

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 47/48

A61K 47/36

A61P 35/00



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97197115.3

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1227034C

[22] 申请日 1997.6.5 [21] 申请号 97197115.3

[30] 优先权

[32] 1996.6.6 [33] JP [31] 144522/96

[86] 国际申请 PCT/JP1997/001915 1997.6.5

[87] 国际公布 WO1997/046261 日 1997.12.11

[85] 进入国家阶段日期 1999.2.8

[71] 专利权人 第一制药株式会社

地址 日本东京中央区

[72] 发明人 井上和泓 洲崎浩 池田政浩

审查员 闻 雷

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 杨丽琴

权利要求书 1 页 说明书 52 页 附图 11 页

[54] 发明名称 药物复合物的制造方法

[57] 摘要

一种药物复合物的制造方法，是具有羧基的多糖衍生物和医药化合物的残基，通过含有一个氨基酸的间隔基或者肽式键合的含有 2~8 个氨基酸的间隔基结合起来的药物复合物、或者具有羧基的多糖衍生物同医药化合物的残基不通过导入该间隔基直接结合起来的药物复合物的制造方法，其特征是，具有羧基的多糖衍生物的有机胺的盐同医药化合物或结合了医药化合物的间隔基在非水系统中进行反应。具有羧基的多糖衍生物同结合了间隔基的医药化合物等之间的反应可以获得较高的收率，而且在同具有内酯环的医药化合物等进行反应的时候，可以抑制副反应。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 药物复合物的制造方法，是羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇和医药化合物的残基，通过含有一个氨基酸的间隔基或者肽式键合的含有 2~8 个氨基酸的间隔基结合起来的药物复合物、或者羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇同医药化合物的残基不通过导入该间隔基直接结合起来的药物复合物的制造方法，其特征在于，羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的有机胺的盐同医药化合物或结合了医药化合物的间隔基在非水系统中进行反应。

2. 药物复合物的制造方法，是羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇和医药化合物的残基，通过含有一个氨基酸的间隔基或者肽式键合的含有 2~8 个氨基酸的间隔基结合起来的药物复合物、或者羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇同医药化合物的残基不通过导入该间隔基直接结合起来的药物复合物的制造方法，其包括以下工序：

(1) 将羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的碱金属盐转换成有机胺的盐的工序；以及

(2) 该有机胺的盐同医药化合物或结合了医药化合物的间隔基在非水系统中进行反应的工序。

3. 根据权利要求 1 或 2 记载的方法，其特征在于构成羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的葡聚糖多元醇，是在实质上可能完全多元醇化的条件下，处理葡聚糖后得到的葡聚糖多元醇。

4. 根据权利要求 3 记载的方法，其中羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇是羧甲基葡聚糖多元醇。

5. 根据权利要求 1 记载的方法，其中医药化合物是抗肿瘤药或者抗炎药。

6. 根据权利要求 1 记载的方法，其中医药化合物是能形成内酯环的医药化合物。

7. 根据权利要求 6 记载的方法，其中能形成内酯环的权利要求 6 记载的医药化合物是 (1S, 9S) -1-氨基-9-乙基-5-氟-2, 3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4' : 6, 7]中氮茚并[1, 2-b]喹啉-10, 13 (9H, 15H) -二酮。

## 药物复合物的制造方法

## 5 技术领域

本发明是关于多糖衍生物和抗肿瘤药等的医药化合物结合形成的药物复合物的制造方法。

## 背景技术

在肺癌和消化道癌等的固型癌以及白血病等的血液癌的治疗时使用的抗肿瘤药，通过静脉注射或口服等的给药途径全身性地给药之后，分布到特定的肿瘤部位，通过阻碍或者抑制癌细胞的增殖而发挥治疗效果。但是，经全身给药的抗肿瘤药，因为可以从血中迅速地被肝脏·内皮网状系统摄取，或者迅速地被从尿中排泄，有血中浓度低，向肿瘤部位的分布不充分的情况。并且，对于通常的抗肿瘤药自身来说，存在有以下问题：因其向肿瘤部位分布的选择性（肿瘤选择性）低，故抗肿瘤药广泛分布于全身的各种细胞和组织等，对于正常的细胞和组织等也产生细胞毒作用，致使呕吐、发热、或者脱发等的副作用发生率极高。因此，抗肿瘤药在追求其效果的同时亦要追求能够选择性地分布到肿瘤部位的手段的开发。

作为象这样的手段之一，提出了使用具有羧基的多糖衍生物作为药物载体，在该多糖衍生物上结合抗肿瘤药，延迟抗肿瘤药从血中消除的同时，提高向癌组织分布的靶向性的方法。例如，在国际专利W094/19376号中，公开了一种药物复合物，它是在具有羧基的多糖的羧基上结合上肽链（氨基酸数目1~8），然后进一步通过这个肽链再结合阿霉素、道诺红霉素、丝裂霉素C、或者博来霉素等形成药物复合物。另外，在日本特开平7-84481号中公开了在被羧甲基化的甘露醇葡聚糖衍生物上，通过席夫碱或酰胺键导入了上述抗肿瘤药的药物复合物。这些药物复合物与不结合药物传递载体的抗肿瘤药自身相比，具有优异的抗肿瘤效果，同时毒性和副作用减轻。

另外，对于与使用多元醇化多糖衍生物作为药物传递载体的药物复合物有关的技术来说，有“关于多糖-肽-阿霉素复合物的研究·多糖衍生物的血中稳定性和抗肿瘤效果的关系”（第10次日本DDS学会

讲演要旨集, 279, 1994); “关于多糖-肽-阿霉素复合物的研究·体内动力学和抗肿瘤效果”(第9次日本药物动态学会年会讲演要旨集, 292, 1994); 第19次研究开发动向研讨会(医药品机构举办)要旨集, D-9, 1995; 以及“关于通过多糖载体向肿瘤传递药物的研究”(第12次胶体·界面技术讨论会, 日本化学会, 讲演要旨集, 51, 1995)等。

以前, 这些的药物复合物, 可以将羧甲基プルラン、羧甲基葡聚糖等的含有羧基的多糖衍生物制成钠盐后, 让该多糖衍生物的羧基和抗肿瘤药的氨基(或者与抗肿瘤药结合着的肽链的N末端氨基)通过酰胺键结合来制造。因为多糖衍生物的钠盐在有机溶剂中几乎不溶解, 要进行此反应, 可采用将多糖衍生物的钠盐配制成水或含水的水性有机溶剂的溶液之后, 在此溶液中使缩合剂和盐酸盐等形式的抗肿瘤药(或者具有肽链的抗肿瘤药)溶解的方法。

但是, 因为在此反应中, 脱水缩合反应在含有水的溶剂中进行, 产物要得到高收率是不可能的。作为反应原料使用的抗肿瘤药等一般是高价格的物品, 从制造成本的观点应寻求能高效率地制造上述药物复合物的方法。另外, 在日本特开平6-87746号记载的, 作为抗肿瘤药有效的化合物, 因为在分子中有内酯环存在, 对此将以肽式键合着的化合物进行上述的反应时, 在碱及水的存在下内酯环开环, 生成的羧基同与抗肿瘤药结合着的肽链的N末端氨基反应, 使产物的收率显著地降低, 并且得不到均一的药物复合物。为此, 应寻求能够避免内酯环开环的化合物生成的反应方法。

#### 发明概述

本发明的课题是提供高效率的, 将抗肿瘤药及抗炎药等的有效成分, 制造成对于肿瘤部位等能够具有靶向性的药物复合物的方法。更具体地说, 是让具有羧基的多糖衍生物和抗肿瘤药等的医药化合物或结合了医药化合物的低聚肽等的间隔基进行高效率的反应, 提供能够大量并且廉价的制造药物复合物的方法。

本发明者们为了解决上述的课题, 进行了深入细致的研究, 结果发现: 具有羧基的多糖衍生物同医药化合物或者结合了医药化合物的间隔基进行反应, 使用有机胺的盐代替以前使用的多糖衍生物的钠盐时, 多糖衍生物的盐可基本上在非水溶剂中高浓度地溶解, 使多糖衍

生物同医药化合物或者结合了医药化合物的间隔基的反应能够以很高的收率进行，并且能够使副产物等降低。本发明是基于以上的发现而完成的。

即本发明是提供具有以下特征的方法：具有羧基的多糖衍生物和医药化合物的残基，通过含有一个氨基酸的间隔基或者肽式键合的含有2~8个氨基酸的间隔基结合起来的药物复合物；或者具有羧基的多糖衍生物同医药化合物的残基不通过导入该间隔基而直接结合起来的药物复合物的制造方法，具有羧基的多糖衍生物的有机胺的盐同医药化合物或结合了间隔基的医药化合物在非水系统中进行反应。并且在10 该药物复合物的制造方法中包括以下的工序：（1）将具有羧基的多糖衍生物的碱金属盐转换成有机胺的盐的工序；以及（2）该有机胺的盐同医药化合物或结合了间隔基的医药化合物在非水系统中进行反应的工序。

通过本发明的优选方式，能够提供：具有羧基的多糖衍生物是羧基 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的上述方法；构成羧基 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的葡聚糖多元醇，在实质上可能完全多元醇化的条件下，处理葡聚糖得到的葡聚糖多元醇为特征的上述方法；羧基 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇是羧甲基葡聚糖多元醇的上述方法；羧基 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇分子量是在 5,000~500,000 的范围，优选在 50,000~450,000 的范围，20 更优选 200,000~400,000 的范围的羧甲基葡聚糖多元醇，羧甲基化度相当于每个糖残基为 0.01~2.0 的范围，优选 0.1~1.0 的范围，更优选 0.3~0.5 的范围的上述方法；并且医药化合物为抗肿瘤药或者抗炎药的上述方法。

进一步来说，通过本发明的优选方式能够提供：医药化合物是能够形成内酯环的化合物的上述方法；在有机胺的盐同医药化合物或结合了医药化合物的间隔基的反应中，使用形成了内酯环的医药化合物或结合了形成内酯环的医药化合物的间隔基的上述方法；以及能够形成内酯环的上述医药化合物是 (1S, 9S) -1-氨基-9-乙基-5-氟-2, 3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4' : 6, 7] 30 中氮茚并[1, 2-b]喹啉-10, 13(9H, 15H) -二酮的上述方法。

附图的简单的说明

图 1 是表示用本发明的方法制造出的例 8 的药物复合物的 GPC

图。

图 2 是表示用本发明的方法制造出的例 8 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

5 图 3 是表示用本发明的方法制造出的例 9 的药物复合物的 GPC 图。

图 4 是表示用本发明的方法制造出的例 9 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

图 5 是表示用本发明的方法制造出的例 10 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

10 图 6 是表示用本发明的方法制造出的例 15 的药物复合物的 GPC 图。

图 7 是表示用本发明的方法制造出的例 15 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

15 图 8 是表示用本发明的方法制造出的例 28 的药物复合物的 GPC 图。

图 9 是表示用本发明的方法制造出的例 28 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

图 10 是表示用本发明的方法制造出的例 29 的药物复合物的 GPC 图。

20 图 11 是表示用本发明的方法制造出的例 29 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

图 12 是表示用本发明的方法制造出的例 34 的药物复合物的 GPC 图。

25 图 13 是表示用本发明的方法制造出的例 34 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

图 14 是表示用本发明的方法制造出的例 39 的药物复合物的 GPC 图。

图 15 是表示用本发明的方法制造出的例 39 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

30 图 16 是表示用本发明的方法制造出的例 41 的药物复合物的 GPC 图。

图 17 是表示用本发明的方法制造出的例 41 的药物复合物的紫外

吸收光谱图。

图 18 是表示用本发明的方法制造出的例 44 的药物复合物的 GPC 图。

5 图 19 是表示用本发明的方法制造出的例 44 的药物复合物的紫外吸收光谱图。

图 20 是表示用本发明的方法制造出的例 15 的药物复合物体内动力学的图。图中的各点表示 3 例的平均值。

发明的优选实施方案

10 由本发明的制造方法制造出的药物复合物，其特征如下：具有羧基的多糖衍生物和医药化合物的残基，通过含有一个氨基酸的间隔基或者肽式键合的含有 2~8 个氨基酸的间隔基为媒介结合起来、或者具有羧基的多糖衍生物同医药化合物的残基不通过导入该间隔基直接结合起来。

15 包含在药物复合物中的医药化合物的残基，来源于例如抗肿瘤药、抗炎药、抗菌素等的、被应用在包括人在内的哺乳类动物疾病的治疗以及/或者预防的医药化合物，由它们的部分结构构成。但作为该残基来源的医药化合物并不限定在上述的范围。并且，作为医药化合物来说，可以使用能够与多糖衍生物或者间隔基结合有关的、具有 1 或 2 个以上的反应性官能团（例如：氨基、羧基、羟基、巯基、酯基等）的任何的物质。对于在说明书中所谓的医药化合物的范围，包括它本身是有医药作用的化合物的主要结构形成的由其部分构造组成的化合物，也包括在生物体内能够再生该化合物的前体化合物。

20 更具体的说，在本说明书内的所谓医药化合物的残基，假定多糖衍生物或者间隔基同医药化合物残基的结合是通过医药化合物中的反应性官能团同多糖衍生物或者间隔基中的反应性官能团之间的反应（例如脱水缩合等）形成的时候，是指在结合后的化合物中存在的源自原先医药化合物的部分结构。例如，医药化合物用 D-NH<sub>2</sub>，D-COOH，D-COOR，D-OH，D-SH，D-CONH<sub>2</sub>，D-NH-COOR（R 是低级烷基等）表示的时候，医药化合物的残基分别可以用 D-NH-（D-NH-CO-Q 等），D-CO-（D-CO-NH-Q，D-CO-O-Q，D-CO-S-Q 等），D-CO-（D-CO-NH-Q，D-CO-O-Q，D-CO-S-Q 等），D-O-（D-O-CO-Q，D-O-Q 等），D-S-（D-S-CO-Q，D-S-Q 等），D-CONH-（D-CO-NH-CO-Q 等），D-NH-CO-

25

30

(D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Q 等)表示(括弧内表示间隔基或多糖衍生物同医药化合物残基的结合, Q 表示从间隔基或多糖衍生物中分别除去反应性官能团以及羧基后剩余的部分结构)。间隔基或多糖衍生物同医药化合物残基的结合的种类并不仅限于上述的物质。医药化合物的残基可以与多糖衍生物的羧基、间隔基的 N 末端氨基或者 C 末端羧基、或者存在于组成间隔基的氨基酸中的反应性官能团结合。

作为医药化合物的残基来说, 可适宜使用例如: 阿霉素、道诺红霉素、丝裂霉素 C、博来霉素、环胞苷、长春新碱、长春碱、甲氧蝶呤、铂类抗肿瘤药(顺铂或其衍生物)、紫杉醇或其衍生物、喜树碱或其衍生物(日本特开平 6-87746 号公开的抗肿瘤药, 优先权利要求 2 记载的(1S, 9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2, 3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4': 6, 7]吲哚嗪基[1, 2-b]喹啉-10, 13(9H, 15H)-二酮等)等的抗肿瘤药的残基。另外也可适宜例如: 琥珀酸氢化可的松、琥珀酸泼尼松等的甾体类抗炎药; 或者甲灭酸、氟灭酸、双氯芬酸、布洛芬、氯苄噻吡酯等的非甾体抗炎药的残基。

医药化合物的残基可以同多糖衍生物直接结合, 也可以通过间隔基结合。作为象这样的间隔基来说, 可以使用含有 1 个氨基酸的间隔基或者肽式键合的含有 2~8 个氨基酸的间隔基。更具体地说, 对于医药化合物的残基同多糖衍生物通过间隔基结合起来的情况, 该间隔基有着 1 个氨基酸的残基(其意义是从氨基酸的氨基以及羧基分别除去 1 个氢原子以及 1 个羟基的残基)、或者肽式键合的含有 2~8 个氨基酸的低聚肽的残基(其意义是从 N 末端的氨基以及 C 末端的羧基分别除去 1 个的氢原子以及 1 个羟基的残基)的形式。

优选的间隔基是含有 2~6 个氨基酸的低聚肽的残基。构成间隔基的氨基酸的种类没有特别的限定, 可使用例如: L-或 D-氨基酸、优选 L-氨基酸, 除  $\alpha$ -氨基酸之外, 也可以使用  $\beta$ -丙氨酸、 $\epsilon$ -氨基己酸、 $\gamma$ -氨基酪酸等。象这个样的  $\alpha$ -氨基酸以外的氨基酸, 在间隔基中优选配置与多糖衍生物接近的位置。

例如使用低聚肽间隔基的时候的结合方向, 没有特别的限制, 但一般地可以将间隔基的 N 末端通过酰胺键结合在羧基 C<sub>1-4</sub> 的烷基葡聚糖多元醇的羧基上, 而将间隔基的 C 末端结合在医药化合物的氨基上。另外, 例如肽间隔基的构成单元中包括着赖氨酸残基, 将赖氨酸

残基的 $\alpha$ -氨基以及 $\varepsilon$ -氨基各自同其他氨基酸的羧基经酰胺键结合时，因为肽间隔基的两端均变为N末端，结合医药化合物的羧基即成为可能的事情。进一步说，在间隔基中其构成单元包括着1个或1个以上的二氨基化合物或二羧酸化合物的残基（例如乙二氨基等的二氨基的残基和琥珀酸等的二羧酸的残基等），也可使用两末端为N末端的间隔基以及两末端为C末端的间隔基。

使用由低聚肽组成的间隔基时的氨基酸序列没有特定地限定，但可优选使用例如，间隔基是用-X-Z-表示的二肽的残基（X表示疏水性氨基酸的残基，Z表示亲水性氨基酸的残基，-X-Z-的意义是疏水性氨基酸（X）和亲水性氨基酸（Z）分别以N末端侧以及C末端侧，通过肽式键合起来的二肽的N末端的氨基以及C末端的羧基各自除去1个氢原子以及1个羟基的残基）、或者将该二肽的残基作为部分肽序列适当地用于间隔基。作为疏水性氨基酸来说，可使用例如苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸等；作为亲水性氨基酸来说，可使用例如甘氨酸、丙氨酸等。间隔基也可以有象这个样的二肽残基的重复序列（例如-X-Z-X-Z-，-X-Z-X-Z-X-Z-等）。

使用包括象这个样的二肽结构的间隔基时，间隔基在被认为肽酶丰富的肿瘤部位及炎症部分加水分解，因为在该部位能使医药化合物高浓度地游离，所以包含上述二肽的间隔基和医药化合物结合而形成的结构，是通过本发明的方法制造出来的药物复合物的优选的部分结构。作为医药化合物的残基，对于使用与浓度有依赖关系的具有抗肿瘤作用的抗肿瘤药（随浓度增加抗肿瘤作用增强的抗肿瘤药：浓度依赖型的抗肿瘤药，例如阿霉素等）的残基时，特别优选使用用-X-Z-表示的上述由二肽残基组成的间隔基或者包括该二肽的残基在作为部分肽排列的间隔基。

另外，作为医药化合物的残基，对于使用在一定的浓度的，以作用时间的持续作为必须的时间依赖型的抗肿瘤药时，通过使用上述的间隔基有时也能够达到高的抗肿瘤效果，例如在日本特开平6-87746号记载的抗肿瘤药，能够举出优选权利要求2记载的抗肿瘤药。在一般情况下，并不限定在上述的间隔基，有必要从抗肿瘤药的作用机制、体内动力学及显示毒性的特点、抗肿瘤药在体内的游离性等方面选择优选的间隔基。另外在一般情况下，对于增殖迅速的癌症来说，优选

能够在短时间内游离出高浓度的医药化合物的上述的间隔基。

在以下表示间隔基的具体例子，但被用于本发明的医药复合物的制造方法的间隔基并不限定在以下的化合物，象能够给予医药化合物最佳游离速度这样的问题，本专业的人员当然可以适宜地选择。表中，肽序列左边是N末端、在C末端一侧结合医药化合物的残基。D-phe表示D-苯丙氨酸残基，其他的氨基酸表示L-氨基酸。另外游离速度的大小是通过结合了阿霉素的药物复合物对感染Walker256癌大鼠的药效的体现的程度、或者在感染Walker256癌大鼠的肿瘤部位的游离阿霉素的浓度来判定。这些的间隔基中，对于阿霉素来说，优选使用(N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-等的在短时间内能够游离出高浓度的医药化合物的间隔基。

表 1

---

(a) 游离速度大的间隔基

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 游离速度比较大的间隔基

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 游离速度比较小的间隔基

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 游离速度小的间隔基

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

---

作为构成药物复合物的多糖衍生物部分的具有羧基的多糖衍生物来说，可以使用例如多糖类或者将其经化学或生物学方面的修饰的在分子中具有羧基的任何化合物。例如，除了能够使用透明质酸、果胶、褐藻酸、软骨素、肝素等的多糖类之外，还能够使用プルラン、葡聚糖、甘露聚糖、壳聚糖、旋覆花素、果聚糖、木聚糖、阿拉伯聚糖、マンノグルカン、脱乙酰壳聚糖等的、在多糖的部分或者全部的羟基上导入了具有羧基的官能团的化合物等。例如，可以优选使用将羟基进行羧 C<sub>1-4</sub> 烷化后的化合物，及将多元酸的一个羧基与羟基经酯键结合起来的化合物等。另外，也可以使用在将上述多糖类多元醇化之后，导入了具有羧基的官能团的化合物。

在这样的多糖衍生物中，优选使用羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇。羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的多元醇化程度没有特别的限定，但构成羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的葡聚糖多元醇，优选的是在实际上有可能完全地多元醇化的条件下处理葡聚糖得到的葡聚糖多元醇。

对于制造羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇来说，使用的葡聚糖的种类没有特别地限定，可以包含任意比例的  $\alpha$ -D-1, 6-键。例如  $\alpha$ -D-1, 6-键的比例可以使用 85%以上、90%以上、或者 95%以上的葡聚糖等。葡聚糖的分子量没有特别地限定，可使用例如从 10, 000 左右到 2, 000, 000 左右的化合物，优选 50, 000 左右到 800, 000 左右的化合物。作为构成羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的羧 C<sub>1-4</sub> 烷基的 C<sub>1-4</sub> 烷基来说，可使用直链或者支链的 C<sub>1-4</sub> 烷基，具体地说，有甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基等，其中可优选使用甲基。

本发明的方法，在于制造上述的药物复合物，其特征在于，具有羧基的多糖衍生物的有机胺的盐同医药化合物自身、或者具有羧基的多糖衍生物的有机胺的盐同结合了医药化合物的间隔基，在实质上不含水的有机溶剂中，即在非水体系下进行反应。以下作为本发明的方法的优选实施方案，对于使用羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇作为多糖衍生物的情况进行具体地说明，但是本发明的范围并不局限于这些实施方案。

对于使用葡聚糖作为起始原料的时候，将远远过量的高碘酸钠和硼氢化钠依次与葡聚糖作用，能够制造实质上将葡聚糖完全地多元醇化的葡聚糖多元醇。然而葡聚糖的多元醇化的方法并不限定于上述

的方法，研究人员可以采用可能利用的任何的方法。羧 C<sub>1-4</sub> 烷基化能够通过例如：将氯代醋酸、溴代醋酸、 $\alpha$ -氯丙酸、 $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氯丙酸、 $\beta$ -氯丙酸、 $\alpha$ -甲基- $\beta$ -氯丙酸、 $\alpha$ -氯酪酸、 $\beta$ -氯酪酸、 $\gamma$ -氯酪酸等的卤代 C<sub>1-4</sub> 烷基羧酸，优选氯代醋酸与葡聚糖多元醇的羟基反应，将羟基部分或者完全地羧 C<sub>1-4</sub> 烷基化。

例如，将葡聚糖多元醇溶解在与反应无关的惰性溶剂中（例如水、N, N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷等），在碱（例如氢氧化钠及氢氧化钾等）的存在下，添加卤代 C<sub>1-4</sub> 烷基羧酸或其盐，在冰冷下至 100℃ 左右的温度范围进行数分钟至数日的反应。羧 C<sub>1-4</sub> 烷基的导入的程度，通过适宜地选择例如羧 C<sub>1-4</sub> 烷基化的反应温度及作为试药使用的卤代 C<sub>1-4</sub> 烷基羧酸以及碱的量，能够容易地得以调节，象这样的手段对于研究人员是公知的。对于葡聚糖多元醇的羟基的羧 C<sub>1-4</sub> 烷基化的程度没有特别的限定，但是例如相当于构成糖残基的 0.01 ~ 2.0 的范围，优选是 0.1 ~ 1.0、更优选是 0.3 ~ 0.5 的范围。羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇的分子量，在用凝胶过滤法测定时，是从 5,000 ~ 500,000 左右，优选 50,000 ~ 450,000 左右，更优选 200,000 ~ 400,000 左右。

象这样制造出的羧 C<sub>1-4</sub> 烷基葡聚糖多元醇，被调制成为以钠盐或钾盐等的碱金属盐形式的水溶液存在。本发明的方法的特征是，对于象这样的多糖衍生物的羧基来说，在与医药化合物或者同医药化合物的残基结合后的间隔基结合时，用以有机胺的盐的形式多糖衍生物代替上述的碱金属盐的形式多糖衍生物。象这种样的以有机胺的盐的形式多糖衍生物，在不含水的有机溶剂中实际应用时能够以高浓度溶解，因为反应可以在非水系统中进行，所以反应效率可以显著地得到提高。

作为有机胺的盐来说，例如除了能够使用三乙基胺、三甲基胺、三乙醇胺等的脂肪族胺类的盐之外，还能够使用 N-甲基吡咯烷、N-甲基哌啶、N-甲基吗啉、二甲基氨基吡啶等的脂环式或者芳香族胺类的盐、氯化四甲基铵、氯化四乙基铵等的季铵盐等。由多糖衍生物的钠盐转换成有机胺的盐，可以使用离子交换树脂来进行。例如将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐溶解于水，上到填充了 Bio-Rad AG50W-X2（200-400 目，H<sup>+</sup>型）树脂的柱中，用水洗脱后，添加三乙基胺等的有机胺，能够经冷冻干燥得到。另外，将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐溶

解于水，使其通过三乙基铵型的树脂，也可以经一步工艺进行转换。

医药化合物自身同羧甲基葡聚糖多元醇的羧基的结合、或者结合了医药化合物的间隔基同羧甲基葡聚糖多元醇的羧基的结合，通常可以通过医药化合物具有的反应性的氨基或间隔基的 N 末端氨基同羧甲基葡聚糖多元醇的羧基经酰胺键结合。另外，医药化合物或者间隔基同羧甲基葡聚糖多元醇的羧基的结合并不限于上述的方式，也可以用其它的化学键或利用 1 或 1 个以上的间隔基的键合。例如，可以通过间隔基 C 末端的羧基或者医药化合物的羧基同羧甲基葡聚糖多元醇的羧基形成酸酐，另外也可以使用亚乙基二氨基等的二氨基化合物作为间隔基，将各自的羧基与二氨基的各个氨基经酰胺键结合。

通过医药化合物具有的反应活性的氨基或间隔基的 N 末端氨基同羧甲基葡聚糖多元醇的羧基经酰胺键结合的时候，能够使用通常用于肽链的合成的脱水缩合剂，例如除象 N, N' -二环己基碳化二亚胺 (DCC) 那样的 N, N' -二环烷基碳化二亚胺类、1-乙基-3-(3-二甲氨基氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDAPC) 等的碳化二亚胺衍生物、象 1-羟基苯并三唑 (HOBT) 那样的苯并三唑衍生物之外，还有 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (EEDQ) 等。并且也可以通过活性酯法及酰卤化物法等进行反应。

反应实际上是在不含有水的有机溶剂中进行，可以使用能够溶解反应物 (羧甲基葡聚糖多元醇的有机胺盐以及医药化合物或结合了医药化合物的间隔基) 的任何溶剂。例如，优选使用 N, N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、环丁砷等。医药化合物或者结合了医药化合物的间隔基经过反应导入羧甲基葡聚糖多元醇的医药化合物残基的量没有特别的限定，但是应该从医药化合物残基的物理化学方面的性质、药物复合物的体内动力学、药效、以及毒性等的方面适宜选择。通常能够选择 0.1~30 重量%，优选 1~15 重量%左右的范围。被导入了羧甲基葡聚糖多元醇的医药化合物残基的比例，可以通过例如吸光度分析等方法容易地测定。

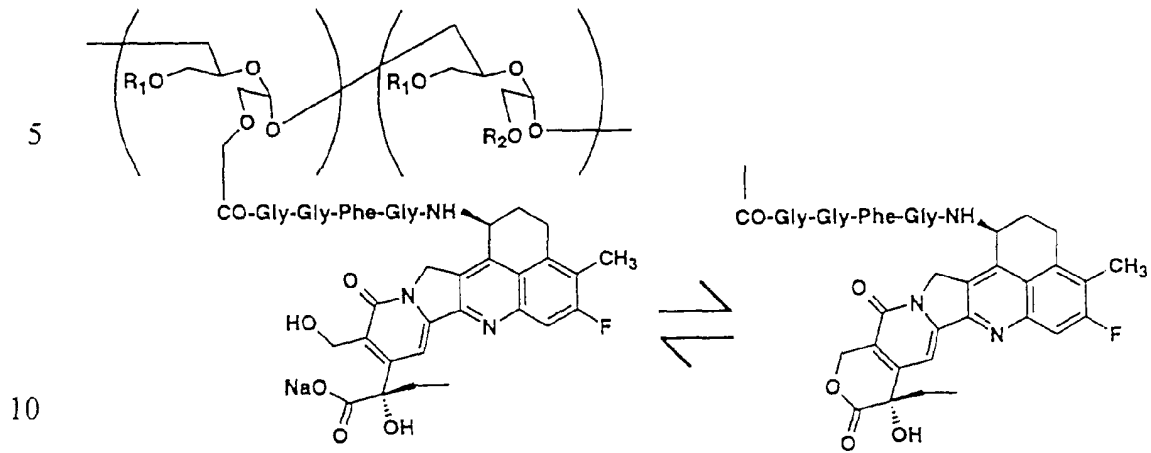
作为本发明的制造方法的优选实施方案，在日本特开平 6-87746 号的权利要求书第 2 项记载的抗肿瘤药的医药化合物，其与低聚肽式键合后，再导入羧甲基葡聚糖多元醇的方法，可用以下的流程图表示，但本发明的方法并不局限于在这个流程图 中被表示的方法。在下述流

程图中，医药化合物残基的导入量，是例如 1~15 重量%，优选 4~8 重量%左右。另外，在下述流程图中，在例示中记载的多元醇的组成单元中只有导入了 1 个或 2 个的羧甲基的组成单元，药物复合物的多糖衍生物部分没有通过上述组成单元的反复组合来构成之事，是应该被理解的。

5



## 药物复合物



上述流程图中的医药化合物，在酸性水性溶剂中（例如 pH3 左右）平衡偏向于形成内酯环的化合物（闭环体）；另一方面，在碱性水性溶剂中（例如 pH10 左右）平衡偏向于形成内酯环开环的化合物（开环体），这些是公知的常识，但是导入相应于这样的闭环体及开环体的残基的药物复合物，具有同等的抗肿瘤效果。然而，羧甲基葡聚糖多元醇在同结合了上述医药化合物的间隔基（例如低聚肽·间隔基）进行反应时，如果开环型的反应种类存在于反应系统，在来源于内酯环的羧基同来源于间隔基的氨基之间进行缩合反应，不仅使反应收率显著地降低，而且有时得不到均一的目的药物复合物。象这个样的副反应，在不能达到平衡的非水性系统中可以通过使用闭环体这种反应种类得以避免。因此本发明的方法对包括上述的医药化合物的药物复合物的制造特别地适合。

15

20

由本发明的方法制造出的上述药物复合物，对应于医药化合物的残基种类（例如抗肿瘤药或者抗炎药等的医药化合物的残基），在肿瘤部位及炎症部位等的局部能够得到所希望的医药活性，并且还有能够减低医药化合物自身所具有的毒性的特点。例如，是多糖衍生物部分的羧甲基葡聚糖多元醇作为药物输送的载体有着极其优异的血中滞留性及向肿瘤·炎症部位的积聚性，使上述的药物复合物具有着肿瘤选择性以及炎症部位选择性。另外，因为在肿瘤部位及炎症部位被认为发现了蛋白酶（肽酶），具有由低聚肽组成的间隔基的药物复合物在其肽链部分可容易地被加水分解，游离出的医药化合物发挥药效。

25

30

包含通过本发明的方法制造出来的药物复合物的药物，通常可以用冷冻干燥品等的形式填充入玻璃瓶等，以使用时临时溶解型的注射用或者点滴用制剂等的非口服给药制剂应用于临床，但象这样的药物的制剂形式并不局限于上述的形式。对于上述制剂的制造，例如可以使用助溶剂、pH 调节剂、稳定剂等在本行业可以使用的制剂用辅料，制造出医药组合物。上述药物的剂量没有特别的限定，但通常根据构成医药化合物的残基的医药化合物的给药量，药物复合物中被导入的药物化合物的残基量、患者的状态及疾病的种类等来决定。例如，在日本特开平 6-87746 号权利要求 2 记载的抗肿瘤药的残基，在用约 6 重量%左右的比例导入的药物复合物非口服给药时，一般每天以体表面积每  $1\text{m}^2$  约 1~500mg 左右，优选约 10~100mg 的范围一次给药，优选每周反复给药 3~4 次。

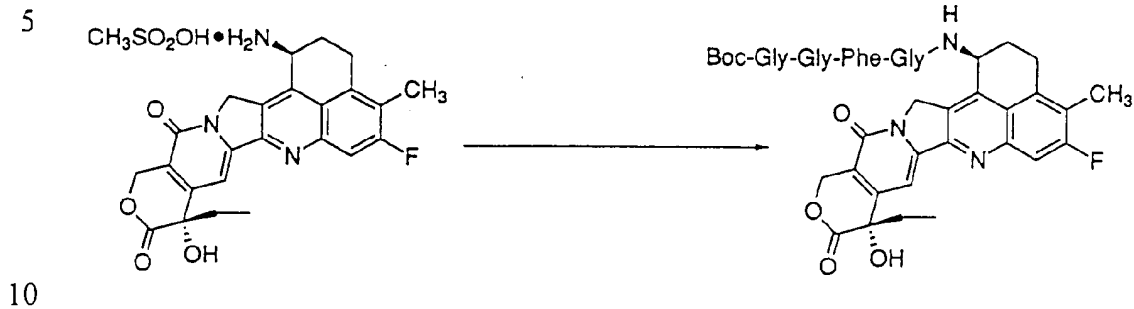
#### 实施例

以下通过实施例进一步具体地说明本发明，但本发明的范围并不局限于下述的实施例。实施例中，[A-NH-]表示在象日本特开平 6-87746 号权利要求 2 记载的医药化合物（在实施例中也称为“DX-8951”）等的那样的有内酯环的医药化合物中，内酯环是闭环的医药化合物用 A-NH<sub>2</sub> 表示的时候的医药化合物残基，其中一例，是在上述的间隔基中用 A-NH-表示的基团（形成了内酯环的化合物）。另外，A'-NH-表示用 A-NH-表示的医药化合物残基中的内酯环是以闭环型或开环型的任一种或者它们的混合型存在的物质。

在实施例中，对于没有特别说明的时候，羧甲基葡聚糖多元醇的羧甲基化的取代度（相当于每构成糖残基的羧甲基的取代度），通过将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐转换成游离型后，溶解于 0.1N 氢氧化钠水溶液，用 0.1N 盐酸滴定求出。将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐的水溶液上 Bio-Rad AG50W-x2 (H<sup>+</sup>型) 柱，将洗脱液冷冻干燥后作为供试品使用。将此供试品溶解于定量过量的 0.1N 氢氧化钠水溶液，以酚酞为指示剂，用 0.1N 盐酸滴定。供试品的取样量为 s(mg)、0.1N 氢氧化钠水溶液的定量过量为 a(ml)、0.1N 盐酸的滴定量为 b(ml)，羧甲基取代度通过式  $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$  求出。另外药物的导入量(重量%)，可利用药物的特性吸收由分光光度法(362nm 附近)求出。凝胶过滤法按下述的条件进行(柱: TSK gel G4000 PW<sub>XL</sub>、洗脱液: 0.1MNaCl、

流速: 0.8ml/min、柱温: 40℃)。

例 1: 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)



将 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (600mg) 以及 N-羧基琥珀酰亚胺 (160mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (20ml), 冷却到 4℃ 后, 添加 N, N'-二环己基碳化二亚胺 (280mg)。在此溶液中加入溶解了日本特开平 6-87746 号权利要求 2 记载的医药化合物的甲磺酸盐 (600mg: 在上述专利的实施例 50 记载的化合物) 和三乙基胺 (0.16ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (30ml) 溶液, 遮光下在室温边搅拌 16 小时边反应。将此反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 含 0.5% 醋酸的二氯甲烷: 甲醇=10:1 溶液) 精制, 得到标题化合物 (1.0g)。

20 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.40 (d, 1H, J=8.3 Hz), 8.10-8.17 (m, 2H), 7.91-8.01 (m, 1H), 7.78 (d, 1H, J=10.75 Hz), 7.32 (s, 1H), 6.94-6.96 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.57 (t, 1H, J= 4.5Hz), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.77 (dd, 2H, J= 5.85Hz, J = 8.80Hz), 3.70 (d, 2H, J= 4.40Hz), 3.65 (d, 2H, J= 5.35Hz), 3.56 (d, 2H, J= 5.85), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35).

Mass (FAB); m/e 854 (M+1)

例 2: 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

30 将 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe (600mg) 以及 N-羧基琥珀酰亚胺 (160mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (20ml), 冷却到 4℃ 后, 添加

N, N'-二环己基碳化二亚胺 (280mg)。在此溶液中加入溶解了 DX-8951 的甲磺酸盐 (600mg) 和三乙基胺 (0.16ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (30ml) 溶液, 遮光下在室温边搅拌 16 小时边反应。将此反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 含 0.5% 醋酸的二氯甲烷: 甲醇=10:1 溶液) 精制, 得到标题化合物 (700mg)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.57 (d, 1H, J= 7.8Hz), 8.19 (d, 1H), 8.05-8.07 (m, 2H), 7.79 (d, 1H, J= 11.2Hz), 7.32 (s, 1H), 7.10 (d, 2H, J= 7.8Hz), 6.93-7.03 (m, 4H), 6.51 (s, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.18 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.84 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.57-4.59 (m, 1H), 3.57-3.71 (m, 6H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.00-3.02 (m, 1H), 2.80-2.90 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

Mass (FAB); m/e 854 (M+1)

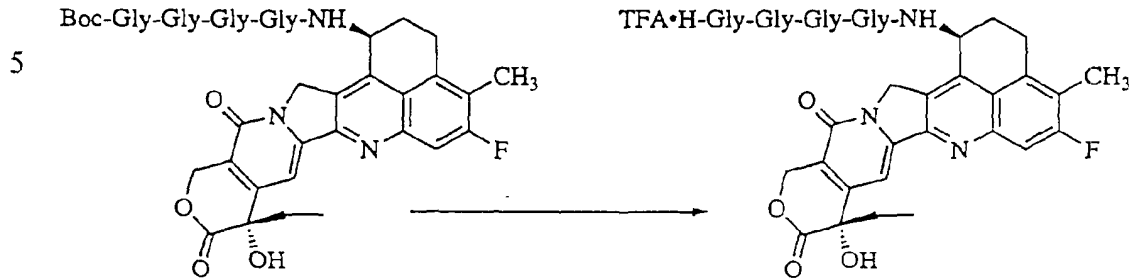
例 3: 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将 Boc-Gly-Gly-Gly-Gly (120mg) 以及 N-羟基琥珀酰亚胺 (39mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (20ml), 冷却到 4℃ 后, 添加 N, N'-二环己基碳化二亚胺 (70mg)。在此溶液中加入溶解了 DX-8951 的甲磺酸盐 (150mg) 和三乙基胺 (0.039ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 溶液, 遮光下在室温边搅拌 16 小时边反应。将此反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 二氯甲烷: 甲醇=10:1 溶液) 精制, 得到标题化合物 (100mg)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.40 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.10-8.17 (m, 2H), 7.91-8.01 (m, 1H), 7.78 (d, 1H, J= 10.75 Hz), 7.32 (s, 1H), 6.94-6.96 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.57 (t, 1H, J= 4.5Hz), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.77 (dd, 2H, J= 5.85Hz, J= 8.80Hz), 3.70 (d, 2H, J= 4.40Hz), 3.65 (d, 2H, J= 5.35Hz), 3.56 (d, 2H, J= 5.85Hz), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

Mass (FAB); m/e 764 (M+1)

例 4: 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 三氟醋酸盐的合成



10

将 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (79mg) 溶解于三氟醋酸 (3ml), 放置 1 小时。除去溶剂, 分别用甲醇 (30ml) 2 次、乙醇 (30ml) 2 次进行共沸后, 残渣用乙醚洗净, 得到标题化合物 (80mg)。

15

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.59-8.61 (m, 1H), 8.50 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.21-8.27 (m, 2H), 7.91-8.01 (br, 3H), 7.81 (d, 1H, J= 11.2Hz), 7.32 (s, 1H), 6.50-6.52 (br, 1H), 5.57-5.59 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.80-3.82 (m, 3H), 3.70-3.75 (m, 3H), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86-1.88 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

20

例 5: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

葡聚糖 T2000 (10g, 法鲁玛西亚 (ファルマシア) 公司制造, 平均分子量 2, 000, 000) 溶解于 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5, 1000ml), 加入高碘酸钠 (33.0g) 的水溶液 (1000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (7.0ml), 搅拌一夜。反应液在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加入硼氢化钠 (14g) 溶解后, 在室温搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时后, 在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-30 膜 (ミリポア公司制造), 经超滤法除去低分子组分。将高分子组分冷冻干燥后, 得到葡聚糖多元醇。此葡聚糖多元醇在 pH3.0 处理 1 小时后, 用バイオマックス-50 膜除去低分子组分, 然后

30

用バイオマックス-100 膜除去高分子组分，冷冻干燥，得到精制葡聚糖多元醇（2.0g）。此物质的分子量（凝胶过滤法，葡聚糖标准）是220K。

5 此精制葡聚糖多元醇（1.8g）加入到在水（45ml）中溶解了氢氧化钠（10.5g）后得到的水溶液中，在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸（15g），使其溶解后，在室温反应20小时。将此反应液用醋酸调节至pH8后，用バイオマックス-10膜经超滤法除去低分子组分。高分子组分冷冻干燥后，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（1.8g）。此物质的分子量（凝胶过滤，葡聚糖标准）是330K，羧甲基化度是0.8。

10 上述的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（300mg）溶解于水，上 Bio-Rad AG50W-X2（200-400目，H<sup>+</sup>型）柱（1.5×8.6cm），用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺（0.5ml）后，进行冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（380mg）。将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（各300mg）进行同上述同样的柱处理，得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（380mg，400mg）。

#### 例6：羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐的合成

20 在上述例5得到的葡聚糖多元醇的钠盐（0.15g），加入到在水（4.5ml）中溶解了氢氧化钠（1.05g）后得到的水溶液中，在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸（1.5g），使其溶解后，在室温反应18小时。将此反应液用醋酸调节至pH8，滴入到90ml的甲醇中之后，加入3M氯化钠水溶液（0.15ml），析出的沉淀经离心分离（3500rpm，8分钟）收集。此沉淀用甲醇洗净后，溶解在水（5ml）中，加入3M氯化钠水溶液（0.15ml）。将此溶液用米利波阿过滤器（0.45μm）过滤，滤液滴入到35ml的乙醇中，析出的沉淀经离心分离（3500rpm，8分钟）收集。此沉淀用乙醇洗净后，溶解在水中，用透析膜（スペクトラポア1，透过分子量6,000-8,000），对纯水透析。透析内液用米利波阿过滤器（0.22μm）过滤后，冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（0.18g）。此物质相当于每糖残基的羧甲基化度（碱滴定法）是1.2。

30

#### 例7：羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐的合成

在上述例5得到的精制葡聚糖多元醇（0.2g），加入到在水（6ml）

中溶解了氢氧化钠(0.84g)后得到的水溶液中,在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸(1.2g),使其溶解后,在室温反应18小时。将此反应液用醋酸调节至pH8,滴入到120ml的甲醇中之后,加入3M氯化钠水溶液(0.2ml),析出的沉淀经离心分离(3500rpm, 5 8分钟)收集。此沉淀用甲醇洗净后,溶解在水(5ml)中,加入3M氯化钠水溶液(0.2ml)。将此水溶液用米利波阿过滤器(0.45 $\mu$ m)过滤,滤液滴入到35ml的乙醇中,析出的沉淀经离心分离(3500rpm, 8分钟)收集。此沉淀用乙醇洗净后,溶解在水中,用透析膜(スペクトラポア 1,透过分子量6,000-8,000),对纯水透析。透析内液用米利波阿过滤器(0.22 $\mu$ m)过滤后,冷冻干燥,得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐(0.20g)。此物质相当于每糖残基的羧甲基化度(碱滴定法)是0.4。

例 8: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)的合成

15 在例5得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐(380mg,羧甲基化度是0.8)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(30ml)。在此溶液中,顺次加入3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A(A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)的三氟醋酸盐(49mg)的N,N-二甲基甲酰胺(5ml)溶液、三乙基胺(0.017ml)、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二羟基喹啉(380mg),在室温边搅拌一夜边反应。此反应液用1M氢氧化钠水溶液调节至pH10后,在25ml的乙醇中每5ml分别滴入。在这个混合物中加入3M氯化钠水溶液(1ml)、乙醚(5ml),析出的沉淀经离心分离(3500rpm,8分钟)收集。

25 此沉淀溶解在水中,用透析膜(スペクトラポア 1,透过分子量6,000-8,000),对纯水透析。透析内液用米利波阿过滤器(0.22 $\mu$ m)过滤后,冷冻干燥。得到的粗品溶解于水(30ml),用0.1M氢氧化钠水溶液调节至pH9,在37℃处理1小时。此处理液同上述同样地进行透析后,透析内液用米利波阿过滤器(0.22 $\mu$ m)过滤,冷冻干燥,得到标题化合物289mg。本化合物溶解于0.1M氯化钠水溶液,用GPC(柱: 30 东ソ-株式会社制 TSK Gel PW-4000XL,溶剂:0.1MNaCl,流速:0.8ml/min)分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱(0.1M三醋酸缓冲液,pH9.0,0.25mg/ml)分别表示在图1及图2。本化合物

的医药化合物残基的含量根据在 0.1M 三醋酸缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.3% (W/W)。

例 9: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly- Phe -Gly -NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

5 由 3' -N-(Boc-Gly-Gly-Phe -Gly) -NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (50mg) 用同例 4 同样的方法经脱 Boc, 得到的 3' -N-(Gly-Gly-Phe -Gly) -NH-A 的三氟醋酸盐, 按同例 8 同样的方法, 导入在例 5 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (380mg), 合成出标题化合物 (300mg)。本化合物溶解于 0.1M 氯化钠水溶液, 用 GPC (柱: 东ソ-株  
10 株式会社制 TSK Gel PW-4000XL, 溶剂: 0.1MNaCl, 流速: 0.8ml/min) 分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱 (0.1M トリス缓冲液, pH9.0, 0.19mg/ml) 分别表示在图 3 及图 4。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.3% (W/W)。

15 例 10: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly- Gly -Gly -NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

由 3' -N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly) -NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (41mg) 用同例 4 同样的方法经脱 Boc 化得到的 3' -N-(Gly-Gly- Gly -Gly) -NH-A 的三氟醋酸盐, 按同例 8 同样的方法, 导入在例 5 得到的羧甲  
20 基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (380mg), 合成出标题化合物 (190mg)。本化合物的紫外吸收光谱 (0.1M トリス缓冲液, pH9.0, 0.34mg/ml) 表示在图 5。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.3% (W/W)。

例 11: 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

25 将小鼠纤维肉瘤 Meth A 细胞  $1 \times 10^6$  个移植到 BALB/c 种的雄性小鼠 (7 周龄) 的右鼠颈 (蹊) 部皮下, 制成感染 Meth A 癌小鼠 (1 组 7 只)。在第 7 天将溶解于注射用蒸馏水的例 9 的药物复合物经 Meth A 癌小鼠的尾静脉内每 4 天给药 4 次。在移植后第 21 天摘出肿瘤, 测定重量, 肿瘤增殖抑制率由下式算出: 肿瘤增殖抑制率 (%) =  $[1 - (\text{受试品给药组的平均肿瘤重量} / \text{对照组的平均肿瘤重量})] \times 100$ 。其结果,  
30 在例 9 得到的本发明的药物复合物没有发现毒性 (体重减轻), 与上述医药化合物自身 (没有间隔基以及多糖衍生物) 进行比较, 抗肿瘤

效果大幅度增强。多糖衍生物自身（例 5）以及只导入了间隔基的医药化合物残基（由例 1 的化合物按例 4 的方法脱 BOC 化得到的 H<sub>2</sub>N-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A（A-NH<sub>2</sub>=DX-8951）的三氟醋酸盐）是无效的。

表 2

受试品化合物	给药量(mg/kg)	抑制率(%)
医药化合物自身	7.5 × 4	76
	1.875 × 4	46
	0.9375 × 4	36
例 9 的化合物	1.4 <sup>1)</sup> × 4	94
	0.7 <sup>1)</sup> × 4	59
	0.35 <sup>1)</sup> × 4	41

15

#### <sup>1)</sup> 医药化合物的换算量

例 12: 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

按与例 11 同样的方法作成感染 Meth A 癌小鼠（1 组 6 只），在第 7 天比较将例 8 以及例 9 的药物复合物单次给药时的抗肿瘤作用。

20 其结果，抗肿瘤作用的强度为（多糖衍生物）- Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' > （多糖衍生物）- Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' > 医药化合物自身。没有导入间隔基的医药化合物残基与例 5 的羧甲基葡聚糖多元醇的羧基直接结合的化合物（医药化合物残基的导入量：6.2 重量%）是无效的。

表 3

	受试品化合物	给药量 (mg/kg)	抑制率(%)
5	医药化合物自身	60	77
		20	59
	例 8 的化合物	10 <sup>1)</sup>	85
		5 <sup>1)</sup>	76
10	例 9 的化合物	5 <sup>1)</sup>	98
		2.5 <sup>1)</sup>	87

<sup>1)</sup> 医药化合物的换算量

例 13: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

15 葡聚糖 T500 (10g, 法鲁玛西亚公司制造, 分子量 500K) 溶解于 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5, 1000ml), 加入高碘酸钠 (33g) 的水溶液 (1000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加入乙二醇 (7.0ml), 搅拌一夜。反应液在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加入硼氢化钠 (14g) 溶解后, 搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节

20 至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时后, 用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5 得到溶液 1。另外对于葡聚糖 T500 (10g, 法鲁玛西亚公司制造, 分子量 500K), 进行上述的连续操作, 得到溶液 2。进一步对于葡聚糖 T250 (各 10g, 法鲁玛西亚公司制造, 分子量 250K), 进行上述的连续操作, 得到溶液 3 和溶液 4。合并这些溶液 1~4, 用バイオマックス-50

25 膜经限外过滤法除去低分子组分。高分子组分冷冻干燥后, 得到葡聚糖多元醇 (25g)。此物质的分子量 (凝胶过滤法, プルラン标准) 是 163K。

30 此葡聚糖多元醇 (11g) 加入到在水 (330ml) 中溶解了氢氧化钠 (46.2g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸 (66g), 使其溶解后, 在室温反应一夜。将此反应液用醋酸调节至 pH9 后, 用バイオマックス-30 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (13g)。

此物质的分子量（凝胶过滤，プルラン标准）是 228K，羧甲基化度是 0.4。

上述的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（600mg）溶解于水，上 Bio-Rad AG50W-X2（200-400 目，H<sup>+</sup>型）柱（直径 44mm，长 210mm），用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺（0.93ml）后，进行冷冻干燥，得到标题化合物（690mg）。

例 14: 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 三氟醋酸盐的合成

将在例 1 得到的 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)（79mg）溶解于三氟醋酸（3ml），放置 1 小时。除去溶剂，依次用甲醇（30ml）、乙醇（30ml）分别进行共沸 2 次之后，残渣用乙醇洗净，得到标题化合物（80mg）。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.53 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.40-8.48 (m, 2H), 8.28 (d, 1H, J= 8.3Hz), 7.95-8.07 (br, 3H), 7.81 (d, 1H, J= 10.2Hz), 7.90-7.37 (m, 2H), 7.15-7.30 (m, 5H), 6.50-6.55 (br, 1H), 5.50-5.57 (m, 1H), 5.41 (d, 2H, J= 7.82Hz), 5.25 (s, 2H), 4.55-4.62 (m, 1H), 3.55-3.92 (m, 6H), 3.15-3.25 (br, 2H), 2.98-3.03 (m, 1H), 2.73-2.82 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.84-1.92 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

例 15: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 13 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（400mg）转换成三乙基铵盐（470mg），溶解于 N, N-二甲基甲酰胺（30ml）。在此溶液中，顺次加入在例 14 得到的 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐（62mg）的 N, N-二甲基甲酰胺（5ml）溶液、三乙基胺（0.02ml）、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉（470mg），遮光下在室温边搅拌一夜边反应。此反应液每 5ml 在各 10ml 的乙醇中滴入。在此液中加入 3M 氯化钠水溶液（2.5ml）、乙醚（20ml），析出的沉淀经离心分离收集。此沉淀溶解在 0.5M 氯化钠水溶液中，冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9，用透析膜（スペクトラポア 1，透过分子量 6, 000-8, 000），对纯水透析。透析内液

用米利波阿过滤器 ( $0.22\ \mu\text{m}$ ) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (600mg)。本化合物溶解于 0.1M 氯化钠水溶液, 用 GPC (柱: 东ソ-株式会社制 TSK Gel PW-4000XL, 溶剂: 0.1M NaCl, 流速: 0.8ml/min) 分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱 (0.1M トリス缓冲液, pH9.0, 0.1mg/ml) 分别表示在图 6 及图 7。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.8% (W/W)。

例 16: 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 三氟醋酸盐的合成

10 将在例 2 得到的 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (79mg) 溶解于三氟醋酸 (3ml), 放置 1 小时。除去溶剂, 依次用甲醇 (30ml)、乙醇 (30ml) 分别进行共沸 2 次之后, 残渣用乙醚洗净, 得到标题化合物 (80mg)。

15 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.62-8.66 (m, 2H), 8.23 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.18-8.20 (m, 1H), 7.98-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J= 10.7Hz), 7.32 (s, 1H), 7.09 (d, 2H, J = 7.3Hz), 6.93-7.03 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.18 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.80 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.57-4.59 (m, 1H), 3.57-3.71 (m, 6H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.00-3.02 (m, 1H), 2.80-2.90 (m, 1H), 2.50  
20 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86-2.00 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz)。

例 17: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

25 将在例 13 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (1.0g) 转换成三乙基铵盐 (1.2g), 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (90ml)。在此溶液中, 顺次加入在例 16 得到的 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐 (158mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (15ml) 溶液、三乙基胺 (0.05ml)、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (1.2g), 遮光下在室温边搅拌一夜边反应。此反应液每 5ml 在各  
30 10ml 的乙醇中滴入。在此液中加入 3M 氯化钠水溶液 (2.5ml)、乙醚 (20ml), 析出的沉淀经离心分离收集。此沉淀溶解在 0.5M 氯化钠水

溶液中，冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9，用透析膜（スペクトラポア 1，透过分子量 6,000-8,000），对纯水透析。透析内液用米利波阿过滤器（0.22 μm）过滤后，冷冻干燥，得到标题化合物（1.4g）。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液（pH9.0）中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.2%（W/W）。

例 18: Boc-Gly-Phe-Leu-OH 的合成

在 50%二噁烷水溶液（48ml）中加入 H-Gly-Phe-Leu-OH（3.0g），冰冷却。在此溶液中加入含有 1N 氢氧化钠水溶液（9.45ml）和（Boc）<sub>2</sub>O（2.27g）的二噁烷（24ml）溶液，搅拌一夜。在反应液中加入 1N 盐酸（9.45ml），馏去溶剂。得到的残渣用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇=5：1 溶液）精制，得到标题化合物（2.5g）。

例 19: Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OBzl 的合成

将在例 18 得到的 Boc-Gly-Phe-Leu-OH（2.4g）以及 N-羟基琥珀酰亚胺（656mg）溶解于 N, N-二甲基甲酰胺（50ml），在 4℃ 冷却后，添加 N, N'-二环己基碳化二亚胺（1.17g），搅拌 2 小时。在此溶液中加入溶解了 H-Gly-OBzl 的甲苯磺酸盐（1.9g）和三乙基胺（0.79ml）的 N, N-二甲基甲酰胺（40ml）溶液，在室温边搅拌 16 小时边进行反应。此反应液减压干固，残渣用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇=50:1）精制，得到标题化合物（2.0g）。

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.20-8.30 (m, 1H), 8.12 (d, 1H, J= 8.3Hz), 7.83 (d, 1H, J= 8.3Hz), 7.32-7.37 (m, 5H), 6.89-6.95 (m, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.52-4.59 (br, 1H), 4.34 (dd, 1H, J= 7.3Hz, J= 15.1Hz), 3.93 (dd, 1H, J= 5.5Hz, J= 17.2Hz), 3.84 (dd, 1H, J= 5.5Hz, J= 17.2Hz), 3.54 (dd, 1H, J= 5.9Hz, J= 16.7Hz), 3.42 (dd, J= 5.9Hz, J= 16.7Hz), 3.00 (dd, 1H, J= 4.4Hz, 13.7Hz), 2.78 (dd, 1H, J= 8.8Hz, J= 13.2Hz), 1.50-1.65 (m, 1H), 1.45 (t, 2H, J= 7.3Hz), 1.36 (s, 9H), 0.86 (d, 3H, J= 6.4Hz), 0.82 (d, 3H, J= 6.4Hz).

例 20: Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OH 的合成

将在例 19 得到的 Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OBzl (1.7g) 在醋酸乙酯 (30ml) 和甲醇 (30ml) 的混合溶剂中使其溶解后, 加入 5%Pd-C (1.5g), 进行接触还原。过滤反应液, 滤液减压干燥成固体, 得到  
5 标题化合物 (1.15g)。

例 21: 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 20 得到的 Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OH (200mg) 以及 N-羧基琥珀酰亚胺 (58mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (5ml), 在 4℃ 冷  
10 却后, 添加 N, N-二环己基碳化二亚胺 (104mg) 使其溶解。在此溶液中加入溶解了 DX-8951 的甲烷磺酸盐 (224mg) 和三乙基胺 (0.059ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (5ml) 溶液, 在避光条件下室温边搅拌 16 小时边进行反应。此反应液减压干燥成固体, 得到的残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 含有 0.5%醋酸的二氯甲烷: 甲醇=10:1 溶液) 精制, 得到  
15 标题化合物 (200mg)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.35 (d, 1H, J=7.8Hz), 8.08-8.18 (m, 2H), 7.75-7.85 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.10 (d, 2H, J=6.8Hz), 7.08-7.13 (m, 3H), 6.85-6.95 (br, 1H), 6.40-6.65 (br, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.46 (d, 1H, J=18.5Hz), 5.37(d, 1H, J=18.5Hz), 5.24 (s, 2H), 4.44-4.52 (m, 1H), 4.15-4.25 (m, 1H), 3.68-3.72 (m, 2H), 3.40-3.52 (m, 2H), 3.15-3.25 (br, 2H), 2.85-2.95 (m, 1H), 2.65-2.75 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.80-1.91 (m, 2H), 1.50-1.65 (m, 1H), 1.45 (t, 2H, J=7.3Hz), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=7.4), 0.86 (d, 3H, J=6.4Hz), 0.82 (d, 3H, J=6.4Hz).

25

例 22: 3'-N-(Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 三氟醋酸盐的合成

将在例 21 得到的 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (97mg) 溶解于三氟醋酸 (3ml), 放置 1 小时。除去  
30 溶剂, 依次分别用甲醇 (30ml)、乙醇 (30ml) 各共沸 2 次后, 残渣用乙醚洗净, 得到标题化合物 (95mg)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  : 8.57 (d, 1H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 8.47 (d, 1H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 8.32 (d, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 8.17 (t, 1H,  $J=5.5\text{Hz}$ ), 7.81-7.91 (br, 3H), 7.79 (d, 1H,  $J=10.7\text{Hz}$ ),  
 5 7.32 (s, 1H), 7.21-7.23 (m, 5H), 7.12-7.17 (m, 1H), 6.45-6.55 (br, 1H), 5.57  
 (q, 1H,  $J=4.4\text{Hz}$ ), 5.43 (d, 1H,  $J=16.1\text{Hz}$ ), 5.34 (d, 1H,  $J=16.1\text{Hz}$ ), 5.23 (s, 2H),  
 4.67 (dt, 1H,  $J=4.0\text{Hz}$ ,  $J=9.0\text{Hz}$ ), 4.31 (dd, 1H,  $J=8.5\text{Hz}$ ,  $J=15.0\text{Hz}$ ), 4.0-4.4 (br,  
 1H), 3.74-3.76 (m, 2H), 3.56 (dd, 1H,  $J=6.0\text{Hz}$ ,  $J=16.0\text{Hz}$ ), 3.41 (dd, 1H,  $J=6.0\text{Hz}$ ,  
 $J=16.0\text{Hz}$ ), 3.17-3.19 (br, 2H), 3.02 (dd, 1H,  $J=4.0\text{Hz}$ ,  $J=14.0\text{Hz}$ ), 2.70 (dd, 1H,  
 10  $J=10.0\text{Hz}$ ,  $J=14.0\text{Hz}$ ), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.15 (m, 1H), 1.85 (dt, 2H,  $J=7.0\text{Hz}$ ,  $J=14.0\text{Hz}$ ),  
 1.50-1.55 (m, 1H), 1.45 (t, 2H,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H,  
 $J=7.4$ ), 0.85 (d, 3H,  $J=6.4\text{Hz}$ ), 0.80 (d, 3H,  $J=6.4\text{Hz}$ ).

例 23: 羧甲基葡聚糖多元醇- Gly-Phe-Leu-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-  
 15 8951) 的合成

将在例 13 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (690mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (50ml)。在此溶液中, 顺次加入在例 22 中得到的 3'-N-(Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐 (95mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 溶液、三乙基胺 (0.03ml)、  
 20 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (690mg), 在室温边搅拌一夜边进行反应。此反应液的每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中加入 3M 氯化钠水溶液 (2.5ml)、乙醚 (20ml), 析出的沉淀经离心分离收集。此沉淀溶解在 0.5M 氯化钠水溶液中, 冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9, 用透析膜 (スペクトラポア 1, 透过分子量  
 25 6,000-8,000), 对纯水透析。透析内液用米利波阿过滤器 (0.22  $\mu\text{m}$ ) 过滤后, 滤液冷冻干燥, 得到标题化合物 (600mg)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 4.8% (W/W)。

例 24: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

30 葡聚糖 T500 (50g, 法鲁玛西亚公司制造, 分子量 500K) 溶解于 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5, 5000ml), 加入高碘酸钠 (165.0g) 的水溶液 (5000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (35.0ml),

搅拌一夜。反应液用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加入氯化硼钠 (70g) 溶解后, 搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时后, 用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-50 膜经限外过滤法除去低分子组分。高分子组分冷冻干燥后, 得到葡聚糖多元醇 (27.1g)。此物质的分子量 (凝胶过滤法, プルラン标准) 是 140K。

此葡聚糖多元醇 (5g) 加入到在水 (150ml) 中溶解了氢氧化钠 (21g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸 (30g), 使其溶解后, 在室温反应一夜。将此反应液用醋酸调节至 pH8 后, 用バイオマックス-50 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (5.6g)。此物质的分子量 (凝胶过滤, プルラン标准) 是 263K, 羧甲基化度是 0.4。

上述的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (2.0g) 溶解于水, 上 Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 目, H<sup>+</sup>型) 柱 (直径 44mm, 长 210mm), 用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺 (4ml) 后, 进行冷冻干燥, 得到标题化合物 (2.2g)。

#### 例 25: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将在例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (1.0g) 溶解于水, 上 Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 目, Me<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>型) 柱, 用水洗脱。冷冻干燥此洗脱液, 得到标题化合物 (950mg)。

#### 例 26: 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 盐酸盐的合成

用与例 14 同样的方法从 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (400mg) 得到的 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A 三氟醋酸盐溶解于水-MeOH (1:4) 中, 上 Bio-Rad AG 1-X8 (200-400 目, Cl<sup>-</sup>型) 柱 (1.5cm × 8.6cm), 用上述溶剂洗脱。浓缩此洗脱液后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (310mg)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.53 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.46-8.48 (m, 1H), 8.37-8.39 (m, 1H), 7.95 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.80 (s, 3H), 7.78 (d, 1H, J=11.1Hz), 7.34 (s, 1H), 7.14-7.24 (m, 5H), 6.50 (s, 1H), 5.56-5.60 (m, 1H), 5.35-5.40 (m, 2H), 5.24

(s, 2H), 4.51-4.56 (m, 1H), 3.86 (dd, J=4.8, 13.5Hz, 1H), 3.68-3.79 (m, 3H), 3.54 (s, 2H), 3.15-3.22 (m, 2H), 3.01 (dd, J=5.6, 13.5Hz, 1H), 2.78 (dd, J=9.6, 3.5Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.12-2.23 (m, 2H), 1.81-1.89 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=7.2Hz).

5 Mass (FAB); m/e 753 (M+1)

例 27: 羧甲基葡聚糖多元醇- Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 25 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三甲基铵盐 (0.1g) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (6ml)。在此溶液中, 顺次加入在例 26 中得到的 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的盐酸盐 (24mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 溶液、三乙基胺 (5 μl)、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (0.1g), 在室温边搅拌一夜边进行反应。此反应液的每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中加入 3M 氯化钠水溶液 (2.5ml)、乙醚 (20ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀溶解在 0.5M 氯化钠水溶液中, 冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9, 得到的水溶液用バイオマックス-30 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22 μm) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (90mg)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 11% (W/W)。

例 28: 羧甲基葡聚糖多元醇- Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 25 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三甲基铵盐 (0.1g) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (6ml)。在此溶液中, 顺次加入在例 26 中得到的 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly) - NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的盐酸盐 (36mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 溶液、三乙基胺 (8 μl)、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (0.1g), 在室温边搅拌一夜边进行反应。此反应液的每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中加入 3M 氯化钠水溶液 (2.5ml)、乙醚 (20ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀溶解在 0.5M 氯化钠水溶液中, 冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH12。得到的水溶液用バイオ

マックス-30膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器(0.22 $\mu$ m)过滤后,冷冻干燥,得到标题化合物(80mg)。本化合物溶解于0.1M氯化钠水溶液,用GPC(柱:东ソ-TSK Gel PW-4000XL,溶剂:0.1MNaCl,流速:0.8ml/min)分析出的结果、以及  
5 本化合物的紫外吸收光谱(0.1Mトリス缓冲液,pH9.0,36 $\mu$ g/ml)分别表示在图8及图9。本化合物的医药化合物残基的含量根据在0.1Mトリス缓冲液(pH9.0)中的362nm处的吸收度进行定量时是15%(W/W)。

例 29: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Gly -Phe -NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)的合成  
10

葡聚糖 T250 (20g, EXTRASYNTHESSE 制, 平均分子量为 250K) 溶解于 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5, 2000ml), 加入高碘酸钠 (66.0g) 的水溶液 (2000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (14.0ml), 搅拌一夜。反应液在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加入  
15 硼氢化钠 (28g) 溶解后, 在室温搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时后, 在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-30 膜经限外过滤法除去低分子组分, 得到没有通过膜的残留溶液 1。另外, 葡聚糖 T250 (50g, EXTRASYNTHESSE 制, 平均分子量为 250K) 溶解于 0.1M 醋酸缓  
20 冲液 (pH5.5, 5000ml), 加入高碘酸钠 (165g) 的水溶液 (5000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (35.0ml), 搅拌一夜。反应液在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加入硼氢化钠 (70g) 溶解后, 在室温搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至  
25 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时后, 在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-30 膜经限外过滤法除去低分子组分, 得到没有通过膜的残留溶液 2。合并残留溶液 1 和残留溶液 2, 经限外过滤法将通过バイオマックス-50 膜的组分用バイオマックス-30 膜除去低分子组分, 冷冻干燥后, 得到葡聚糖多元醇 (25.7g)。此物质的分子量 (凝胶过滤法, プルラン标准) 是 47K。

30 此葡聚糖多元醇 (5g) 加入到在水 (150ml) 中溶解了氢氧化钠 (35g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸 (50g), 使其溶解后, 在室温反应 18 小时。将此反应液用

醋酸调节至 pH8 后，用バイオマックス-50 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (7.2g)。此物质的分子量 (凝胶过滤, ブルラン标准) 是 127K, 羧甲基化度是 0.8。这个羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (2.2g) 溶解于水，  
5 上 Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 目, H<sup>+</sup>型) 柱 (直径 44mm, 长 210mm), 用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺 (4ml) 后, 进行冷冻干燥, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (2.69g)。

将这个羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (2.67g) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (200ml)。在此溶液中, 顺次加入在 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 中溶解了由和例 2 同样的方法合成出的 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (350mg), 经用和例 16 同样的方法脱 Boc 化后得到的 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A 的三氟醋酸盐和三乙基胺 (0.116ml) 得到的溶液、在 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 中溶解了 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉  
15 (2.67g) 得到的溶液, 在室温边搅拌一夜边进行反应。在此反应液中加入 3M 氯化钠水溶液 (100ml), 每 8ml 滴入到各 30ml 的乙醇中。在此液中分别加入 3M 氯化钠水溶液 (1ml)、乙醚 (5ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀用丙酮洗净后, 溶解于水, 加入 3M 氯化钠水溶液 (10ml) 后, 用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节  
20 至 pH9, 在 37℃ 处理 1 小时。此处理液用バイオマックス-10 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22 μm) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (2.30g)。本化合物溶解于 0.1M 氯化钠水溶液, 用 GPC (柱: 东ソ-TSK Gel PW-4000XL, 溶剂: 0.1MNaCl, 流速: 0.8ml/min) 分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱 (0.1M  
25 トリス缓冲液, pH9.0, 0.20mg/ml) 分别表示在图 10 及图 11。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.8% (W/W)。

#### 例 30: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

在葡聚糖 T10 (20g, 法鲁玛西亚公司制造, 分子量 10K) 的 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5) 溶液 (2000ml) 中, 加入高碘酸钠 (66.0g) 的水溶液 (2000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (14.0ml), 搅拌一夜。反应液在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加  
30

入硼氢化钠 (28g) 溶解后, 在室温搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时后, 在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-5 膜 (ミリポア公司制造) 经限外过滤法除去低分子组分, 没有通过膜的残留溶液再通过バイオマックス-30 膜。得到的滤液冷冻干燥后, 得到葡聚糖多元醇 (8.0g)。此物质的分子量 (凝胶过滤法, プルラン标准) 是 13K。

此葡聚糖多元醇 (3.7g) 加入到在水 (111ml) 中溶解了氢氧化钠 (25.9g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸 (37g), 使其溶解后, 在室温反应 20 小时。将此反应液用醋酸调节至 pH8 后, 用バイオマックス-5 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (6.2g)。此物质的分子量 (凝胶过滤, プルラン标准) 是 37K, 羧甲基化的取代度是 0.9。

将此羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (6.0g) 溶解于水, 上 Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 目, H<sup>+</sup>型) 柱, 用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺 (9.3ml) 后, 进行冷冻干燥, 得到标题化合物 (7.2g)。

#### 例 31: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

在例 30 得到的葡聚糖多元醇 (3.9g) 加入到在水 (117ml) 中溶解了氢氧化钠 (16.3g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸 (23.4g) 使其溶解后, 在室温反应 18 小时。将此反应液用醋酸调节至 pH8 后, 用バイオマックス-5 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (5.0g)。此物质的分子量 (凝胶过滤, プルラン标准) 是 28K, 羧甲基化度是 0.5。这个羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (4.8g) 与例 30 同样的转换成三乙基铵盐, 得到标题化合物 (5.6g)。

#### 例 32: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

在葡聚糖 4 (20g, フナコシ公司制造, 平均分子量 4K-6K) 的 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5) 溶液 (2000ml) 中, 加入高碘酸钠 (66.0g) 的水溶液 (2000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (14.0ml), 搅拌一夜。反应液在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加入硼氢化钠 (28g) 溶解后, 在室温搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时后, 在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶

液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-3 膜（ミリポア公司制造）经限外过滤法除去低分子组分。得到的滤液冷冻干燥后，得到葡聚糖多元醇（6.0g）。此物质的分子量（凝胶过滤法，プルラン标准）是 9K。此葡聚糖多元醇（2.7g）加入到在水（81ml）中溶解了  
5 氢氧化钠（18.9g）后得到的水溶液中，在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸（27g），使其溶解后，在室温反应 20 小时。将此反应液用醋酸调节至 pH8 后，用バイオマックス-5 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（4.2g）。此物质的分子量（凝胶过滤，プルラン标准）是 20K，  
10 羧甲基化度是 0.9。

此羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（4.0g）与例 30 同样转换成三乙基铵盐，得到标题化合物（4.8g）。

#### 例 33: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

在例 32 得到的葡聚糖多元醇（2.7g）加入到在水（81ml）中溶解  
15 了氢氧化钠（11.3g）后得到的水溶液中，在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸（16.2g）使其溶解后，在室温反应 18 小时。将此反应液用醋酸调节至 pH8 后，用バイオマックス-5 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（2.7g）。此物质的分子量（凝胶过滤，プルラン标准）是  
20 16K，羧甲基化度是 0.5。这个羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（2.7g）与例 30 同样的转换成三乙基铵盐，得到标题化合物（3.1g）。

#### 例 34: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A'（A-NH<sub>2</sub>=DX-8951）的合成

将在例 30 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（1.5g）溶解  
25 于 N, N-二甲基甲酰胺（90ml）。在此溶液中，顺次加入三乙基胺（0.07ml）和 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A（A-NH<sub>2</sub>=DX-8951）的三氟醋酸盐（210mg）的 N, N-二甲基甲酰胺（40ml）溶液、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉（1.5g），在室温边搅拌一夜边进行反应。将此反应液每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中分别加入  
30 3M 氯化钠水溶液（2.5ml）、乙醚（20ml），析出的沉淀经离心分离（3500rpm, 8 分钟）收集。此沉淀溶解于 0.5M 氯化钠水溶液，在冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9。得到的水溶液用バイオマ

クス-3膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器(0.22 $\mu$ m)过滤后,冷冻干燥,得到标题化合物(1.3g)。本化合物溶解于0.1M氯化钠水溶液,用GPC(柱:东ソ-TSK Gel PW-4000XL,溶剂:0.1MNaCl,流速:0.8ml/min)分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱(0.1Mトリス缓冲液,pH9.0,65 $\mu$ g/ml)分别表示在图12及图13。本化合物的医药化合物残基的含量根据在0.1Mトリス缓冲液(pH9.0)中的362nm处的吸收度进行定量时是6.4%(W/W)。

例 35: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)的合成

10 将在例31得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐(1.2g)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(90ml)。在此溶液中,顺次加入三乙基胺(0.056ml)和3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A(A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)的三氟醋酸盐(168mg)的N,N-二甲基甲酰胺(30ml)溶液、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二羟基喹啉(1.2g),在室温边搅拌一夜边进行反应。将此反应液每5ml滴入到各10ml的乙醇中。在此液中分别加入15 3M氯化钠水溶液(2.5ml)、乙醚(20ml),析出的沉淀经离心分离(3500rpm,8分钟)收集。此沉淀溶解于0.5M氯化钠水溶液,在冰冷下用0.1M氢氧化钠水溶液调节至pH9。得到的水溶液用バイオマックス-3膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器(0.22 $\mu$ m)过滤后,冷冻干燥,得到标题化合物(1.0g)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在0.1Mトリス缓冲液(pH9.0)中的362nm处的吸收度进行定量时是4.8%(W/W)。

例 36: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)的合成

25 将在例32得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐(1.2g)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(90ml)。在此溶液中,顺次加入三乙基胺(0.056ml)和3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A(A-NH<sub>2</sub>=DX-8951)的三氟醋酸盐(168mg)的N,N-二甲基甲酰胺(30ml)溶液、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二羟基喹啉(1.2g),在室温边搅拌一夜边进行反应。将此反应液每5ml滴入到各10ml的乙醇中。在此液中分别加入30 3M氯化钠水溶液(2.5ml)、乙醚(20ml),析出的沉淀经离心分离(3500rpm,8分钟)收集。此沉淀溶解于0.5M氯化钠水溶液,在冰

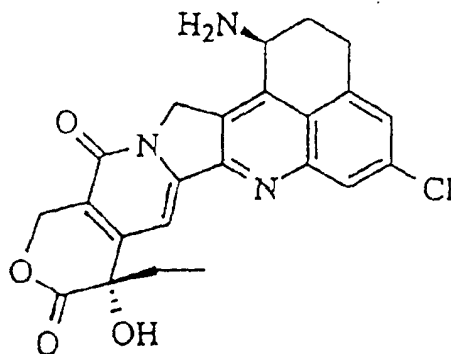
冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9。得到的水溶液用バイオマックス-3 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22  $\mu\text{m}$ ) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (1.0g)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M 三醋酸缓冲液 (pH9.0) 中的  
5 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.9% (W/W)。

例 37: 羧甲基葡聚糖多元醇- Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 33 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (1.5g) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (90ml)。在此溶液中, 顺次加入三乙基胺  
10 (0.07ml) 和 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐 (210mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (40ml) 溶液、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (1.5g), 在室温边搅拌一夜边进行反应。将此反应液每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中分别加入  
15 3M 氯化钠水溶液 (2.5ml)、乙醚 (20ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀溶解于 0.5M 氯化钠水溶液, 在冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9。得到的水溶液用バイオマックス-3 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22  $\mu\text{m}$ ) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (1.3g)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的  
20 362nm 处的吸收度进行定量时是 4.6% (W/W)。

例 38: Boc- Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DW-8286) 的合成

Boc- Gly-Gly-Phe-Gly (42mg) 以及 N-羟基琥珀酰亚胺 (12mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (2ml), 在 4℃ 冷却后, 加入 N, N'-二  
25 环己基碳化二亚胺 (22mg)。在此溶液中加入溶解了用下述式:



表示的化合物 [(1s, 9s)-1-氨基-5-氯-9-乙基-2, 3-二氢-9-羟基-1H, 12H-苯并[de]吡喃[3', 4':6, 7]中氮茛并[1, 2-b]喹啉-10, 13(9H, 15H)-二酮: DW-8286]的盐酸盐(50mg)和三乙基胺(0.01ml)的 N, N-二甲基甲酰胺(6ml)溶液, 遮光, 在室温边搅拌 16 小时边进行反应。此反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱(洗脱液: 含有 0.5% 醋酸的二氯甲烷: 甲醇=10:1 溶液)精制, 得到标题化合物(27mg)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ : 8.10-8.20 (br, 1H), 7.95-8.05 (br, 1H), 7.70-7.80 (br, 2H), 7.50-7.60 (br, 1H), 7.40-7.50 (br, 1H), 7.10-7.25 (m, 5H), 7.05-7.15 (br, 1H), 5.85-5.95 (br, 1H), 5.50-5.60 (br, 1H), 5.40-5.50 (m, 1H), 5.25-5.35 (m, 1H), 5.05-5.15 (m, 1H), 4.90-5.00 (m, 1H), 4.70-4.80 (br, 1H), 4.10-4.25 (br, 2H), 3.60-3.90 (m, 4H), 3.10-3.40 (m, 3H), 2.95-3.05 (br, 1H), 2.15-2.30 (br, 1H), 1.75-1.90 (br, 2H), 1.39 (s, 9H), 0.80-1.00 (m, 3H)。

15

例 39: 羧甲基葡聚糖多元醇- Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DW-8286) 的合成

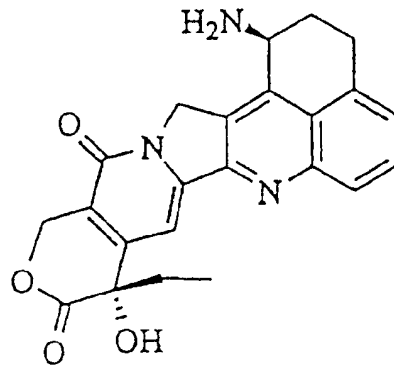
将在例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐(175mg)溶解于 N, N-二甲基甲酰胺(20ml)。在此溶液中, 顺次加入在 N, N-二甲基甲酰胺(5ml)中溶解了由例 38 得到的 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DW-8286)(27mg) 经用和例 4 同样的方法脱 Boc 化后得到的 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A 的三氟醋酸盐(29mg) 和三乙基胺(9 $\mu$ l) 得到的溶液、及 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉(175mg), 在室温边搅拌一夜边进行反应。此反应液的每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中分别加入 3M 氯化钠水溶液(2.5ml)、乙醚(20ml), 析出的沉淀经离心分离(3500rpm, 8 分钟)收集。此沉淀溶解于 0.5M 氯化钠水溶液, 在冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9。得到的水溶液用バイオマックス-30 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器(0.22 $\mu$ m) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物(135mg)。本化合物溶解于 0.1M 氯化钠水溶液, 用 GPC(柱: 东ソ-TSK Gel PW-4000XL, 溶剂: 0.1MNaCl,

流速: 0.8ml/min)分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱(0.1M トリス缓冲液, pH9.0, 99 $\mu$ g/ml)分别表示在图14及图15. 本化合物的医药化合物残基的含量根据在0.1M トリス缓冲液(pH9.0)中的362nm处的吸收度进行定量时是6.1%(W/W)。

5 例40: 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DW-8089)的合成

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (163mg) 以及 N-羧基琥珀酰亚胺 (45mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml), 在 4℃ 冷却后, 加入 N, N'-二环己基碳化二亚胺 (79mg)。在此溶液中加入溶解了用下述式:

10



15

表示的化合物 [(1s, 9s)-1-氨基-9-乙基-2, 3-二氢-9-羟基-1H, 20 12H-苯并[de]吡喃[3', 4':6, 7]中氮茛并[1, 2-b]喹啉-10, 13(9H, 15H)-二酮: DW-8089]的甲苯磺酸盐 (170mg) 和三乙基胺 (0.054ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (30ml) 溶液, 遮光, 在室温边搅拌一夜边进行反应。此反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 含有 0.5% 醋酸的二氯甲烷: 甲醇=94:6 溶液) 精制, 得到标题化合物 (100mg)。

25 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.51 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.41 (t, 1H, J=5.6Hz), 8.29 (s, 1H), 8.17 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.03 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.90 (dd, 1H, J=4.8, 5.6Hz), 7.79 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.53 (d, 1H, J=7.2Hz), 7.36 (s, 1H), 7.13-7.25 (m, 5H), 6.94-6.95 (m, 1H), 5.60-5.63 (m, 1H), 5.36-5.47 (m, 2H), 5.21-5.30 (m, 2H), 4.42-4.47 (m, 1H), 3.63-3.96 (m, 3H), 3.51-3.59 (m, 3H), 3.31-3.40 (m, 1H), 3.09-3.21 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.76-2.81 (m, 1H), 2.13-2.17 (m, 2H), 1.85-1.90 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.89 (t, 3H, J=8.0Hz).

30

Mass (FAB); m/e 822 (M+1)

例 41: 羧甲基葡聚糖多元醇- Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DW-8089) 的合成

将在例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (1.6g) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (60ml)。在此溶液中, 顺次加入在 N, N-二甲基甲酰胺 (20ml) 中溶解了由例 40 得到的 3' -N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DW-8089) (200mg) 经用和例 4 同样的方法脱 Boc 化后得到的 3' -N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A 的三氟醋酸盐和三乙基胺 (0.07ml) 得到的溶液、及 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (1.6g), 在室温边搅拌一夜边进行反应。此反应液的每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中分别加入 3M 氯化钠水溶液 (2.5ml)、乙醚 (25ml), 析出的沉淀经离心分离 (2500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀用乙醇洗净后, 溶解于水, 加入 3M 氯化钠水溶液 (20ml), 用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9。得到的水溶液用バイオマックス-10 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22 μm) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (1.20g)。本化合物溶解于 0.1M 氯化钠水溶液, 用 GPC (柱: 东ソ-TSK Gel PW-4000XL, 溶剂: 0.1MNaCl, 流速: 0.8ml/min) 分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱 (0.1M トリス缓冲液, pH9.0, 0.26mg/ml) 分别表示在图 16 及图 17。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.0% (W/W)。

例 42: 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将葡聚糖 T150 (20g, 法鲁玛西亚公司制造, 分子量 150K) 溶解于 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5, 2000ml), 加入高碘酸钠 (66.0g) 的水溶液 (2000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (14.0ml), 搅拌一夜。反应液在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。加入硼氢化钠 (28g) 溶解后, 在室温搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时。在冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-5 膜 (ミリポア公司制造) 经限外过滤法一直浓缩到 500ml, 得到溶液 1。另外对于葡聚糖 T110 (20g) 进行上述的一连串的操作, 得到溶液 2。混合溶液 1 和溶

液2, 混合溶液的 pH 调节至 3.0, 在 40℃ 置于恒温箱 4 小时后, 调节 pH 至 7, 得到含有被低分子化的葡聚糖多元醇的溶液。使其通过バイオマ,クス-30 膜, 接着用バイオマ,クス-5 膜脱盐后, 冷冻干燥, 得到葡聚糖多元醇 (4.6g)。此物质的分子量 (凝胶过滤法, プルラン标准) 是 17K。

此葡聚糖多元醇 (2.5g) 加入到在水 (75ml) 中溶解了氢氧化钠 (17.5g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸 (25g), 使其溶解后, 在室温反应 20 小时。将此反应液用醋酸调节至 pH9 后, 用バイオマ,クス-5 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (4.0g)。此物质的分子量 (凝胶过滤, プルラン标准) 是 45K, CM 化度是 0.9。

这个羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (3.7g) 溶解于水, 上 Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 目, H<sup>+</sup>型) 柱, 用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺 (5.8ml) 后, 进行冷冻干燥, 得到标题化合物 (4.4g)。

例 43: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 42 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (4.4g) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (300ml)。在此溶液中, 顺次加入含有三乙基胺 (0.19ml) 和 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐 (580mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (45ml) 溶液、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (4.4g), 遮光, 在室温边搅拌一夜边进行反应。将此反应液用 1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH10 后, 每 5ml 滴入到各 25ml 的乙醇中。在此液中分别加入 3M 氯化钠水溶液 (1ml)、乙醚 (5ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀溶解于水, 用透析膜 (スペクトラポア 1, 透过分子量 6, 000-8, 000), 向纯水透析, 透析内液用米利波阿过滤器 (0.22 μm) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (3.4g)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 4.6% (W/W)。

例 44: α-甲基羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

在例 42 得到的葡聚糖多元醇 (2g), 加入到在水 (60ml) 中溶解了氢氧化钠 (14g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液内冰冷下加入  $\alpha$ -溴代丙酸 (19ml) 并使其溶解后, 在室温下反应 18 小时。此反应液在冰冷下用醋酸调节至 pH8, 用バイオマックス-50 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后, 得到  $\alpha$ -甲基羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (2.95g)。此物质的分子量 (凝胶过滤法, プルラン标准) 是 45K。相当于糖残基的  $\alpha$ -甲基羧甲基化度, 以羧甲基葡聚糖多元醇为标准, 由下述的方法求出。将  $\alpha$ -甲基羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐的水溶液上 Bio-Rad AG50W-X2 ( $H^+$ 型) 柱, 洗脱液冷冻干燥后用作供试品。此供试品溶解于定量过量 0.1N 氢氧化钠水溶液, 以酚酞为指示剂用 0.1N 盐酸滴定。供试品的取样量为  $s$ (mg)、0.1N 氢氧化钠水溶液的准确加入量为  $a$ (ml)、0.1N 盐酸的滴定量为  $b$ (ml),  $\alpha$ -甲基羧甲基化度通过式  $13.4(a-b)/[s-7.2(a-b)]$  求出。其结果  $\alpha$ -甲基羧甲基化度是 0.8。

将此  $\alpha$ -甲基羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (2.2g) 溶解于水, 上 Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 目,  $H^+$ 型) 柱 (直径 44mm, 长 210mm), 用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺 (4ml) 后, 进行冷冻干燥, 得到  $\alpha$ -甲基羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (2.69g)。

将这个  $\alpha$ -甲基羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (2.68g) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (60ml)。在此溶液中, 顺次加入: 在 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 中溶解了由和例 2 同样的方法合成出的 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (350mg) 经用和例 16 同样的方法脱 Boc 化后得到的 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A 的三氟醋酸盐和三乙基胺 (0.116ml) 得到的溶液、及在 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml) 中溶解了 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (2.68g) 得到的溶液, 在室温边搅拌一夜边进行反应。在此反应液中加入 3M 氯化钠水溶液 (40ml), 每 6ml 滴入到各 30ml 的乙醇中。在此液中分别加入 3M 氯化钠水溶液 (1ml)、乙醚 (5ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀用丙酮洗净后, 溶解于水, 加入 3M 氯化钠水溶液 (10ml) 后, 用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节至 pH9, 在 37℃ 处理 1 小时。此处理液用バイオマックス-10 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22  $\mu$ m)

过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (2.15g)。本化合物溶解于 0.1M 氯化钠水溶液, 用 GPC(柱: 东ソ-TSK Gel PW-4000XL, 溶剂: 0.1MNaCl, 流速: 0.8ml/min)分析出的结果、以及本化合物的紫外吸收光谱(0.1M トリス缓冲液, pH9.0, 0.21mg/ml) 分别表示在图 18 及图 19。本化  
5 化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 5.9% (W/W)。

例 45: 3'-N-(Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=D W-8951) 三氟醋酸盐的合成

将 Phe-Gly-OBzl 的 p-甲苯磺酸盐 (3.06g)、Boc-Gly-OH  
10 (1.10g)、N-羟基琥珀酰亚胺 (941mg)、N-甲基吗啉 (0.725ml)、N, N-二甲基甲酰胺 (40ml) 的混合物在 4℃ 冷却后, 加入 N, N'-二环己基碳化二亚胺 (1.56g)。在室温边搅拌一夜边进行反应, 反应液减压干固。残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 二氯甲烷: 甲醇=98:2 溶液) 精制, 得到 Boc-Gly-Phe-Gly-OBzl (1.93g)。

15

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.52 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 7.97 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.30-7.39 (m, 5H), 7.15-7.26 (m, 5H), 6.83 (t, 1H, J=5.6Hz), 5.14 (s, 1H), 4.52-4.57 (m, 1H), 3.87-3.96 (m, 2H), 3.57 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.43 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.01 (dd, 1H, J=4.8, 14.3Hz), 2.77 (dd, 1H, J=5.6, 14.3Hz), 1.37 (s, 9H).

20

得到的 Boc-Gly-Phe-Gly-OBzl (1.78g) 溶解于醋酸乙酯 (60ml), 在 5%-Pd-C (1.8g) 存在下, 接触还原 24 小时。滤除催化剂, 滤液减压浓缩, 得到 Boc-Gly-Phe-Gly-OH (1.41g)。

25

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.35 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.94 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.15-7.26 (m, 5H), 6.85 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 4.52-4.58 (m, 1H), 3.76 (d, 2H, J=5.6Hz), 3.56 (dd, 1H, J=6.4, 16.7Hz), 3.43 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.03 (dd, 1H, J=5.0, 13.5Hz), 2.79 (dd, 1H, J=9.5, 13.5Hz), 1.37 (s, 9H).

30

在上面得到的 Boc-Gly-Phe-Gly-OH (500mg) 以及 N-羟基琥珀酰亚胺 (161mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml)。在此溶液中加入溶解了 DX-8951 的甲磺酸盐 (530mg) 和三乙基胺 (0.146ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (50ml) 溶液, 在 4°C 冷却后, 加入 N, N'-二环己基碳化二亚胺 (268mg)。遮光下在室温边搅拌一夜边进行反应。反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 二氯甲烷: 甲醇=96:4 溶液) 精制, 得到 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (100mg)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.39 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.34 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.98 (d, 1H, J=7.2Hz), 7.78 (d, 1H, J=10.3Hz), 7.33 (s, 1H), 7.13-7.24 (m, 5H), 6.80 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 5.55-5.61 (m, 1H), 5.44 (d, 1H, J=16.0Hz), 5.41 (d, 1H, J=16.0Hz), 5.25 (s, 2H), 4.43-4.46 (m, 1H), 3.69-3.79 (m, 2H), 3.50 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.41 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.16-3.19 (m, 2H), 2.98 (dd, 1H, J=4.8, 14.3Hz), 2.79 (dd, 1H, J=9.5, 14.3Hz), 2.41 (s, 3H), 2.19-2.25 (m, 1H), 2.10-2.15 (m, 1H), 1.82-1.90 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz)。

Mass (FAB); m/e 797 (M+1)

得到的 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (100mg) 溶解于三氟醋酸 (3ml), 放置 1 小时。除去溶剂, 依次分别用甲醇 (30ml)、乙醇 (30ml) 各共沸 2 次后, 残渣用乙醚洗净, 得到标题化合物 (80mg)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.52-8.62 (m, 1H), 7.94 (s, 3H), 7.79 (t, 1H, J=11.1Hz), 7.34 (s, 1H), 7.15-7.27 (m, 5H), 6.52 (s, 1H), 5.57-5.61 (m, 1H), 5.36-5.46 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66-4.70 (m, 1H), 3.69-3.81 (m, 2H), 3.61-3.68 (m, 1H), 3.40-3.47 (m, 1H), 3.15-3.23 (m, 1H), 3.01 (dd, 1H, J=4.0, 13.5Hz), 2.77 (dd, 1H, J=9.5, 13.5Hz), 2.12-2.23 (m, 2H), 1.81-1.91 (m, 2H), 0.89 (t, 3H, J=7.2Hz)。

Mass (FAB); m/e 697 (M+1)

例 46: 3'-N-(Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 三氟醋酸盐的合成

Boc-Phe-Gly (771mg) 以及 N-羧基琥珀酰亚胺 (300mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml)。在此溶液中加入溶解了 DX-8951 的甲磺酸盐 (1058mg) 和三乙基胺 (0.293ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (50ml) 溶液, 在 4℃ 冷却后, 加入 N, N'-二环己基碳化二亚胺 (494mg)。遮光下在室温边搅拌一夜边进行反应。反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 二氯甲烷: 甲醇=98:2 溶液) 精制, 得到 3'-N-(Boc-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (1.20g)。

10

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.29 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.21 (t, 1H, J=4.8Hz), 7.76 (d, 1H, J=10.3Hz), 7.32 (s, 1H), 7.13-7.25 (m, 5H), 6.92 (d, 1H, J=7.2Hz), 6.49 (s, 1H), 5.56-5.61 (m, 1H), 5.44 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.38 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.25 (s, 2H), 4.08-4.12 (m, 1H), 3.78 (d, 1H, J=4.8Hz), 3.16-3.25 (m, 2H), 2.99 (dd, 1H, J=4.0, 13.5Hz), 2.72 (dd, 1H, J=10.3, 13.5Hz), 2.40 (s, 3H), 2.09-2.35 (m, 2H), 1.80-1.91 (m, 2H), 1.16 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz).

15

Mass (FAB); m/e 741 (M+1)

20 在上面得到的 3'-N-(Boc-Phe-Gly)-NH-A (170mg) 溶解于三氟醋酸 (4ml), 放置 1 小时。除去溶剂, 依次分别用甲醇 (10ml)、乙醇 (10ml) 各共沸 2 次后, 残渣用乙醚洗净, 得到标题化合物 (100mg)。

25

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.88 (t, 1H, J=4.8Hz), 8.68 (d, 1H, J=8.7Hz), 8.05-8.15 (m, 3H), 7.79 (d, 1H, J=11.1Hz), 7.26-7.36 (m, 5H), 6.52 (d, 1H, J=7.2Hz), 5.57-5.62 (m, 1H), 5.43 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.38 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.19-5.28 (m, 1H), 4.10-4.18 (m, 1H), 3.93 (dd, 1H, J=4.8, 16.7Hz), 3.82 (dd, 1H, J=4.8, 16.7Hz), 3.17-3.24 (m, 2H), 3.14 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.95 (dd, 1H, J=8.0, 13.5Hz), 2.42 (s, 3H), 2.14-2.25 (m, 2H), 1.83-1.91 (m, 2H), 0.89 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 640 (M+1)

例 47: 3' -N-Gly-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 三氟醋酸盐的合成

DX-8951 的甲烷磺酸盐 (530mg) 和三乙基胺 (0.28ml) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (10ml), 在 4℃ 冷却后, 加入 Boc-Gly 的 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (327mg)。遮光下在室温边搅拌一夜边进行反应。反应液减压干固, 残渣用硅胶柱色谱 (洗脱液: 二氯甲烷: 甲醇=98:2 溶液) 精制, 得到 3' -N-(Boc-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) (500mg)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.38 (d, 1H, J=8.3Hz), 7.77 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.31 (s, 1H), 6.89-6.91 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.55-5.59 (m, 1H), 5.45 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.38 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.27 (d, 1H, J=19.0Hz), 5.18 (d, 1H, J=19.0Hz), 3.50-3.62 (m, 2H), 3.15-3.19 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.18-2.24 (m, 1H), 2.08-2.12 (m, 1H), 1.81-1.91 (m, 2H), 1.31 (s, 9H), 0.87 (t, 3H, J=8.0Hz)。

Mass (FAB); m/e 593 (M+1)

在上面得到的 3' -N-(Boc-Gly)-NH-A (100mg) 溶解于三氟醋酸 (2ml), 放置 1 小时。除去溶剂, 依次分别用甲醇 (10ml)、乙醇 (10ml) 各共沸 2 次后, 残渣用乙醚洗净, 得到标题化合物 (70mg)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.88 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.08 (s, 3H), 7.81 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.34 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.63-5.67 (m, 1H), 5.45 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.40 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.36 (d, 1H, J=19.1Hz), 5.25 (d, 1H, J=19.1Hz), 3.56 (s, 2H), 3.11-3.19 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.23-2.28 (m, 1H), 2.11-2.19 (m, 1H), 1.81-1.91 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz)。

Mass (FAB); m/e 493 (M+1)

例 48: 羧甲基葡聚糖多元醇的三甲基铵盐的合成

将葡聚糖 T500 (50g, 法鲁玛西亚公司制造, 分子量 500K) 溶解于 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5, 5000ml), 加入高碘酸钠 (165.0g) 的水溶液 (5000ml)。边遮光边在 4℃ 下搅拌 10 天后, 加乙二醇 (35.0ml), 搅拌一夜。反应液用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7。加入氯化硼钠 (70g) 溶解后, 搅拌一夜。将反应液冰冷却, 用醋酸调节至 pH5.5, 在 4℃ 搅拌 1 小时。用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.5。得到的水溶液用バイオマックス-50 膜经限外过滤法进行脱盐。没有通过膜的残留

溶液冷冻干燥, 得到葡聚糖多元醇 (20.2g)。此物质的分子量 (凝胶过滤法, プルラン标准) 是 159K。

此葡聚糖多元醇 (7.5g) 加入到在水 (225ml) 中溶解了氢氧化钠 (31.5g) 后得到的水溶液中, 在室温使其溶解。在此溶液中冰冷下加入一氯醋酸 (45g), 使其溶解后, 在室温反应一夜。将此反应液用醋酸调节至 pH8 后, 用バイオマックス-50 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液冷冻干燥后, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (8.5g)。此物质的分子量 (凝胶过滤, プルラン标准) 是 274K, 羧甲基化度是 0.4。这个羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (2.0g) 溶解于水, 上 Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 目, H<sup>+</sup>型) 柱 (直径 44mm, 长度 210mm), 用水洗脱。在此洗脱液中加入三乙基胺 (4ml) 后, 进行冷冻干燥, 得到标题化合物 (2.2g)。

例 49: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 48 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (200mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (7ml)。在此溶液中, 顺次加入在例 45 得到的 3'-N-(Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐 (41mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (5ml) 溶液、三乙基胺 (0.014ml)、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (100mg), 在室温边搅拌一夜边进行反应。将此反应液的每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中分别加入 3M 氯化钠水溶液 (2.0ml)、乙醚 (25ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀溶解于 0.5M 食盐水溶液, 冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 9。得到的水溶液用バイオマックス-50 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22 μm) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (190mg)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 4.5% (W/W)。

例 50: 羧甲基葡聚糖多元醇-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

在例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐 (2.5g) 溶解于水, 上 Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 目, Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>型) 柱, 用水洗脱。此洗脱液进行冷冻干燥, 得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (2.5g)。

将此羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (200mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (12ml)。在此溶液中, 顺次加入在例 46 得到的 3'-N-(Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐 (42mg) 和三乙基胺 (0.016ml) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (5ml) 溶液、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (200mg), 遮光, 在室温边搅拌一夜边进行反应。在此反应液中加入水 (300ml), 用超滤膜 10K (フィルトロン公司制造) 进行超滤。没有通过膜的残留溶液用 0.1N 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 10, 使其通过过滤膜 (0.16 μm, フィルトロン公司制造)。通过后的溶液用バイオマックス-50 膜经限外过滤法脱盐, 接着用米利波阿过滤器 (0.22 μm) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (180mg)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 6.1% (W/W)。

例 51: 羧甲基葡聚糖多元醇-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的合成

将在例 48 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐 (370mg) 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (10ml)。在此溶液中, 顺次加入在例 47 得到的 3'-N-Gly-NH-A (A-NH<sub>2</sub>=DX-8951) 的三氟醋酸盐 (57mg) 的 N, N-二甲基甲酰胺 (3ml) 溶液、三乙基胺 (0.027ml)、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二羟基喹啉 (185mg), 在室温边搅拌一夜边进行反应。将此反应液的每 5ml 滴入到各 10ml 的乙醇中。在此液中分别加入 3M 氯化钠水溶液 (2.0ml)、乙醚 (25ml), 析出的沉淀经离心分离 (3500rpm, 8 分钟) 收集。此沉淀溶解于 0.5M 食盐水溶液, 冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 9。得到的水溶液用バイオマックス-50 膜经限外过滤法脱盐。没有通过膜的残留溶液用米利波阿过滤器 (0.22 μm) 过滤后, 冷冻干燥, 得到标题化合物 (290mg)。本化合物的医药化合物残基的含量根据在 0.1M トリス缓冲液 (pH9.0) 中的 362nm 处的吸收度进行定量时是 0.5% (W/W)。

例 52: 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

按与例 11 同样的方法作成感染 Meth A 癌小鼠 (1 组 6 只), 对于例 15 的药物复合物用与例 12 同样的方法考察其单次给药时的抗肿瘤作用。其结果, 例 15 的药物复合物与例 12 的医药化合物自身相比, 显示出显著增强的抗肿瘤作用效果和有效用量范围的扩大。

受试品化合物	给药量 (mg/kg) <sup>1)</sup>	抑制率(%)
5 例15的化合物	10	100
	5	99
	2.5	95
	1.25	83

10

<sup>1)</sup> 医药化合物的换算量

## 例 53: 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

15 将人胃癌 SC-6 的肿瘤块移植到裸鼠 (BALB/c-nu/nu, 雄性) 的右鼠膝 (径) 部皮下, 制成感染 SC-6 癌裸鼠 (1 组 5 只)。在移植后第 24 天将溶解于注射用蒸馏水的例 15 的药物复合物经静脉内单次给药, 与医药化合物自身比较抗肿瘤作用。其结果, 例 15 的药物复合物与医药化合物自身相比, 没有出现中毒死亡, 发挥出了高效的抗肿瘤效果。

20

受试品化合物	给药量 (mg/kg)	抑制率(%)	死亡小鼠数/使用小鼠数
医药化合物自身	60	98	2/5
	15	61	0/5
25 例15的化合物	8 <sup>1)</sup>	100	0/5
	2 <sup>1)</sup>	71	0/5

<sup>1)</sup> 医药化合物的换算量

## 30 例 54: 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

按与例 53 同样的方法制成感染人肺癌 QG-90 癌裸鼠 (1 组 5 只)。在移植后第 16 天将溶解于注射用蒸馏水的例 15 的药物复合物经静脉

内单次给药，与医药化合物自身比较抗肿瘤作用。其结果，例 15 的药物复合物与医药化合物自身相比，显示出显著增强的抗肿瘤作用效果和有效用量范围的扩大。

5	被测化合物	给药量 (mg/kg)	抑制率(%)	死亡小鼠数/使用小鼠数
	医药化合物自身	50	60	0/5
		12.5	51	0/5
10	例15的化合物	7 <sup>1)</sup>	98	0/5
		1.75 <sup>1)</sup>	97	0/5

<sup>1)</sup> 医药化合物的换算量

例 55: 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

15 按与例 11 同样的方法制成感染 Meth A 癌小鼠 (1 组 6 只)。用和例 12 同样的方法，将例 41 的药物复合物单次给药时的抗肿瘤作用与医药化合物自身进行比较。其结果，例 41 的药物复合物与医药化合物自身相比，显示出显著增强的抗肿瘤作用效果和有效用量范围的扩大。

20	被测化合物	给药量 (mg/kg)	抑制率(%)
	医药化合物自身	100	64
		50	56
25		25	34
	例41的化合物	25 <sup>1)</sup>	99
		12.5 <sup>1)</sup>	95
		6.25 <sup>1)</sup>	81
30		3.125 <sup>1)</sup>	61

<sup>1)</sup> 医药化合物的换算量

例 56: 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

按与例 11 同样的方法制成感染 Meth A 癌小鼠 (1 组 6 只)。用和例 12 同样的方法, 考察例 29、例 43 以及例 44 的各药物复合物分别单次给药时的抗肿瘤作用。

- 5 其结果, 任一的药物复合物均显示出高效的抗肿瘤作用效果和宽广的有效用量范围。

	被测化合物	给药量 (mg/kg) <sup>1)</sup>	抑制率(%)
10	例29的化合物	30	99
		20	99
		10	89
		5	79
15	例43的化合物	100	94
		80	92
		40	82
		20	75
20	例44的化合物	100	96
		80	94
		40	97
		20	75

25

<sup>1)</sup> 医药化合物的换算量

例 57: 本发明的药物复合物的体内动力学

- 30 按与例 11 同样的方法制成感染 Meth A 癌小鼠, 对于例 15 的药物复合物, 用和例 12 同样的方法单次给药 (10mg/Kg: 医药化合物换算量), 考察药物复合物在各组织内的浓度分布。其结果, 例 15 的药物

复合物显示出高的血中滞留性、对肿瘤组织的高度靶向性以及对于肝脏和小肠的高度选择性。结果见图 20。

#### 工业应用可能性

- 5 具有羧基的多糖衍生物同医药化合物或结合了间隔基的医药化合物之间的反应能够以高收率地进行，而且在同具有内酯环的医药化合物等进行反应的时候，因为能够抑制副反应，所以作为药物复合物的制造方法是极其有用的。

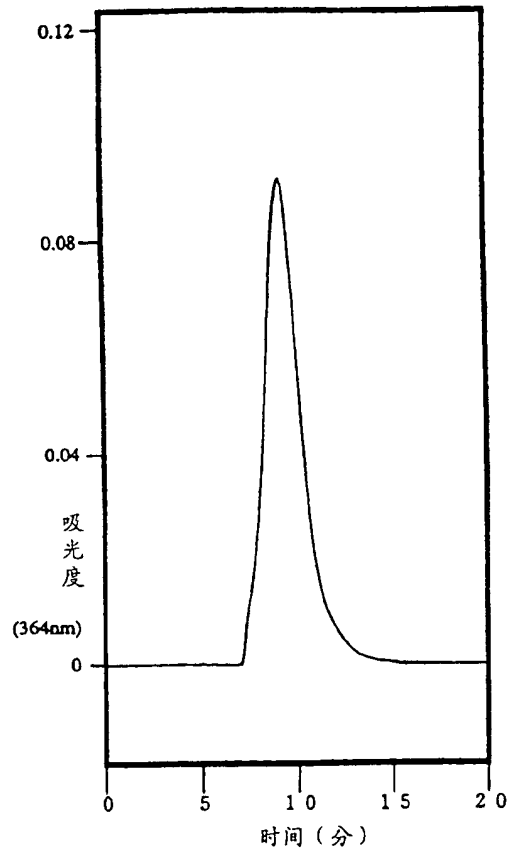


图 1

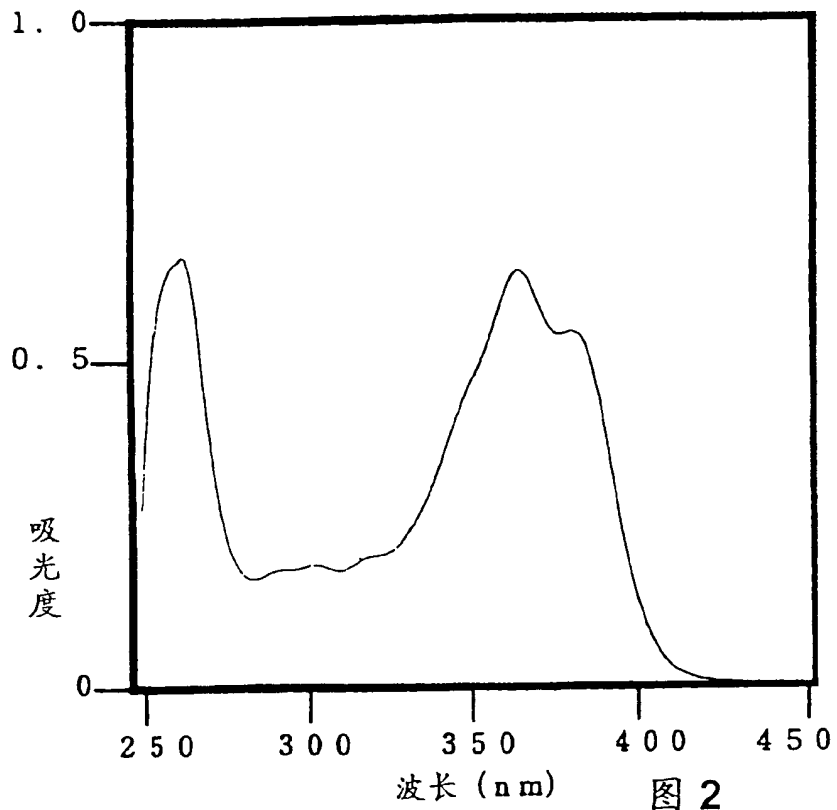


图 2

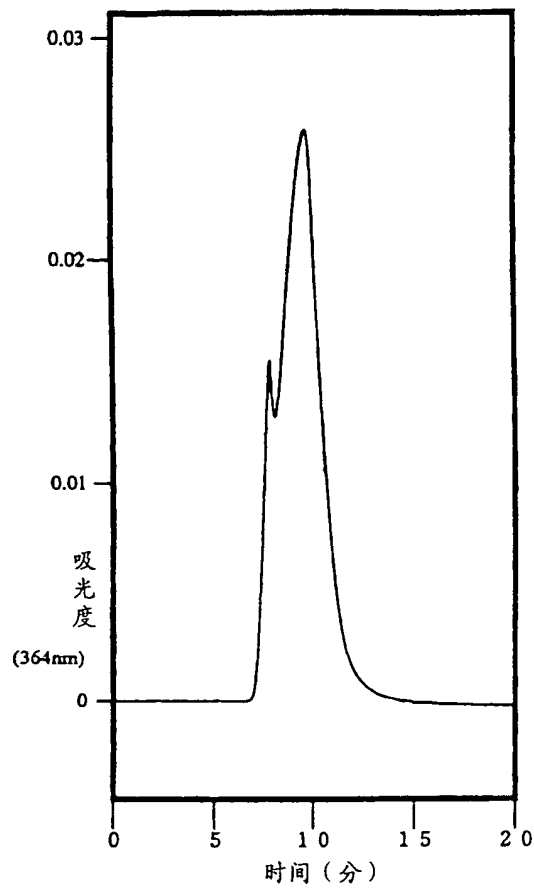


图 3

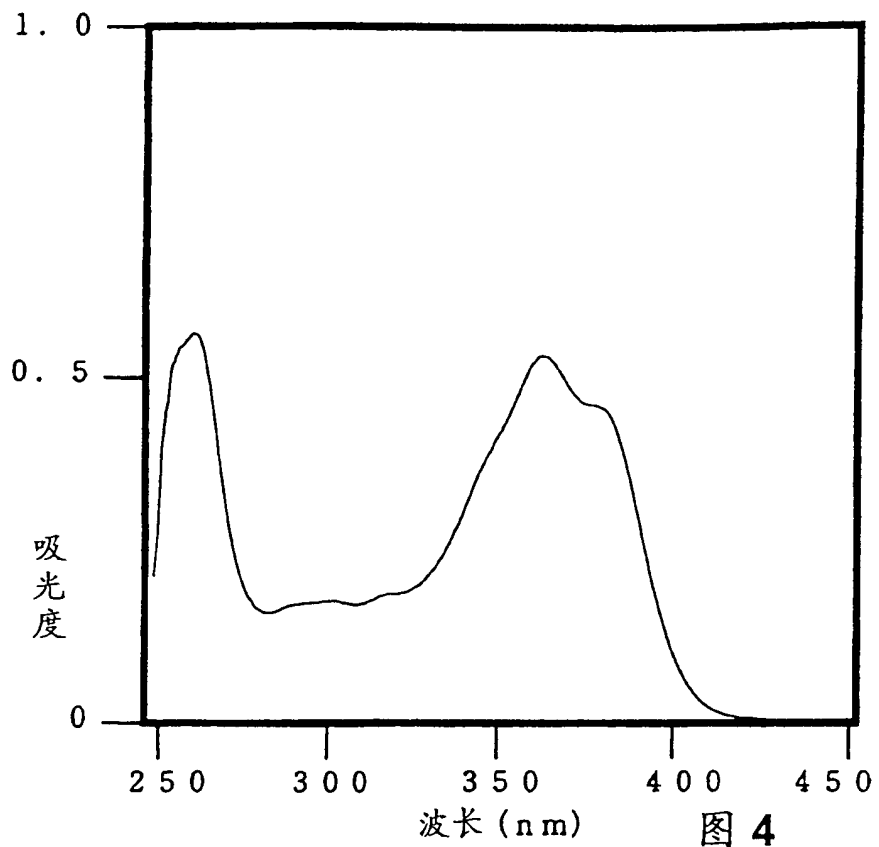


图 4

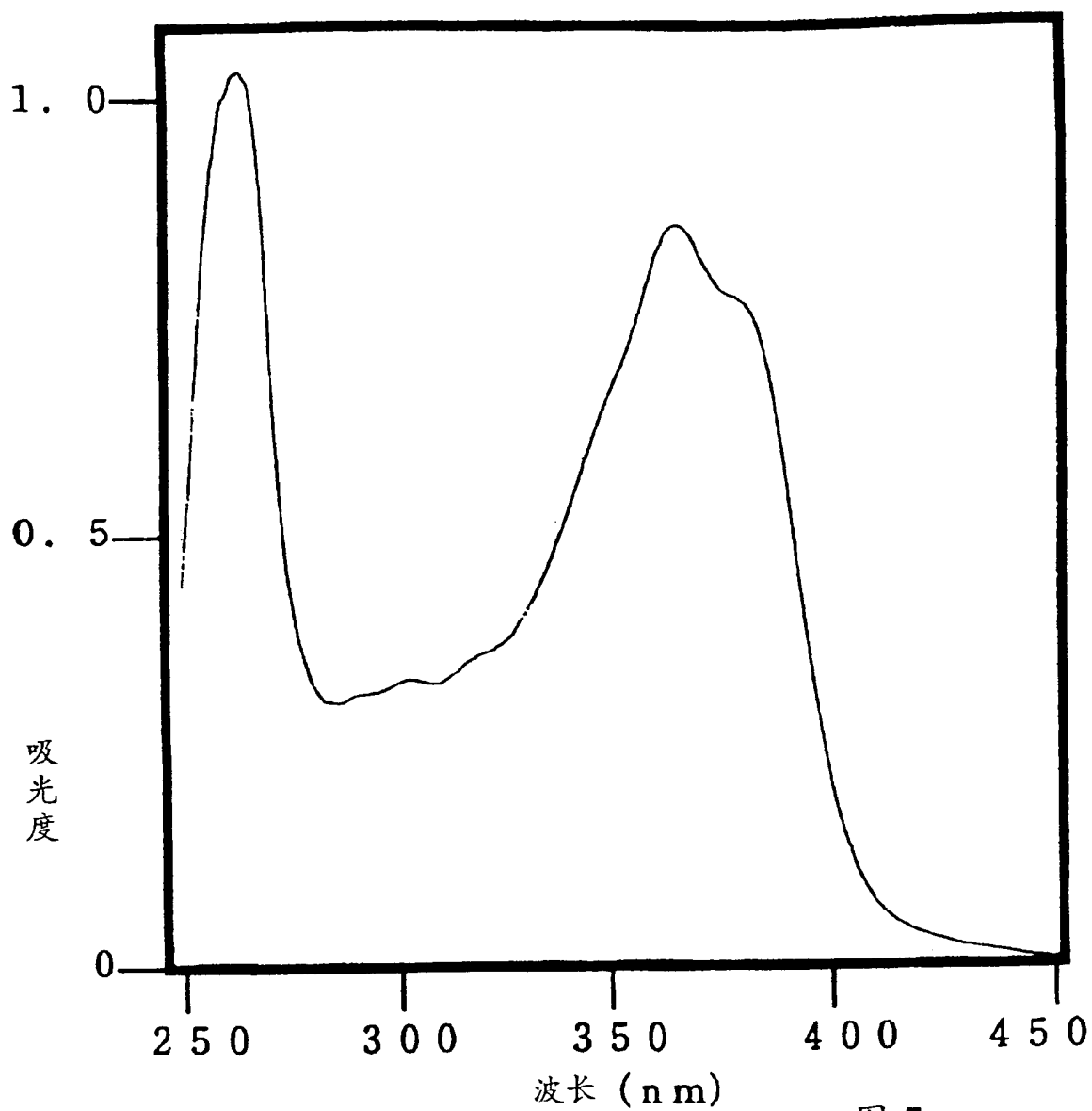


图 5

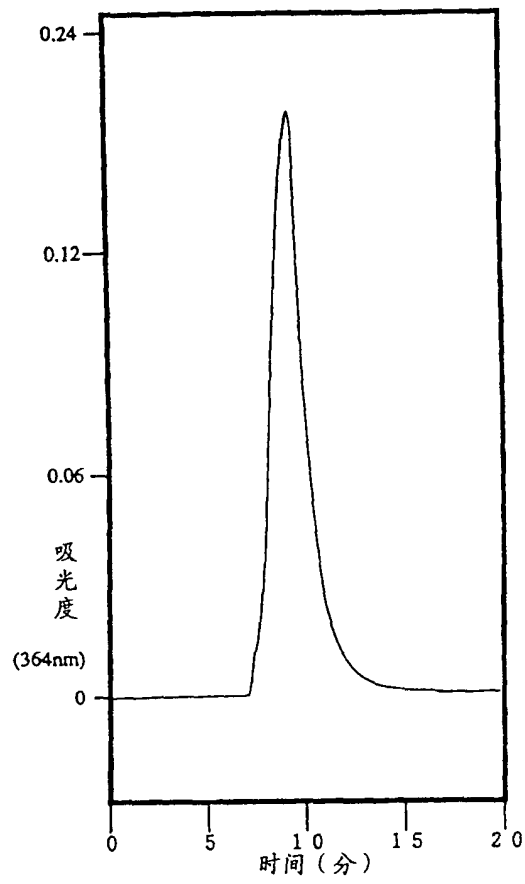


图 6

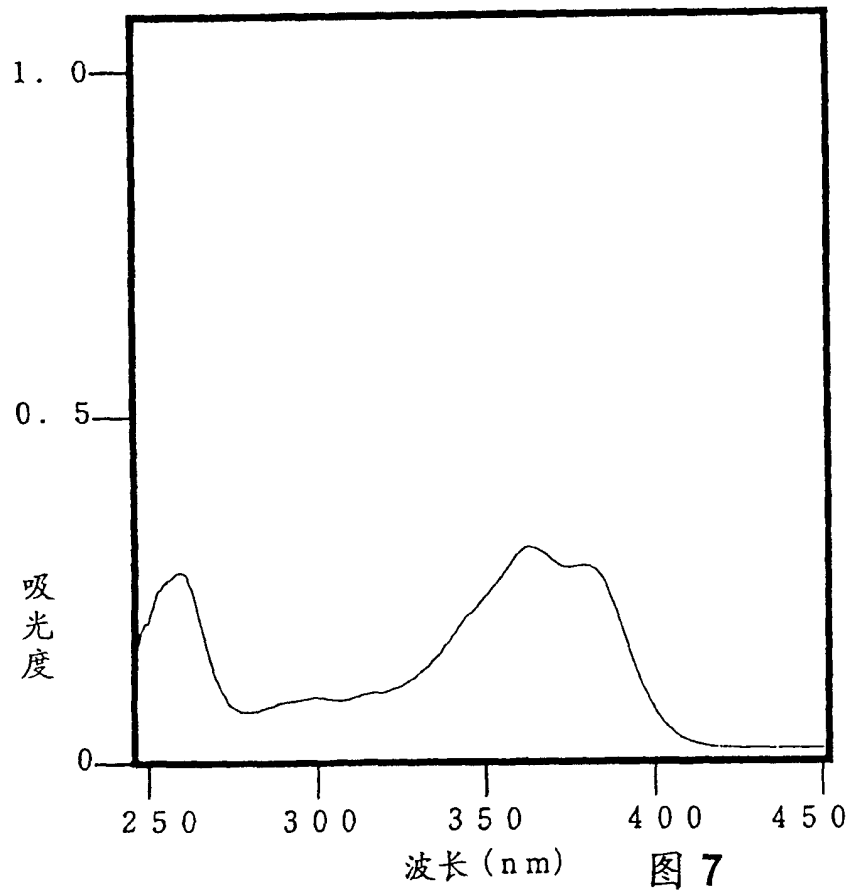


图 7

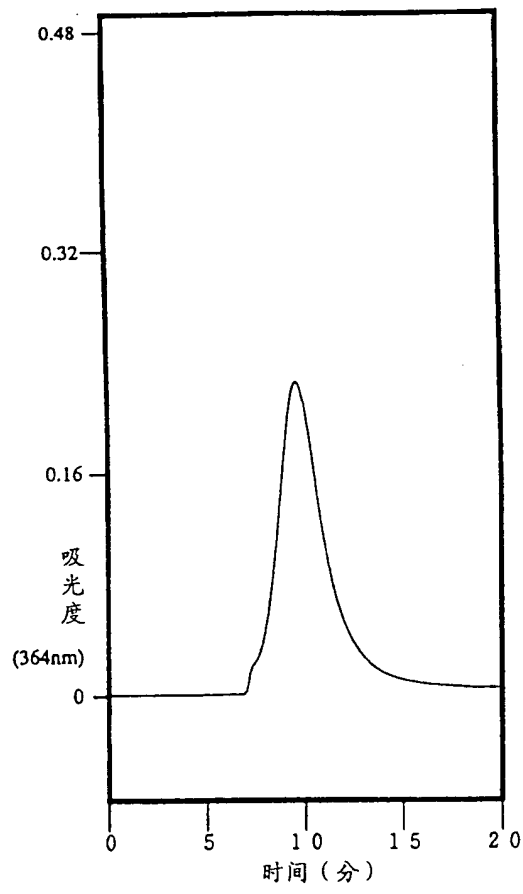


图 8

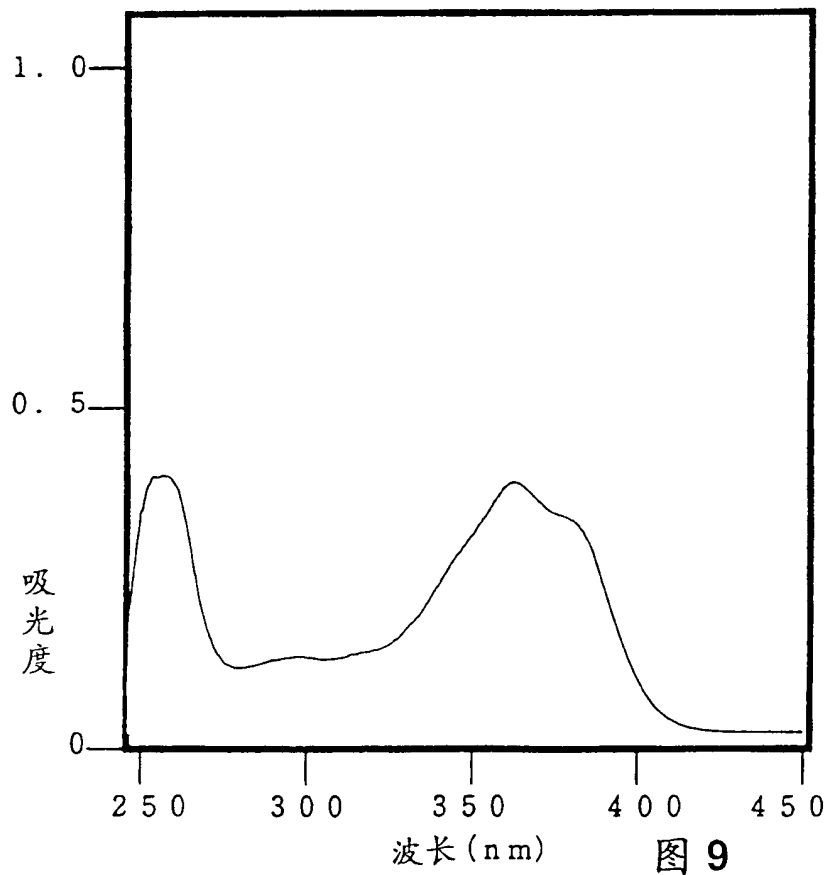


图 9

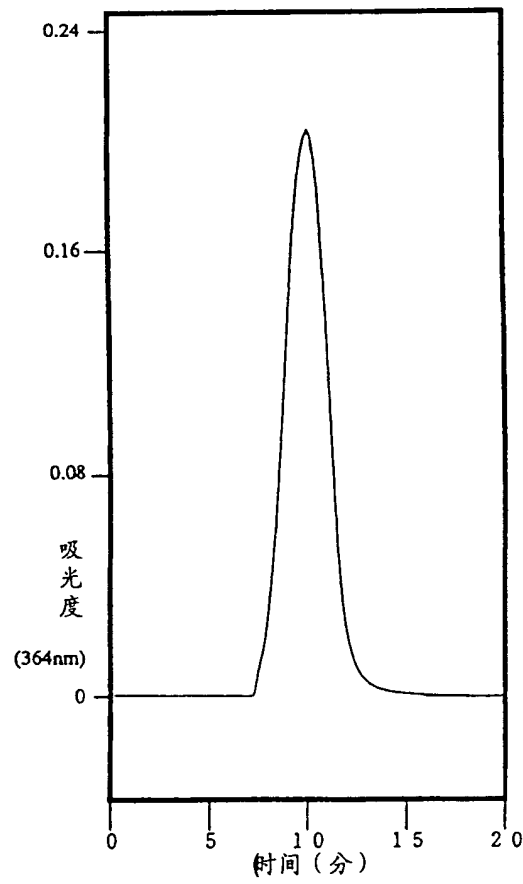


图 10

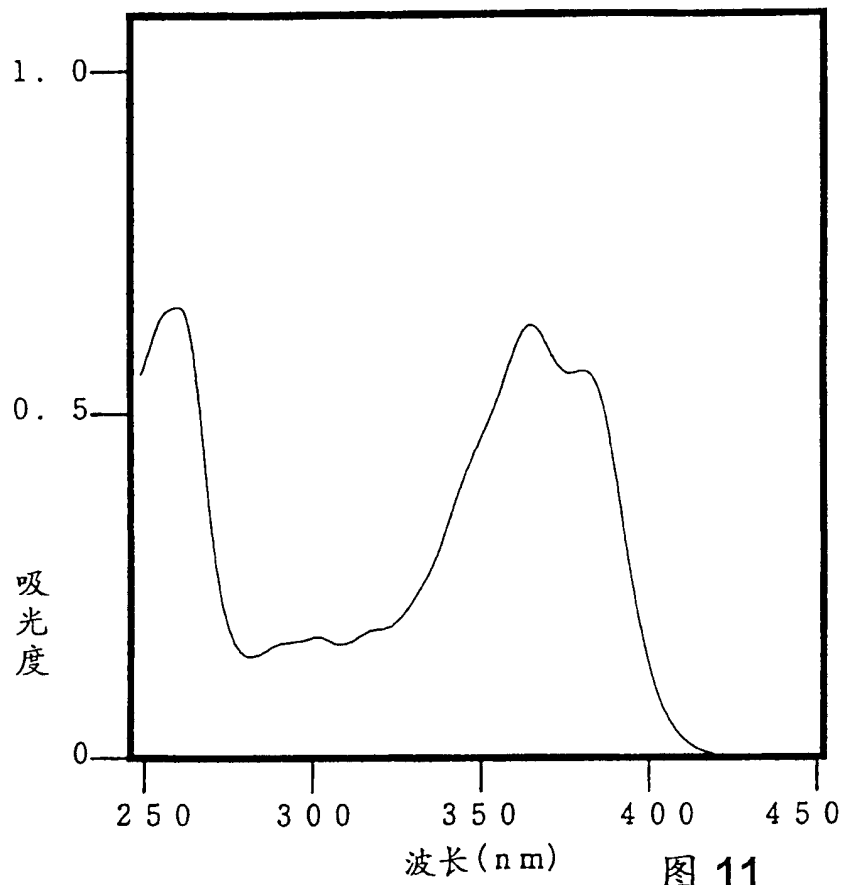


图 11

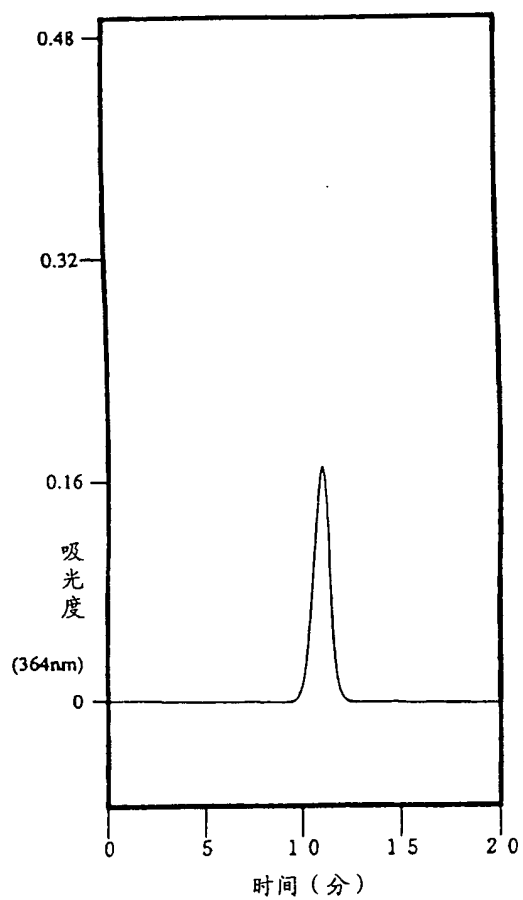


图 12

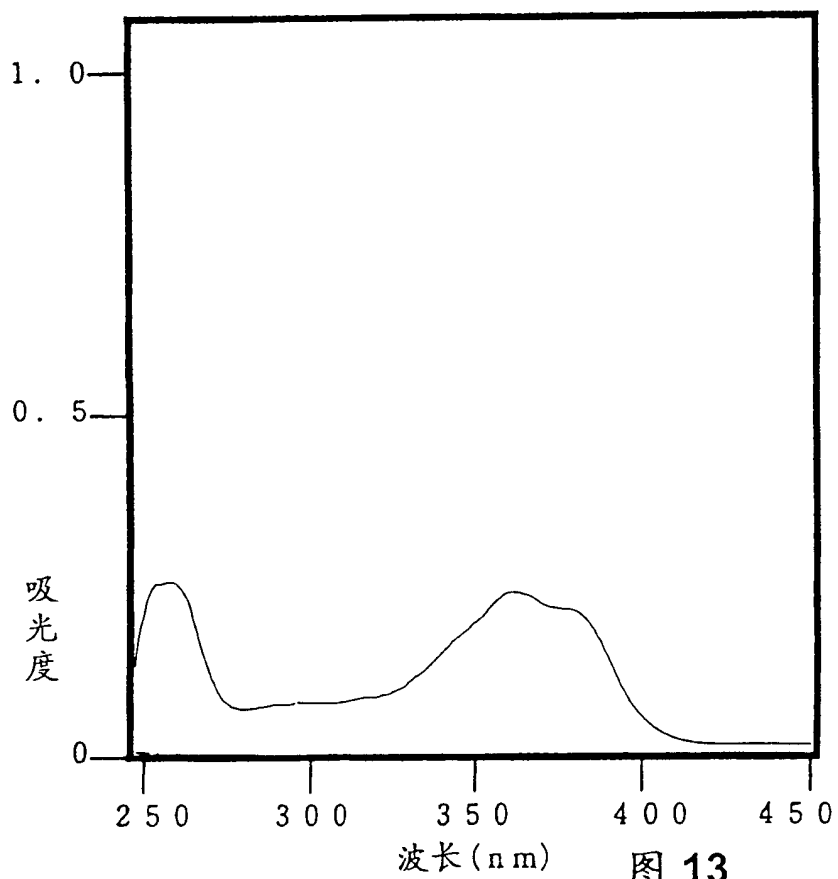


图 13

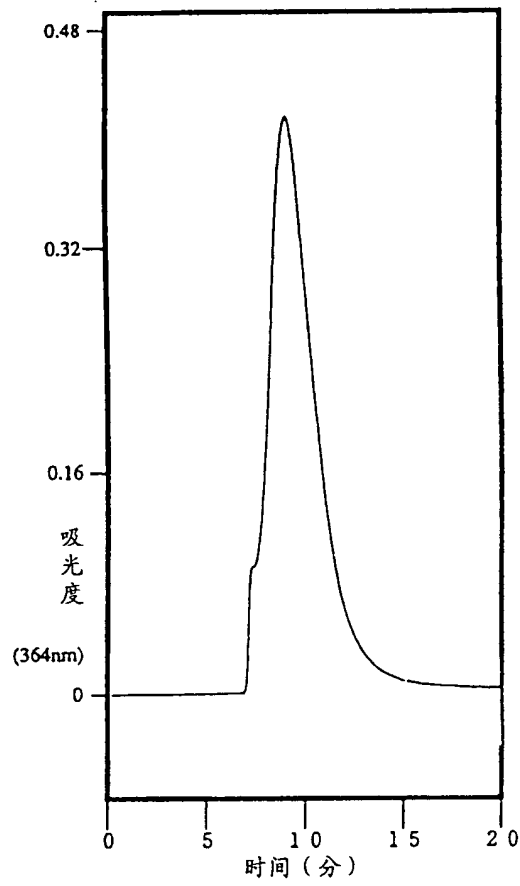


图 14

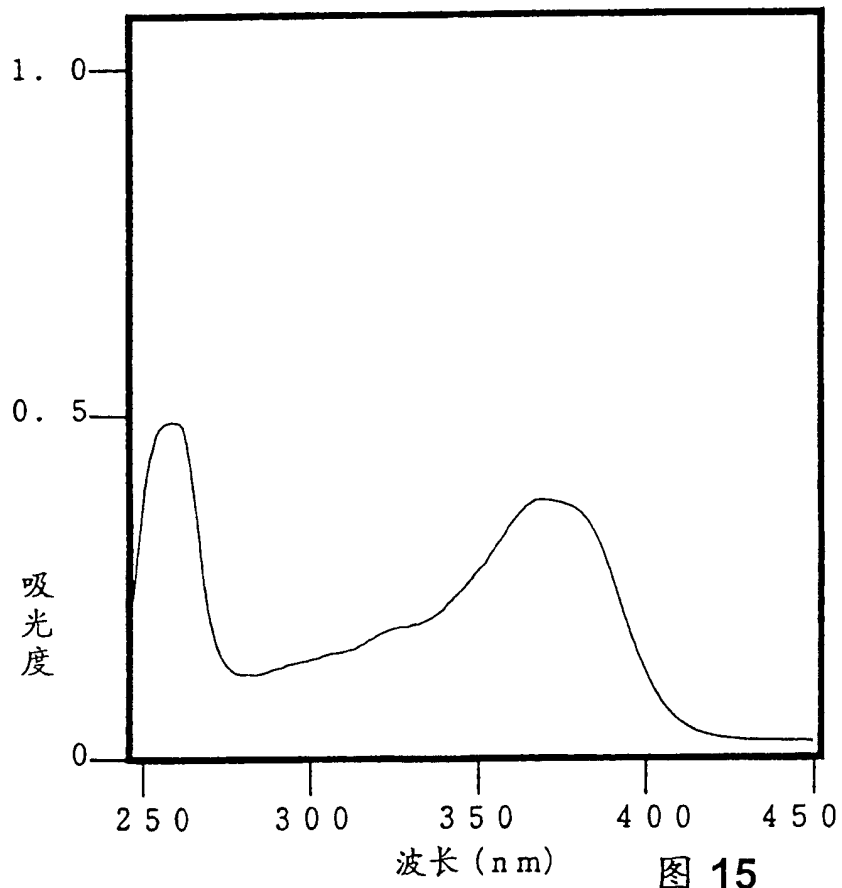


图 15

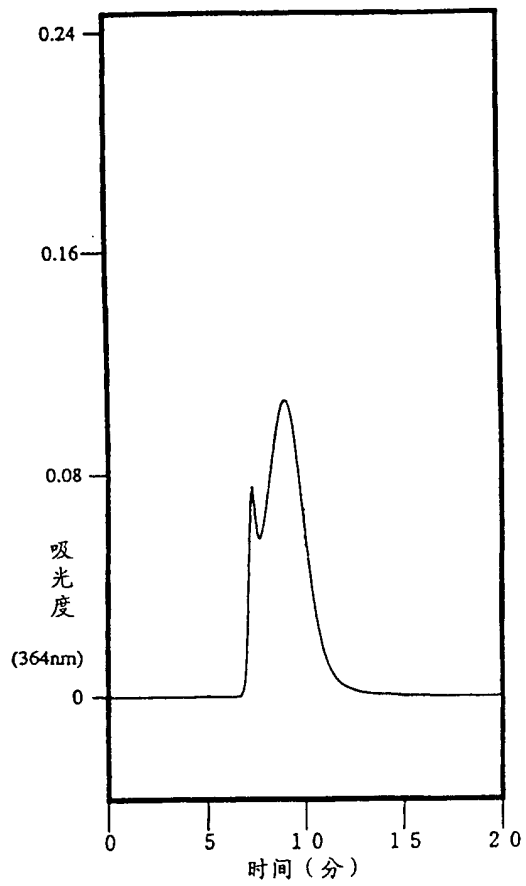


图 16

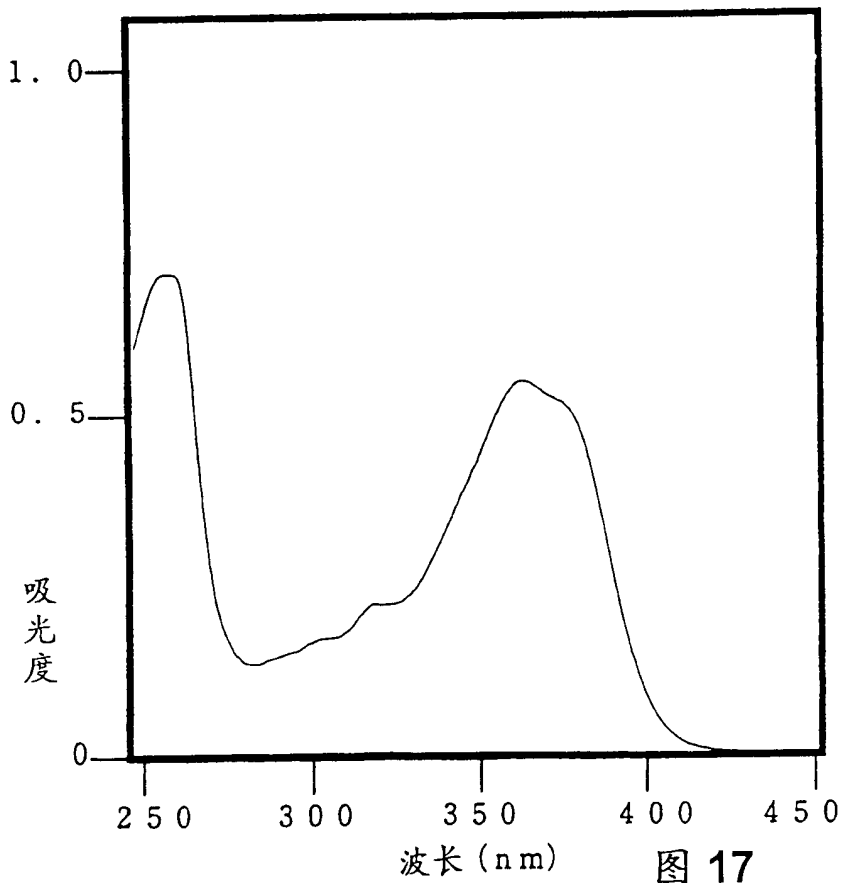


图 17

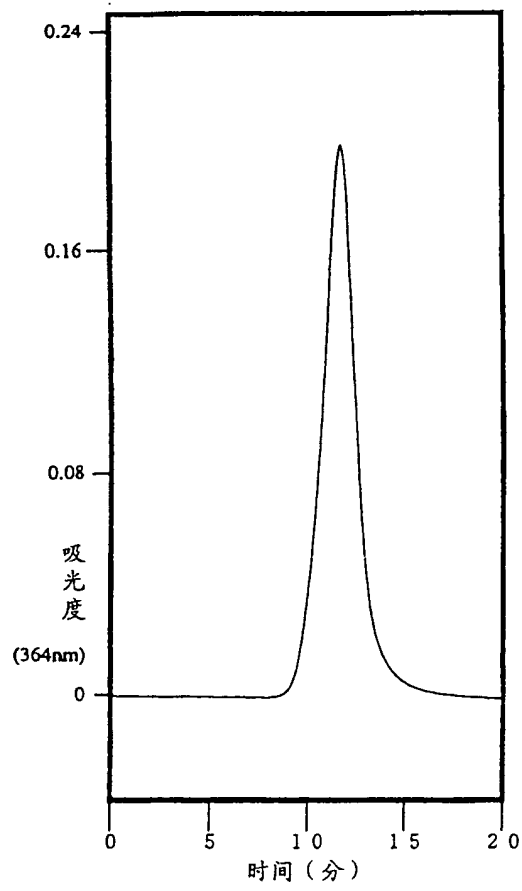


图 18

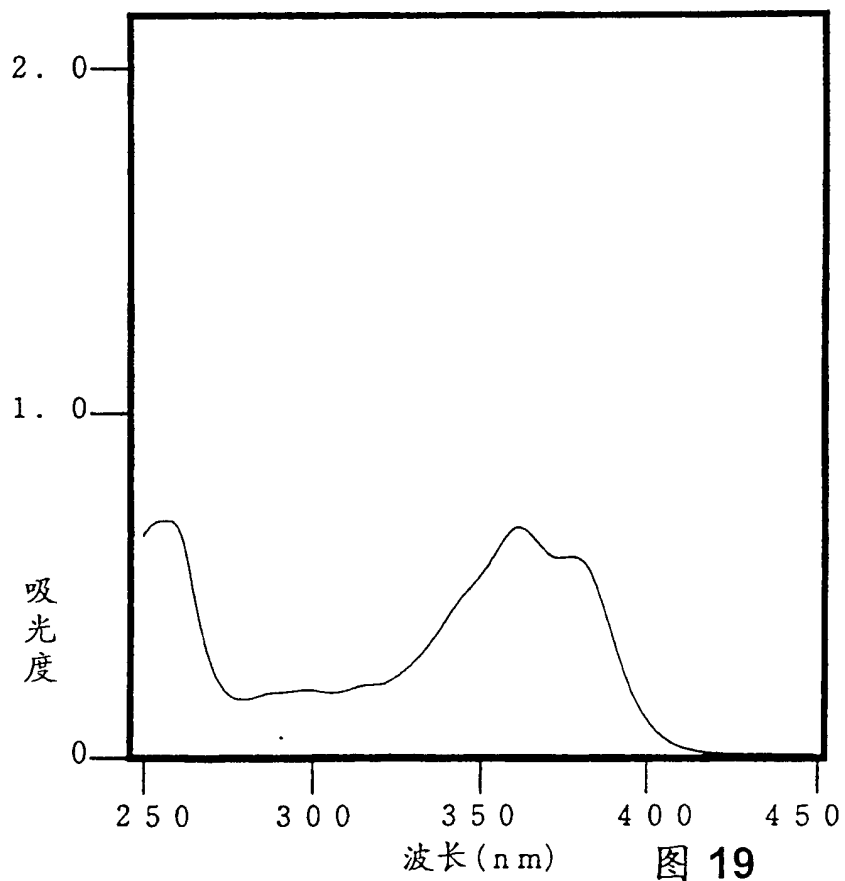


图 19

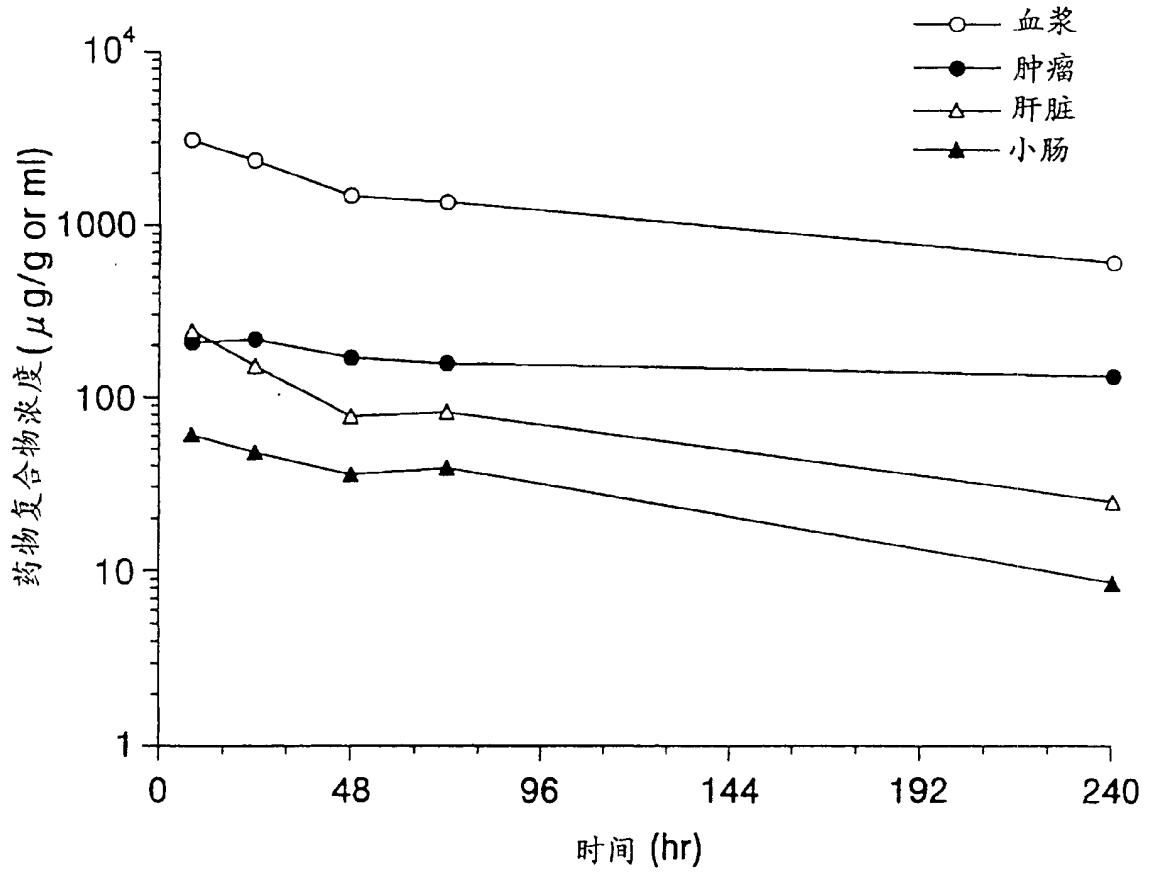


图 20