oppløsning ble det tilsatt 1770 mg N-hydroksysuccinimid og 318 mg dicykloheksylkarbodiimid. Den oppnådde blanding ble inkubert over natten ved 4°C. Deretter ble det tilsatt 10 ml vann til reaksjonsblandingen og denne fikk reagere ytterligere ved romtemperatur i femten minutter. Etter at det dannede presipitat var fjernet ble den oppnådde løsning blandet med

69,2 g fosfatidyletanolamin-dipalmitoyl (PPEADP) oppløst i kloroform og blandingen fikk reagere ved romtemperatur i seks timer. Den oppnådde reaksjonsblanding ble konsentrert under et redusert trykk og deretter blandet med natriumacetatmettet etanol til å danne et presipitat. Deretter ble det dannede presipitat samlet ved filtrering og oppløst i en 0,3 M ammoniumacetatløsning, med etterfølgende rensing i overensstemmelse med prosedyren i eksempel 1-(2)-1). Det ble således oppnådd 67 mg av den ønskede forbindelse (lott nr. 1108).

Fosforinnhold:	0,291 %
PPEADP innhold:	6,5 %
Chondroitinpolysulfatinnhold:	92,8 %
Svovelinnhold:	12,05 %

Hydrofobt kromatogram:

Vist i fig. 6.

Målebetingelser er de samme som beskrevet over.

EKSEMPEL 6

Adhesjon av BHK-celler til et fosfilipid- eller lipidbundet glykosaminglykanlag laminert på en fibronektinbelagt indre vegg i en dyrkingsskål.

Hver brønn i en inkubasjonsplate med 96 brønner ble belagt med 100 µl av en 5 µg/ml oppløsning av bovint serumavledet fibronektin. Etter vasking ble hver brønn ytterligere belagt med 100 µl av hver av de fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner oppnådd i eksemplene 1 til 5, med deres konsentrasjoner vist i tabell N.

Separat ble BHK-celler (nyreceller fra nyfødt hamster), som var dyrket i en skål med diameter 100 mm, behandlet med 5 ml av en 0,1 mg/ml trypsinoppløsning ved 37°C i fem minutter. Til de således behandlede celler ble det tilsatt 5 ml av en 1 mg/ml oppløsning av soyabønnetrypsininhibitor for å inaktivere trypsin. De således separerte celler ble deretter samlet ved sentrifugering, vasket to ganger og deretter omgjort til en eneste cellesuspensjon med densitet på $1x10^5$ celler/ml.

En 100 µl porsjon av den således oppnådde enkle cellesuspensjon ($1x10^4$ celler) ble helt i hver brønn i inkubasjonsplaten som var dobbeltbelagt med fibronektin og et fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan som beskrevet over. Etter inkubasjon ved 37°C i en time ble celler som ikke hadde festet seg vasket ut og de gjenværende festede celler ble fiksert med 2 % formaldehyd og observert direkte i et fasekontrastmikroskop for å telle antall festede celler.

Tabell N viser de konsentrasjonsavhengige forandringer i antall festede celler. Hver av dataene ble uttrykt som gjennomsnittsverdi av tre eller fire målinger. Feil (standard avvik) i hvert eksperiment er også vist.

Når frie glykosaminglykaner eller ubundne lipider ble anvendt i stedet for fosfolidpid- eller lipidbundne glykosaminglykaner, viste de ingen celleadhesjonsinhiberende virkning selv ved høye konsentrasjoner.

TABELL N

Prøve (µg/ml)	Lott nr. 302-3 CS(S6)-PPEADP	600 HA1-PPEADP	601 CH-PPEADP	602 CS(S1)-PPEADP	602-2 CS(S3)-PPEADP	602-3 CS (S6)-PPEADP	604 DS-PPEADP
0.1					98.7%±0.9%	98.9%±0.9%	
0.2				87.4%±8.8%	82.4%±3.8%	89.3%±0.5%	85.8%±4.6%
0.5				89.1%±15.3%	49.8%±4.6%	85.0%±1.1%	80.2%±3.6%
1	91.4%±6.8%			50.2%±5.2%	44.7%±6.8%	40.0%±3.6%	- ± -
2	60.9%±4.5%		85.0%±2.6%	33.5%±6.9%	35.4%±9.5%	12.7%±1.0%	- ± -
5	23.0%±0.2%	73.5%±1.3%	81.6%±6.0%	24.4%±0.5%	4.3%±1.3%	1.6%±0.7%	14.9%±2.0%
10	1.3%±1.2%	72.5%±8.8%	80.5%±6.9%	12.8%±2.4%	2.8%±0.4%	1.3%±0.5%	6.7%±1.2%
20		29.9%±2.6%	63.8%±2.7%	3.2%±1.1%	0.7%±0.1%	0.0%±0.0%	2.4%±0.9%
50		3.6%±0.5%	65.5%±10.0%				0.9%±0.6%
100		0.8%±0.1%	44.4%±4.2%				
200		0.3%±0.2%	33.8%±3.8%				
500							

TABELL N (forts.)

Prøve (µg/ml)	Lott nr. 605 Hep-PPEADP	606 HS-PPEADP	1000 HA1-PPEADP	1002-2 CS (S3)-PPEADP	1004 DS-PPEADP	1005 Hep-PPEADP
0.1						
0.2						
0.5						
1				88.3%±16.6%		
2	86.7%±1.3%			57.6%±4.8%	99.3%±7.8%	
5	76.1%±5.4%	14.9%±0.6%		19.6%±4.4%	89.9%±0.4%	
10	60.5%±6.9%	5.7%±0.5%		7.5%±3.7%	75.6%±4.9%	
20	44.0%±5.0%	2.0%±0.3%	95.6%±4.8%		65.0%±5.7%	95.3%±0.9%
50	46.0%±7.5%	1.3%±0.4%	80.5%±5.4%		56.2%±1.1%	75.0%±12.1%
100	17.3%±3.4%	1.0%±0.1%	73.5%±0.6%		43.7%±4.9%	55.9%±1.1%
200	11.6%±2.2%	0.9%±0.0%	55.0%±0.3%			45.1%±1.0%
500						

EKSEMPEL 7

Virkning av fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan for inhibering av celleadhesjon av forskjellige dyrkede cellelinjer ved hjelp av celleadhesjonssubstans.

Fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner oppnådd i eksempler 1 til 5 ble undersøkt for deres virkninger vedrørende inhibering av celleadhesjon av forskjellige cellelinjer ved hjelp av celleadhesjonssubstanser, ved anvendelse av BHK 21 (nyreceller fra nyfødt hamster), CEF (embryofibroblastcelle fra fjærkre), B16F10 (svært metastatisk melanomacelle fra mus), CHO (ovariecelle fra kinesisk hamster) og baEC (bovin aorta endotelcelle) som cellelinjene, og fibronektin (FN), laminin (LN), type I kollagen (ColI) og vitronektin (VN) som celleadhesjons-substanser.

En 5 μg/ml porsjon av hvert fibronektin avledet fra bovint blodplasma, laminin fra EHS tumorcelle fra mus, type I kollagen fra rottelår og serumavledet bovint vitronektin ble belagt på en inkubasjonsplate med 96 brønner, og hvert av fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner oppnådd i eksempel 1 til 5 ble videre belagt på samme måte som i eksempel 6. Deretter ble en 100 μl porsjon av en enkelt cellesuspensjon ($1x10^4$ celler) av hver av BHK 21, CEF, B16F10, CHO og baEC cellene helt inn i hver brønn for å observere forandringer i celleadhesjonen. Som kontroll ble den samme prosedyre gjentatt med unntak av at fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan ikke ble anvendt, og den oppnådde celleadhesjon ble uttrykt som 100 %. Resultatene er vist i tabell O.

I tabell O er antall relativt festede celler uttrykt semi-kvantitativt som "-" for ingen eller liten adhesjon (0 til mindre enn 10 %), "+" for 10 til mindre enn 30 %, "++" for 30 til mindre enn 50 %, "+++" for 50 til mindre enn 70 %, "++++" for 70 til mindre enn 90% og "+++++" for 90 til 100 % adhesjon.

TABELL 0

Lott nr.	Mengde (µg/ml)	Celler/celleadhesjonssubstans (5 µg/ml) BHK 21 FN	BHK 21 VN	CEF FN	CEF VN	B16F10 FN	B16F10 LN	CHO FN	CHO LN
300(HA1-PPEADP)	10	+							
	100								
301(CH-PPEADP)	10	+++++		++++					
	100	+++		+++					
302(CS(S1)-PPEADP)	10	+++	+	++					
	100	++	-	-	-	-	-	-	-
302-2(CS(S3)-PPEADP)	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-					
302-3(CS(S6)-PPEADP)	10	++	++					++	+
	100	+	+					-	-
303(CS(W)-PPEADP)	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-
304(DS-PPEADP)	10	+++							
	100								
305 (Hep-PPEADP)	10	+++++							
	100	+++							

TABELL 0 (forts.)

Lott nr.	Mengde (µg/ml)	Celler/celleadhesjonssubstans (5 µg/ml) BHK 21 FN	BHK 21 VN	CEF FN	CEF VN	B16F10 FN	B16F10 LN	CHO FN	CHO LN
600(HA1-PPEADP)	10	+++							
	100								
601(CH-PPEADP)	10	+++				+++			
	100	+				+			
602(CS(S1)-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
602-2(CS(S3)-PPEADP)	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-
702-2(CS(S3-P·S)	10	-	-	-					
	100	-	-	-					
602-3(CS(S6)-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
604(DS-PPEADP)	10	-				-			
	100	-				-			
605 (Hep-PPEADP)	10	+++				++			
	100	+				+			
606(HS-PPEADP)	10	+				+			
	100	-				-			
902-2(CS(S3)-GMS)	10	+++++							
	100	+++							
904(CS(S3)-GDS)	10	+++							
	100	+							

TABELL 0 (forts.)

Lott nr.	Mengde (µg/ml)	Celler/celleadhesjonssubstans (5 µg/ml) baEC FN	baEC ColI
600(HA1-PPEADP)	10	+	++
	100	-	-
601(CH-PPEADP)	10	++++	++++
	100	++	++
602(CS(S1)-PPEADP)	10	-	+
	100	-	-
602-2(CS(S3)-PPEADP)	10	-	-
	100	-	-
602-3(CS(S6)-PPEADP)	10	-	-
	100	-	-
604(DS-PPEADP)	10	-	++
	100	-	-
605 (Hep-PPEADP)	10	++	+++
	100	+	++
606(HS-PPEADP)	10	++	++
	100	-	-
HA1	100	+++++	+++++
CH	100	+++++	+++++
CS(S1)	100	+++++	+++++
CS(S3)	100	+++++	+++++
CS(S6)	100	+++++	+++++
DS	100	+++++	+++++
Hep	100	+++++	+++++
HS	100	+++++	+++++
PPEADP	100	+++++	+++++

TABELL 0 (forts.)

Lott nr.	Mengde (µg/ml)	Celler/celleadhesjonssubstans (5 µg/ml) BHK 21 FN	BHK 21 VN	CEF FN	CEF VN	B16F10 FN	B16F10 LN	CHO FN	CHO LN
1000(HA1-PPEADP)	10	+++++							
	100	++++							
1001(CH-PPEADP)	10	+++++		++++					
	100	+++		+++					
1002(CS(S1)-PPEADP)	10	+++	+	++					
	100	++	-	-					
1002-2(CS(S3)-PPEADP)	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-
1002-3(CS(S6)-PPEADP)	10	++	++						
	100	+	+						
1003(CS(W)-PPEADP)	10	-	-	-					
	100	-	-	-					
1004(DS-PPEADP)	10	++++							
	100	++							
1005 (Hep-PPEADP)	10	+++++							
	100	+++							
1006(HS-PPEADP)	10	++							
	100								
1108(CPS(II)-PPEADP)	10			+++					
	100			+					

305368

TABELL 0 (forts.)

Lott nr.	Mengde (µg/ml)	Celler/celleadhesjonssubstans (5 µg/ml)							
		BHK 21		CEF		B16F10		CHO	
		FN	VN	FN	VN	FN	LN	FN	LN
HA1	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
HA5	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
HA15	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CH	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS(S1)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS(S3)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS(S6)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS(W)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
DS	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Hep	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
HS	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
KS	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CPS(II)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
PPEADP	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

EKSEMPEL 8

Virkning av fosfolipidbundet chondroitinsulfat C for inhibering av adhesjon av svært metastatiske kreftceller til ekstracellulær matriks i dyrkede endotelceller fra blodkar

Endotelceller fra blodkar hos mus ble dyrket på en inkubasjonsplate med 24 brønner som var belagt med type I kollagen slik at cellene vokste sammenløpende. Et enkelt lag av cellene ble behandlet med 0,5 % Triton X-100 ved romtemperatur i tretti minutter, og de således desintegrerte fragmenter av cellelaget ble vasket med Dulbeccos PBS(+) buffer for å oppnå ekstracellulær matriks av endotelceller.

Separat ble museavledede svært metastatiske kreftceller (B16F10) som var dyrket i en skål med diameter 100 mm, behandlet med 5 ml av en trypsinløsning (0,1 mg/ml PBS(-)) ved 37°C i fem minutter. Til de således behandlede celler ble det tilsatt 5 ml av en 1 mg/ml oppløsning av soyabønnetrypsininhibitor for å inaktivere trypsin. Deretter ble de således separerte celler samlet ved sentrifugering, vasket to ganger med en fosfatbuffer (PBS (-)) og deretter samlet i en enkelt cellesuspensjon (Hanks BSS - 20 mM HEPES, pH 7,4), med en densitet på $2x10^5$ celler/ml.

Det fosfolipidbundne chondroitinsulfat C (CS(S3)-PPEADP) med lott nr. 602-2, og 500 µl av den således fremstilte cellesuspensjon av B16F10 ($1x10^5$ celler) ble overført til hver brønn i den ovennevnte inkubasjonsplate med 24 brønner som inneholdt ekstracellulær matriks og inkubert ved 37°C i en time i en inkubator som var fylt med 5 % karbondioksyd.

Supernatantfluidet i hver brønn ble forsiktig fjernet, resten ble vasket forsiktig en gang med Hanks buffer og begge de flytende porsjoner ble kombinert. Deretter ble antall celler i den kombinerte prøve telt ved anvendelse av en celleteller (Coleter Electronics) for å telle celler som ikke var festet til den ekstracellulære matriks. En bufferløsning som ikke inneholdt forbindelsen med lott nr. 602-2 (ingen tilsetning) og en buffer som inneholdt fritt chondroitinsulfat C ble anvendt som kontroller.

Adhesjonsforholdet for cellene ble beregnet ved at antall telte ikke-festede celler ble substrahert fra det totale antall celler som opprinnelig var tilsatt med divisjon av resten med totalt celler. Resultatene er vist i tabell P.

TABELL P

Prøve	Tilsatt mengde	Adhesjonsforhold
Ingen tilsetning	-	82,8 %
Fritt chondroitinsulfat C	50 µg	82,6 %
602-2 (CS(S3)-PPEADP)	50 µg	50,7 %

Fra de ovennevnte resultater sees det klart at det fosfolidpidbundne glykosaminglykan i henhold til den foreliggende oppfinnelse kan inhibere adhesjon av svært metastatiske kreftceller til ekstracellulære matrikser fra blodkar-endotelceller, mens fritt chondroitinsulfat C ikke kan utvise en slik effekt.

EKSEMPEL 9

Effekt av fosfolipidbundet chondroitinsulfat C for å inhibere metastase av svært metastatiske kreftceller.

Svært metastatiske kreftceller avledet fra mus (B16F10) dyrket i en skål med diameter 100 mm ble behandlet med 5 ml av en EDTA-oppløsning (0,02 %/PBS (-)) ved 37°C i fem minutter etterfulgt av celleseparasjon ved pipettering. Cellene ble samlet ved sentrifugering, vasket to ganger med en fosfatbuffer (PBS (-)) og deretter kombinert til en eneste cellesuspensjon med en densitet på $1x10^{-6}$ celler/ml. En 0,1 ml porsjon av denne cellesuspensjon (10^5 celler) ble blandet med 0,1 ml av en PBS oppløsning av det fosfolipid-bundne glykosaminglykan (CS(S3)-PPEADP) med lott nr. 602-2 (0,1 mg, 1 mg eller 5 mg/0,1 ml) og den oppnådde blanding ble tilført til C57BL/6 mus gjennom halevenen. Toraktomi ble gjennomført to uker etter tilførselen for å telle antall melanomkolonier metastasert til lungenes overflate. En bufferløsning som inneholdt (CS(S3)-PPEADP) forbindelse med lott nr. 602-2 (ingen tilsetning), og en buffer som inneholdt fritt chondroitinsulfat C ble anvendt som kontroller.

Tabell Q viser resultatene fra telling av kolonier som var metastasert til lungenes overflate pr. mus.

TABELL Q

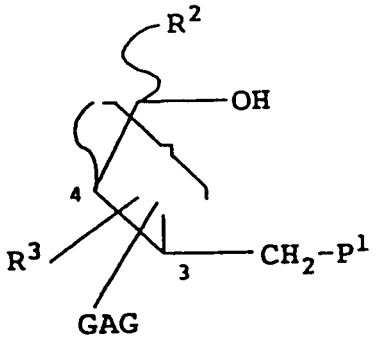
Prøve	Dose (mg/mus)	Kolonier (antall/mus)
Ingen tilsetning	-	49,9±32,3
Fritt chondroitinsulfat C	5 mg	24,0± 8,0
602-2 (CS(S3)-PPEADP)	0,1 mg	47,2±28,
	1 ml	22,0±14,8
	5 mg	4,0± 3,5

Metastaser av kreftceller ble inhibert når dosen av det fosfolipidbundne chondroitinsulfat C økte. Som det klart fremgår fra disse resultatene kan fosfolipidbundet glykosaminglykan fremstilt i henhold til oppfinnelsen inhibere metastaser av svært metastatiske kreftceller. Fritt chondroitinsulfat C inhiberer også metastasene, men denne virkning var lavere enn virkningen av fosfolipidbundet chondroitinsulfat C ($p<0,001$).

De fosfolipid- eller lipidbundne glykosaminglykaner eller deres salter fremstilt i henhold til oppfinnelsen som har celleadhesjonsinhiberende aktivitet og som er uten toksisitet, er nyttige som metastaseinhibitorer.

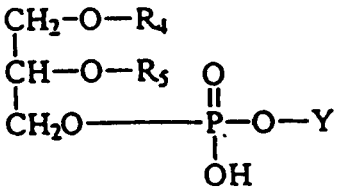
PATENTKRAV

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



(I)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)



(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\underset{COOH}{|}}{C}HNH-$, og

(1) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat eller heparin med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel eller når GAG er en glykosaminglykanrest av dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

2) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat K eller chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

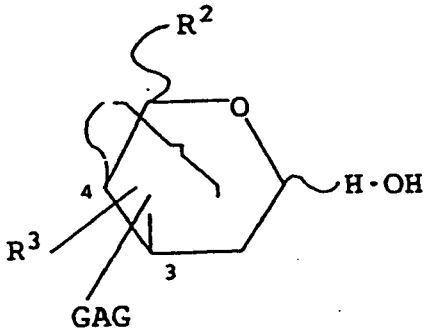
3) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OH-gruppe, og R^3 er en OH-gruppe når

GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel, og

4) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel; eller et farmasøytisk tålbart salt derav,

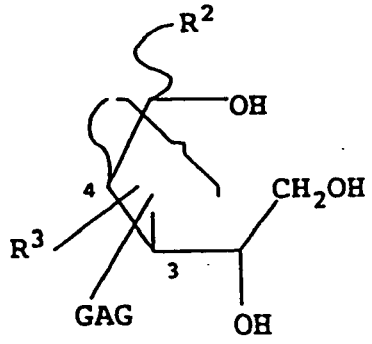
k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene med:

reduksjon og spalting av den reduserende terminale gruppe i et glykosaminglykan med formelen (I-1):



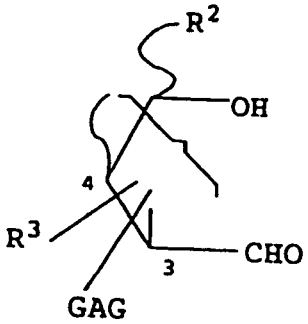
(I-1)

med oppnåelse av et redusert produkt med formelen (I-2):



(I-2)

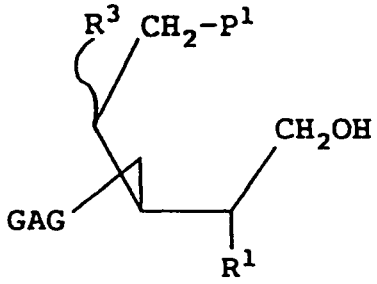
hvoretter det reduserte produkt oksyderes for å oppnå et oksydert produkt med formelen (I-3):



(I-3)

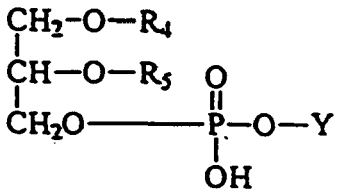
og hvoretter den således dannede aldehydgruppe i det oksyderte produkt får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, hvori GAG, R^2 og R^3 i de ovennevnte formler er som angitt i det foregående, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til farmasøytisk tålbart salt derav.

2. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



(II)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)



(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\underset{COOH}{|}}{C}HNH-$, og

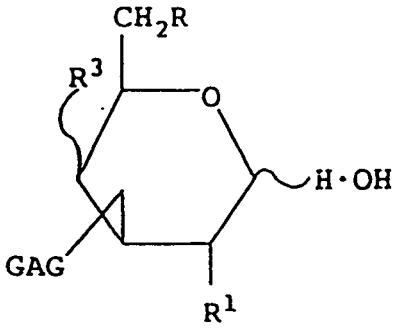
1) R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre eller chondroitin med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

2) R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat A eller K, chondroitinpolysulfat eller dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel, og

3) hver av R^1 og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat eller keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel; eller et farmasøytisk tålbart salt derav,

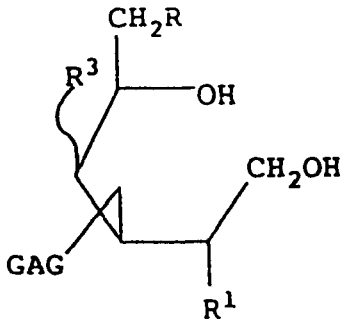
k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene med:

reduksjon og spalting av den reduserende terminale gruppe i et glykosaminglykan med formelen (II-1):



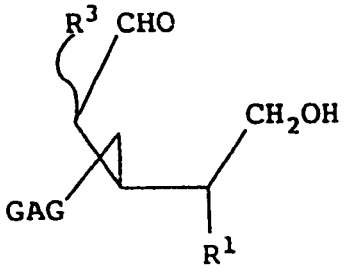
(II-1)

med oppnåelse av et redusert produkt med formelen (II-2):



(II-2)

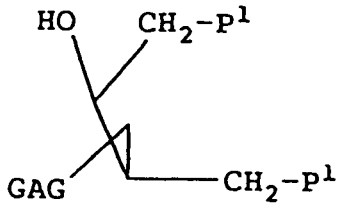
hvoretter det reduserte produkt oksyderes for å oppnå et oksydert produkt med formelen (II-3):



(II-3)

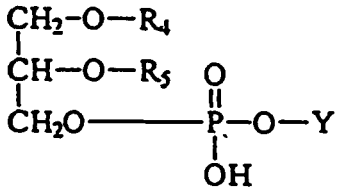
og hvoretter den således dannede aldehydgruppe i det oksyderte produkt får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, hvori GAG, R^1 og R^3 i de ovennevnte formler er som angitt i det foregående og R er en OH- eller OSO_3H-gruppe, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

3. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



(III)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)

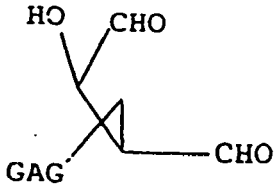


(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{C}}HNH-$, og GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat eller keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel; eller et farmasøytisk tålbart salt derav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene med:

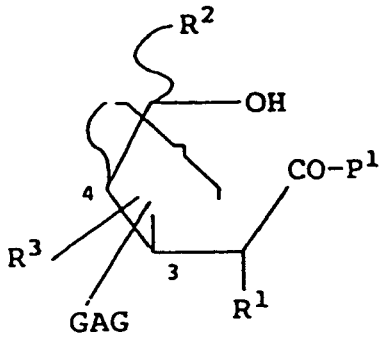
oksydasjon av det reduserte produkt med formelen (II-2) som angitt i krav 2 for å oppnå et oksydert produkt med formelen (11):



(11)

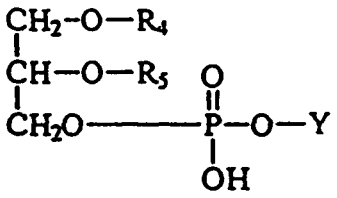
hvori GAG er som angitt i det foregående og hvoretter den således dannede aldehydgruppe i det oksyderte produkt får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

4. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med formelen



(IV)

hvori P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formelen (IX)



(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller COR_7 (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH$ eller $-CH_2\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{C}}HNH-$, og

1) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en OH-gruppe, R^2 er en COOH-gruppe, og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin eller heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel eller når GAG er en glykosaminglykanrest av dermatansulfat, med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

2) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en OSO_3H-gruppe, R^2 er en COOH-gruppe og R^3

er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat D med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel eller når GAG er en glykosaminglykanrest av heparin eller heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

3) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en OH-gruppe, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat K med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

4) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, minst en av R^1 og R^3 er en OSO_3H-gruppe, mens den andre er en OH-gruppe, og R^2 er en COOH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

5) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, hver av R^1 og R^3 er en OH-gruppe og R^2 er en CH_2OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel,

6) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, hver av R^1 og R^3 er en OH-gruppe og R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel,

7) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre eller chondroitin med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

8) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat A eller K, eller dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

9) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av

chondroitinsulfat C eller D med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

10) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R_2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat E med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

11) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe, eller R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe eller en OSO_3H-gruppe, når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

12) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en $NHSO_3H$-gruppe, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av heparin med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

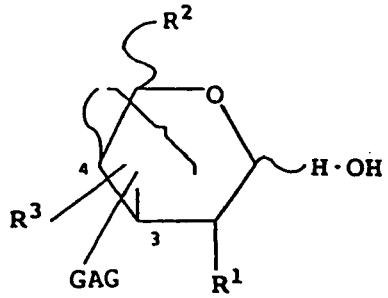
13) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe eller en $NHSO_3H$-gruppe, R^2 er en CH_2OH-gruppe, og R^3 er en OSO_3H-gruppe, eller R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe eller en OSO_3H-gruppe, når GAG er en glykosaminglykanrest av heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel, og

14) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^1 er en $NHCOCH_3$-gruppe, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe, og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat eller keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal heksosamindel,

eller et farmasøytisk tålbart salt derav,

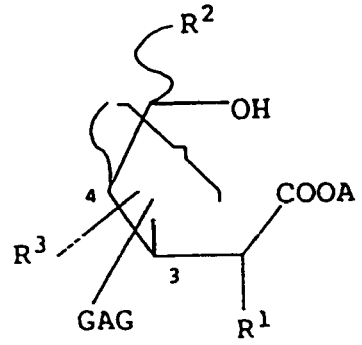
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene med:

oksydasjon og spalting av den reduserende terminale gruppe i et glykosaminglykan med formelen (12):



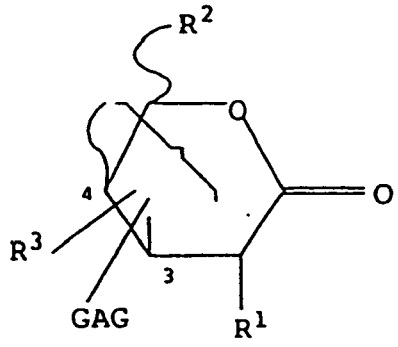
(12)

for derved å oppnå et oksydert produkt med formelen (13):



(13)

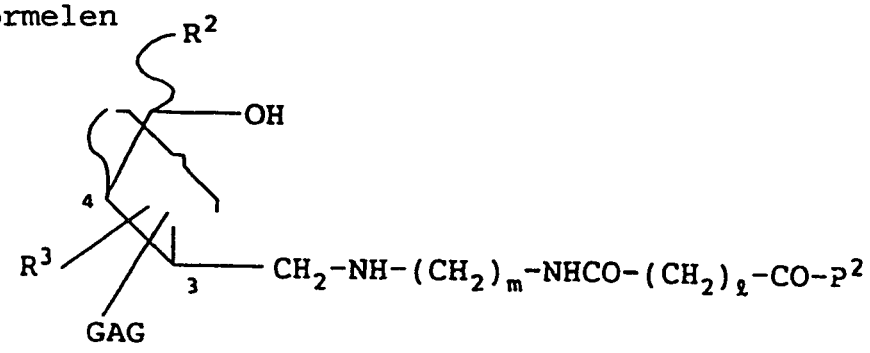
og hvoretter det fra det oksyderte produkt fremstilles et lakton med formelen (14):



(14)

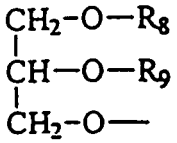
og hvoretter det således fremstilte lakton får reagere med en primær aminogruppe i et fosfolipid, hvori GAG, R^1, R^2 og R^3 i de ovennevnte formler er som angitt i det foregående og A er et alkalimetall, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

5. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan med formelen

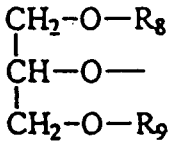


(V)

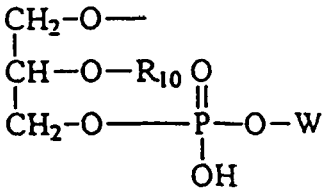
hvori P^2 er et fosfolipid eller et lipid med formelen (X), (XI), (XII) eller (XIII)



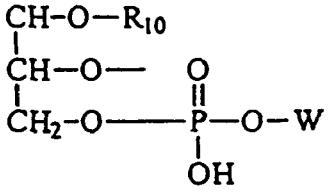
(X)



(XI)



(XII)



(XIII)

hvori R_8 er hydrogen, R_9 er en alkylgruppe, R_{10} er $-CH=CHR_6$ eller $-COR_7$, hvori hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe og W er $-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ eller en inositolrest, m er et helt tall fra 1 til 8, og ℓ er et helt tall fra 1 til 10, og

1) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av hyaluronsyre, chondroitin, chondroitinsulfat A, C eller E, dermatansulfat, heparin eller heparansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel, eller når GAG er en glykosaminglykanrest av dermatansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal iduronsyredel,

2) GAG er plassert i 4-stillingen, R^3 er plassert i 3-stillingen, R^2 er en COOH-gruppe og R^3 er en OSO_3H-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av chondroitinsulfat K eller chondroitinpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal glukuronsyredel,

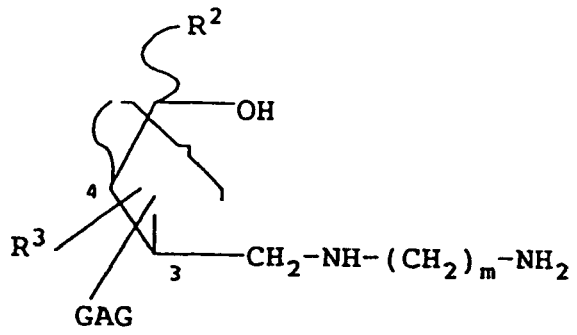
3) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OH-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratansulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel, og

4) GAG er plassert i 3-stillingen, R^3 er plassert i 4-stillingen, R^2 er en CH_2OSO_3H-gruppe og R^3 er en OH-gruppe når GAG er en glykosaminglykanrest av keratanpolysulfat med utelukkelse av en reduserende terminal galaktosedel,

eller et farmasøytisk tålbart salt derav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene med:

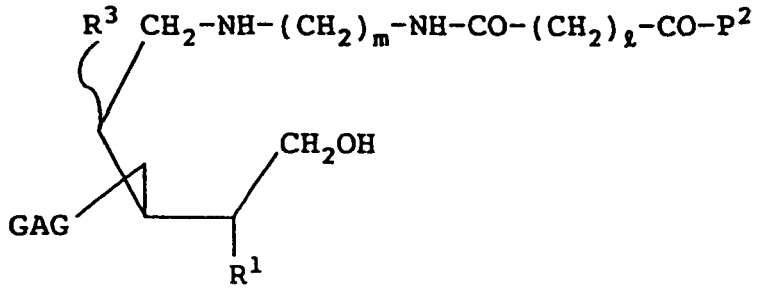
reaksjon av en aldehydforbindelse med formelen (I-3) som angitt i krav 1 med et alkylendiamin for oppnåelse av et derivat med formel (15):



(15)

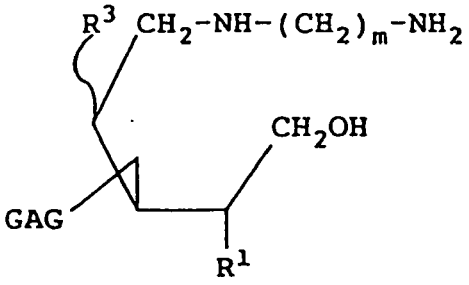
hvori GAG, R^2, R^3 og m er som angitt i det foregående, og hvor et fosfolipid eller et lipid separat får reagere med en dikarboksylsyre eller et dikarboksylsyreanhydrid for å oppnå et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe, og hvor en primær aminogruppe i derivatet med formel (15) får reagere med karboksylgruppen i fosfolipid- eller lipid-derivatet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

6. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan med formelen



(VI)

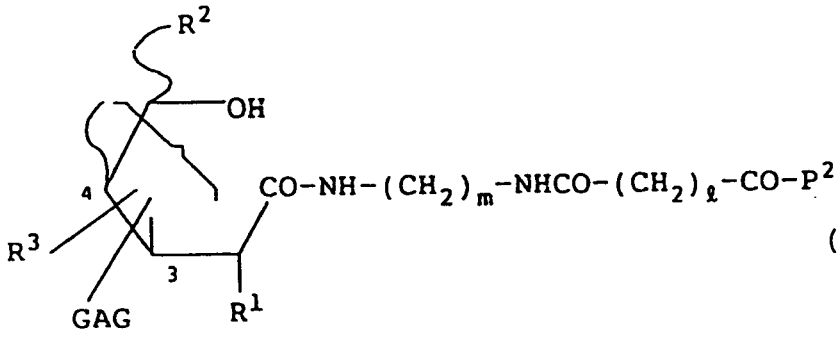
hvori GAG, R^1 og R^3 er som angitt i krav 2, og m, ℓ og P^2 er som angitt i krav 5,
eller et farmasøytisk tålbart salt derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene med:
reaksjon av en aldehydforbindelse med formel (II-3) som angitt i krav 2 med et alkylendiamin med oppnåelse av et derivat med formel (16):



(16)

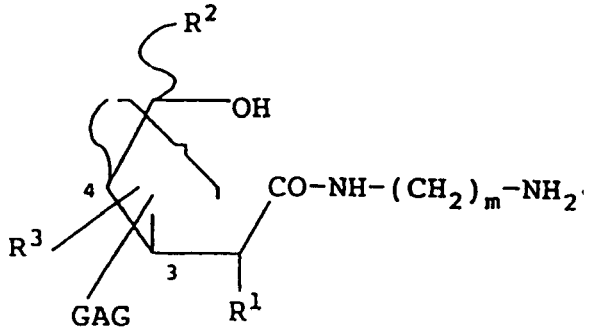
hvori GAG, R^1, R^3 og m er som angitt i det foregående, og hvor et fosfolipid eller et lipid separat får reagere med en dikarboksylsyre eller et dikarboksylsyreanhydrid for å oppnå et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe, og hvoretter en primær aminogruppe i derivatet med formel (16) får reagere med karboksylgruppen i fosfolipid- eller lipid-derivatet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

7. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipid- eller lipidbundet glykosaminglykan med formel



(VII)

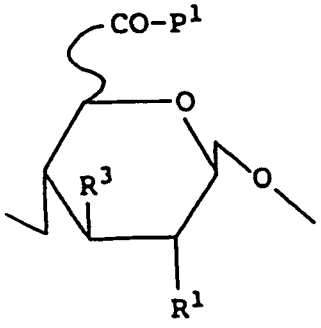
hvori GAG, R^1, R^2 og R^3 er som angitt i krav 4, og m, ℓ og P^2 er som angitt i krav 5,
eller et farmasøytisk tålbart salt derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene med:
reaksjon av en laktonforbindelse med formel (14) som angitt i krav 4 med et alkylendiamin for oppnåelse av et derivat med formel (17):



(17)

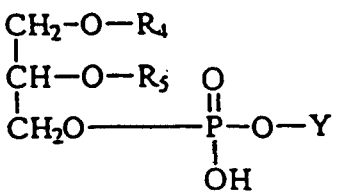
hvori GAG, R^1, R^2, R^3 og m er som angitt i det foregående, og hvor et fosfolipid eller lipid separat får reagere med en dikarboksylsyre eller et dikarboksylsyreanhydrid for å oppnå et fosfolipid- eller lipidderivat med en karboksylgruppe, og hvorpå en primær aminogruppe i derivatet med formel (17) får reagere med karboksylgruppen i fosfolipid- eller lipid-derivatet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

8. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fosfolipidbundet glykosaminglykan med en uronsyredel med formel (VIII)



(VIII)

hvor P^1 er et fosfolipid med en primær aminogruppe med formel (IX)



(IX)

hvor hver av R_4 og R_5 er hydrogen, $-CH=CHR_6$ eller $-COR_7$ (hver av R_6 og R_7 er en C_{6-24} alkylgruppe) og Y er $-CH_2CH_2NH-$ eller

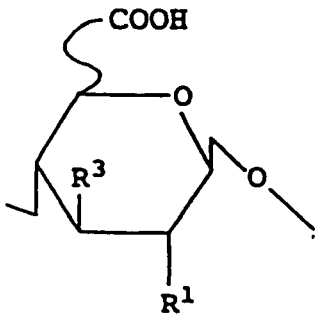
$-CH_2\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{C}}HNH-$, og R_1 og R_3 er uavhengig en OH-gruppe

eller en OSO_3H-gruppe,

eller et farmasøytisk tålbart salt derav,

k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene med:

reaksjon av et glykosaminglykan med en uronsyredel med formel (18)



(18)

hvori R^1 og R^3 er som angitt i det foregående,

med en primær aminogruppe i fosfolipidet i nærvær av et kondensasjonsmiddel, eller

aktivering av en karboksylgruppe i glykosaminglykanet med formel (18) hvorpå den aktiverte karboksylgruppe i glykosaminglykanet deretter får reagere med en primær aminogruppe i fosfolipidet, og om ønsket omdannes det oppnådde produkt til et farmasøytisk tålbart salt derav.

Fig. 1

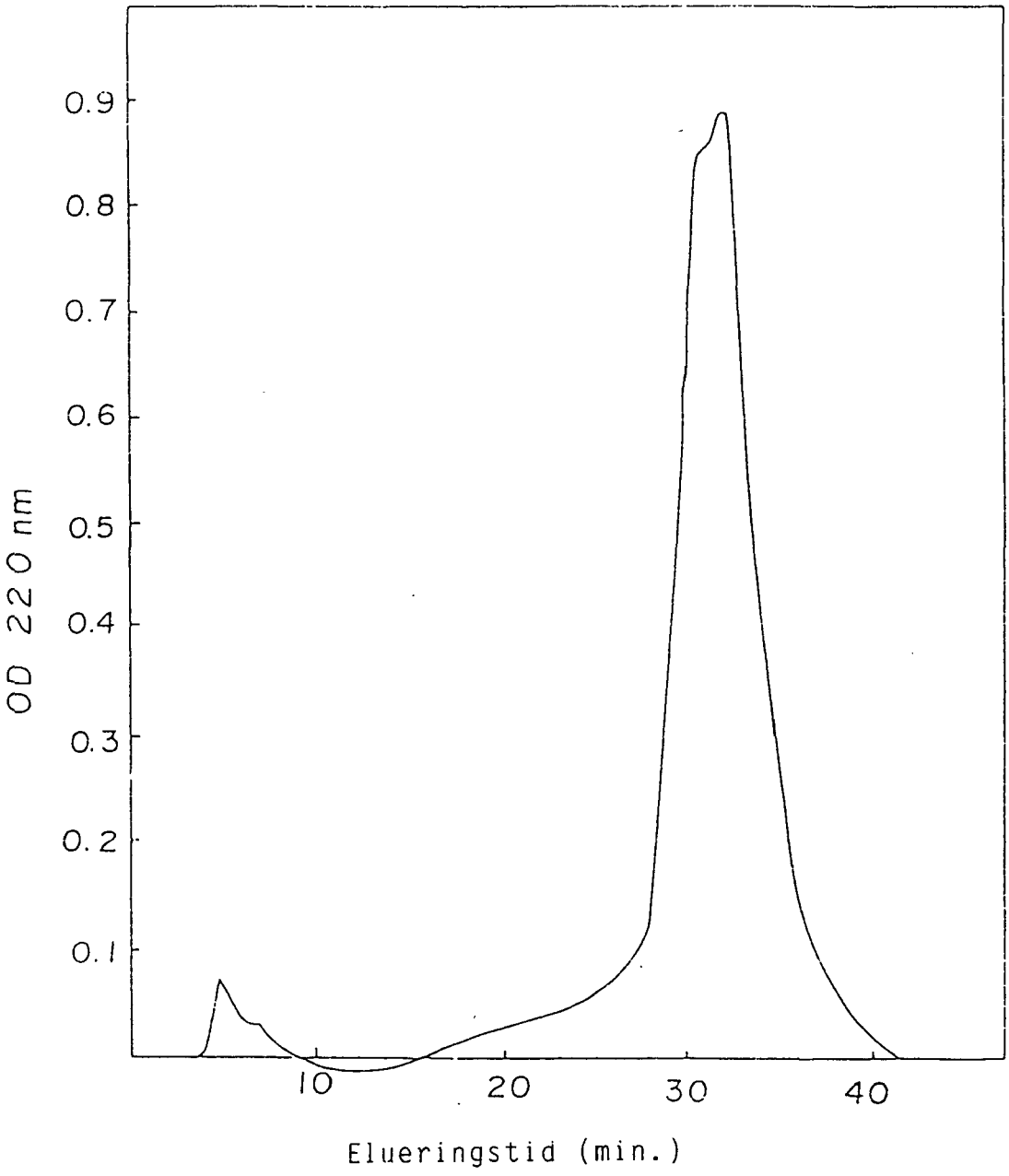


Fig. 2

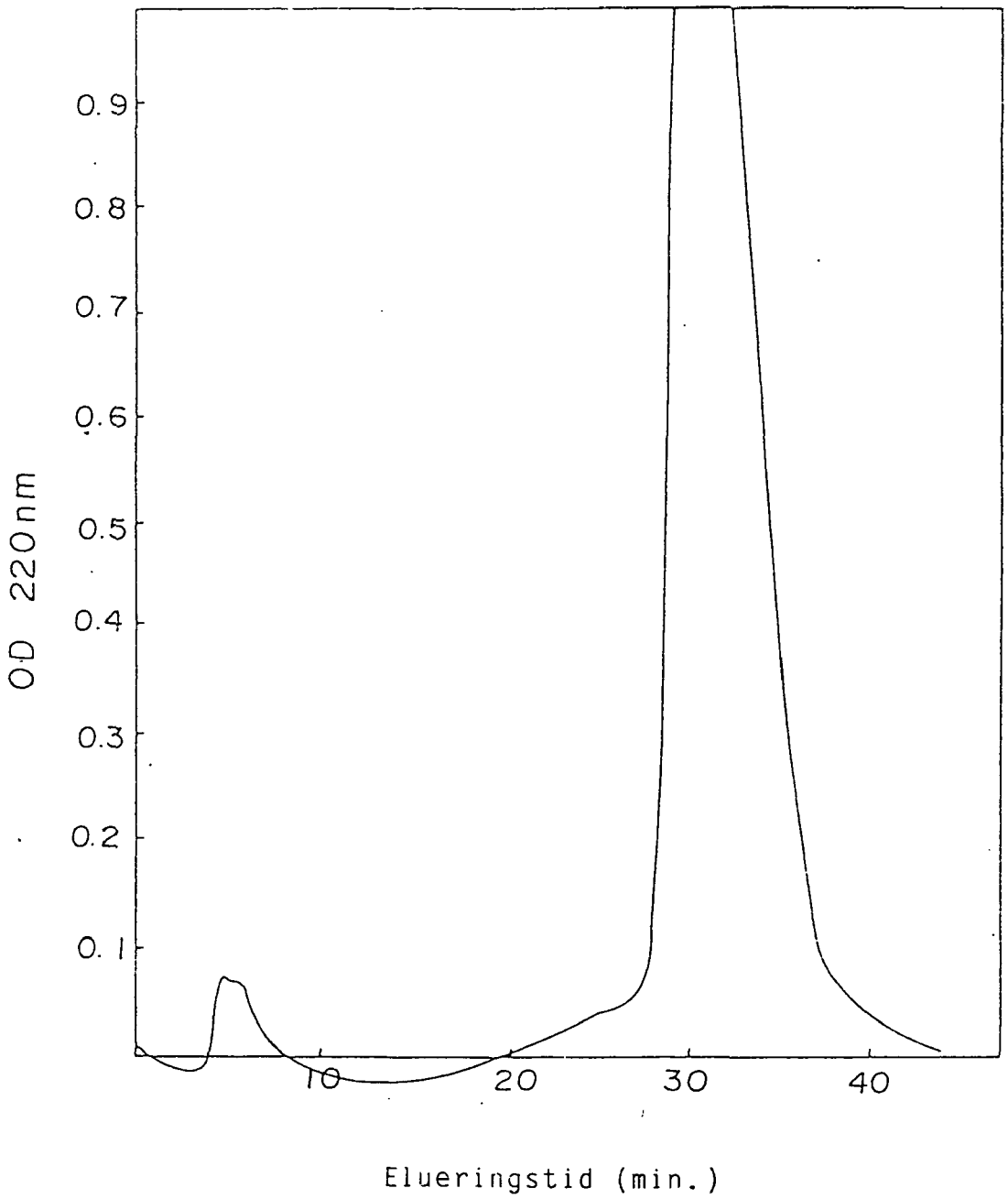


Fig. 3

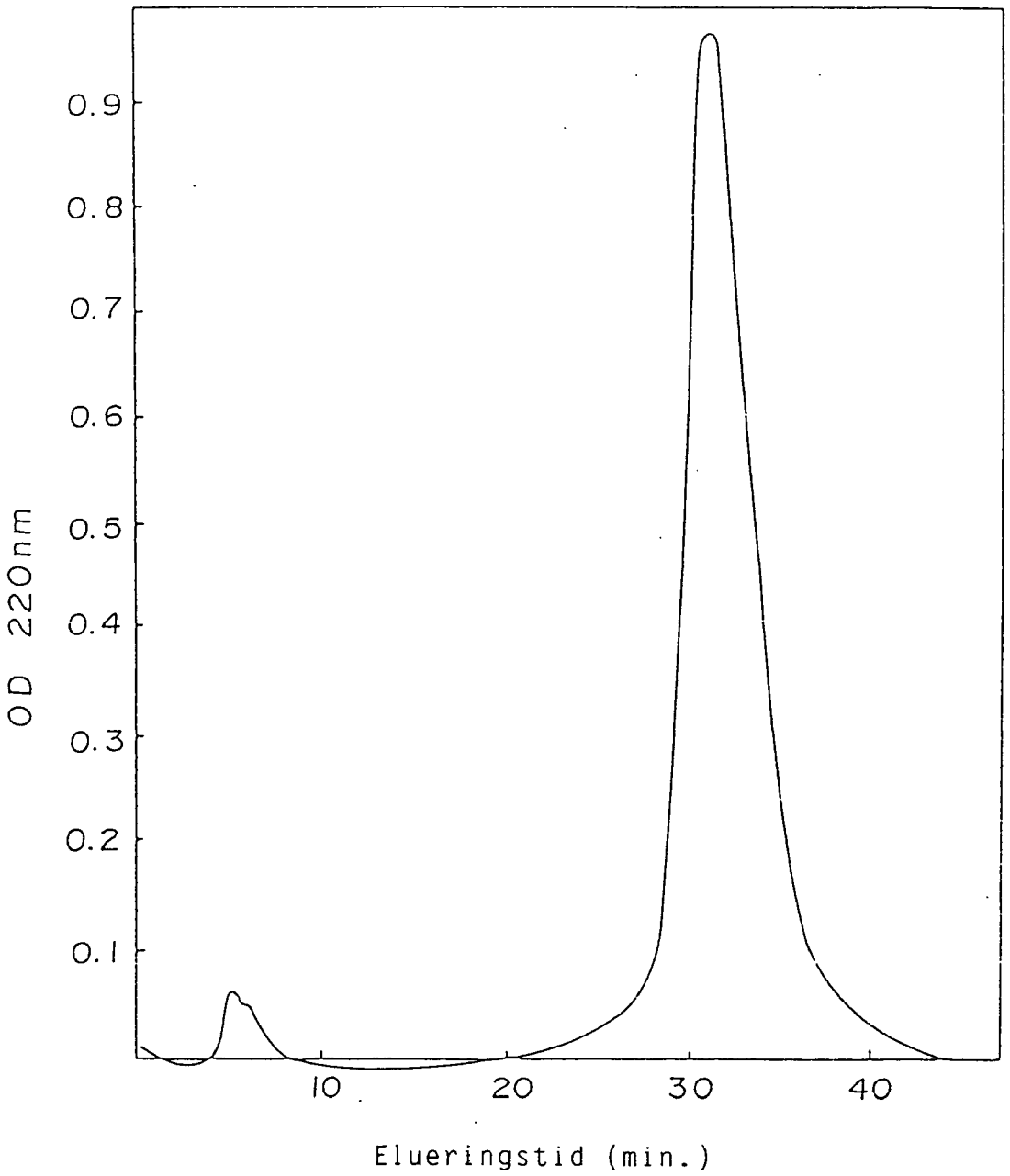


Fig. 4

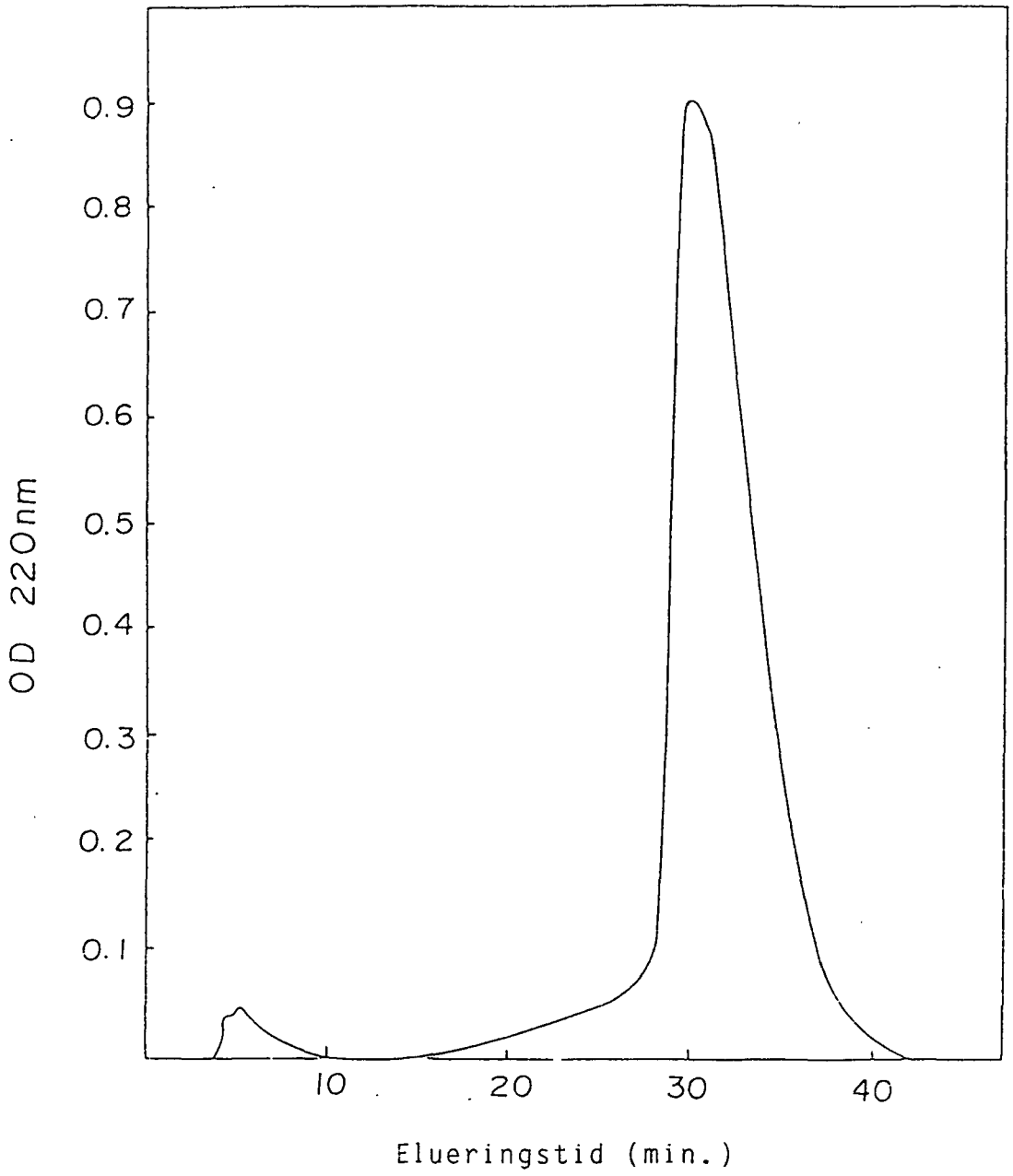


Fig. 5

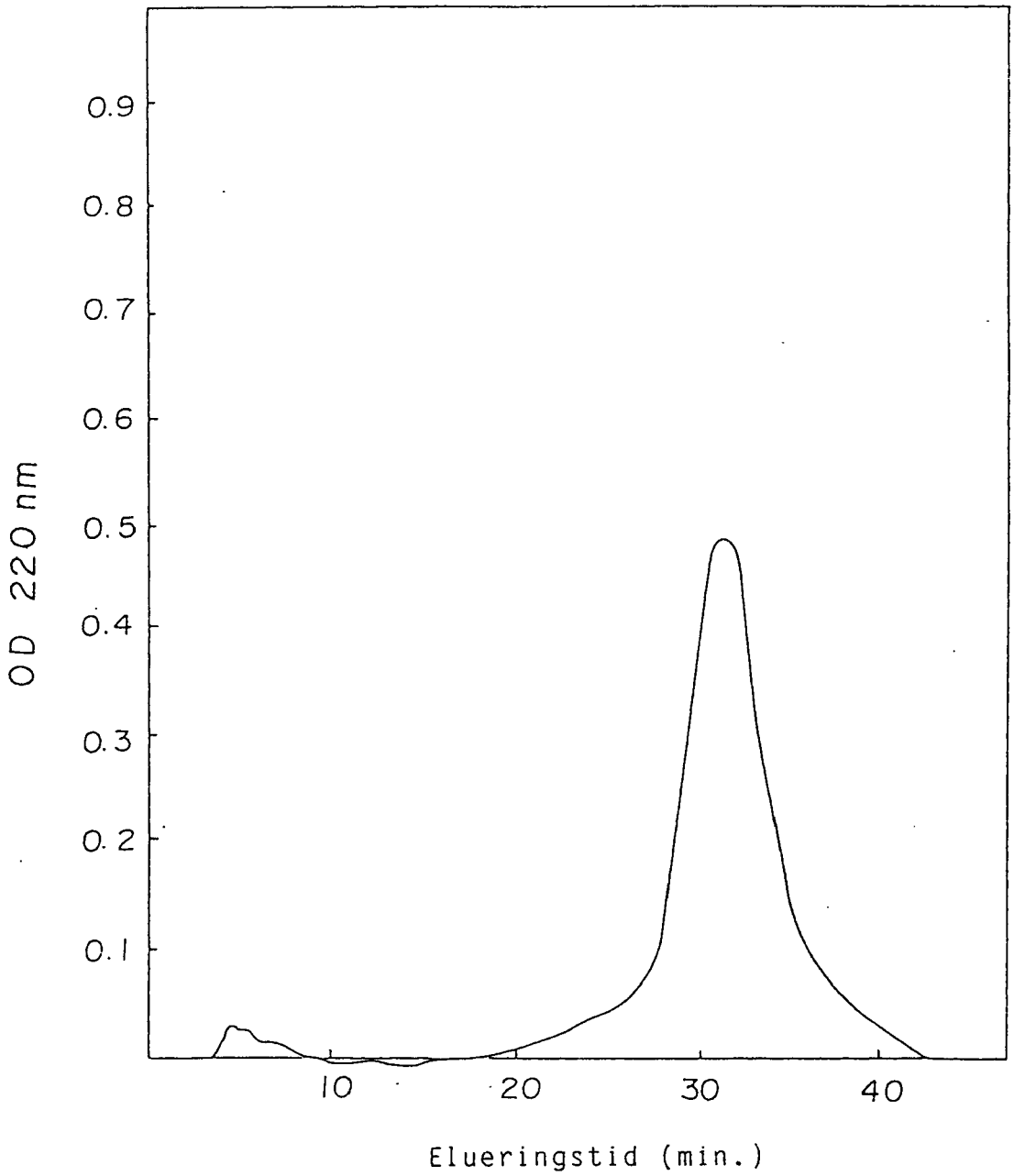


Fig. 6

