



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

83038

C (1) Patent för förfarande för
Förfarande för fördelning av 7-(dimetylaminometylen)amino-9a-metoximitosan i ampuller
(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

A 61K 31/395

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	860735
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	19.02.86
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	19.02.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	26.08.86
(44) Nähtävöksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.02.91
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	25.02.85 US 705243 P

(71) Hakija - Sökande

1. Bristol-Myers Squibb Company, 345 Park Avenue, New York, N.Y., USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Kaplan, Murray Arthur, 1026 Glencove Road, Syracuse, N.Y., USA, (US)
2. Vyas, Dolatrai M., 100 Euclid Drive, Fayetteville, N.Y., USA, (US)
3. Palepu, Nageswara R., 8084 Princess Path, Liverpool, N.Y., USA, (US)
4. Chen, Chih-Ming J., 212 Stonegate Lane, Stanhope, N.J., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaanin saostamiseksi ampulleihin
Förfarande för fördelning av 7-(dimetylaminometylen)amino-9a-metoximitosan i ampuller

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaanin saostamiseksi steriiliin yksittäiseen annosmuotoon. Tällöin tämän yhdisteen liuos lisätään steriiliin lääkepulloon tert-butanoliliuoksessa. Tämän jälkeen tert-butanoli poistetaan haihduttamalla tai lyofilisaatiolla ja pullo suljetaan tarkoituksenmukaisesti. Näin saostettu aine sisältää 0,5 ekvivalenttimooliin asti tert-butanolia hemisolvaattina ja se on hyvin stabiili lämmön suhteen.

Uppfinningen avser ett förfarande för utfällning av 7-(dimetylaminometylen)amino-9a-metoximitosan i steril enhetsdosform. En lösning av denna förening införs i en steril ampull i en lösning av tertiär butanol. Den tertiära butanolen avlägsnas sedan, t.ex. genom avdunstning eller lyofilisering och ampullen försluts på lämpligt sätt. Det på detta sätt utfällda materialet kan innehålla upp till 0,5 molekvalenter av tertiär butanol som ett hemi-solvat och det är mycket stabilt gentemot värme.

Menetelmä 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaanin saostamiseksi ampulleihin

5 Tämä keksintö käsittelee uutta menetelmää 7-(dime-
tyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaanin saostami-
seksi pieneen lääkepulloon steriiliin yksikköannosmuotoon,
jolloin lopputuote voi sisältää 0,5 mooliekvivalenttiin
asti tertiaarista butanolia.

10 Mitomysiini C on antibiootti, jota valmistetaan
fermentoimalla ja joka tällä hetkellä on myynnissä USA:ssa
"Food and Drug Administration'in" luvalla mahalaukussa tai
haimassa esiintyvän levinneen rauhassyövän hoitoon käytet-
tävänä lääkkeenä yhdistelmänä muiden hyväksytyjen kemo-
15 terapeuttisten aineiden kanssa ja lievittävänä hoitona,
kun muilla menetelmillä ei ole onnistuttu (Mytamicin^R
Bristol Laboratories, Syracuse, New York 13201, Physicians'
Desk Reference 38th Edition, 1984, s. 750). Mitomysiini C
ja sen valmistaminen fermentoimalla on aiheena 2. touko-
kuuta 1972 hyväksytyssä US-patentissa nro 3 660 578,
20 jonka yhtenä etuoikeushakemuksena Japanissa 6. huhtikuu-
ta 1957 jätetty hakemus.

Mitomysiinien A, B, C ja porfiromysiinin rakenteet
julkaistiin ensi kertaa artikkelissa J.S. Webb et al. of
Lederle Laboratories Division American Cyanamid Company,
25 J. Amer. Chem. Soc. 84, 3185-3187 (1962). Yksi tässä ra-
kennetutkimuksessa käytetyistä mitomysiini A:han ja mito-
mysiini C:hen liittyvistä kemiallisista transformaatioista
oli reaktio, jossa edellinen, 7,9a-dimetoksimitosaani,
reagoi ammoniakkin kanssa muuttuen jälkimmäiseksi, 7-amino-
30 9a-metoksimitosaaniksi. Mitomysiini A:n 7-metoksiryhmän
korvaaminen on todettu huomattavan kiinnostavaksi reakti-
oksi valmistettaessa mitomysiini C:n johdannaisia, jotka
ovat kasvainlääkkeenä aktiivisia. Kaikki seuraavat artik-
kelit ja patenttijulkaisut käsittelevät mitomysiini A:n
35 muuttamista 7-substituoiduksi aminomitomysiini C-johdan-

naiseksi, jolla on kasvainlääkkeen aktiivisuutta.

Matsui et al., The Journal of Antibiotics XXI, 189-198 (1968)

Kinoshita et al., J. Med. Chem. 14, 103-109 (1971)

5 Iyengar et al J., Med. Chem. 24, 975-981 (1981)

Iyengar, Sami, Remers, and Bradner, Abstracts of Papers-Annual Meeting of the American Chemical Society, Las Vegas, Nevada, March 1982, Abstract No. MEDI 72

Sasaki et al., Internat. J. Pharm., 1983, 15, 49.

10 Seuraavat patenttijulkaisut käsittelevät 7-substituoitujen aminomitosaanijohdannaisien valmistusta reaktiolla, jossa mitomysiini A, mitomysiini B tai niiden N^{1a}-substituoitu johdannainen reagoi primaarisen tai sekundaarisen amiinin kanssa:

15 Cosulich et al., US-patentti 3 332 944, patentoitu 25. heinäkuuta 1967

Matsui et al, US-patentti 3 420 846, patentoitu 7. tammikuuta 1969

20 Matsui et al, US-patentti 3 450 705, patentoitu 17. kesäkuuta 1969

Matsui et al, US-patentti 3 514 452, patentoitu 26. toukokuuta 1970

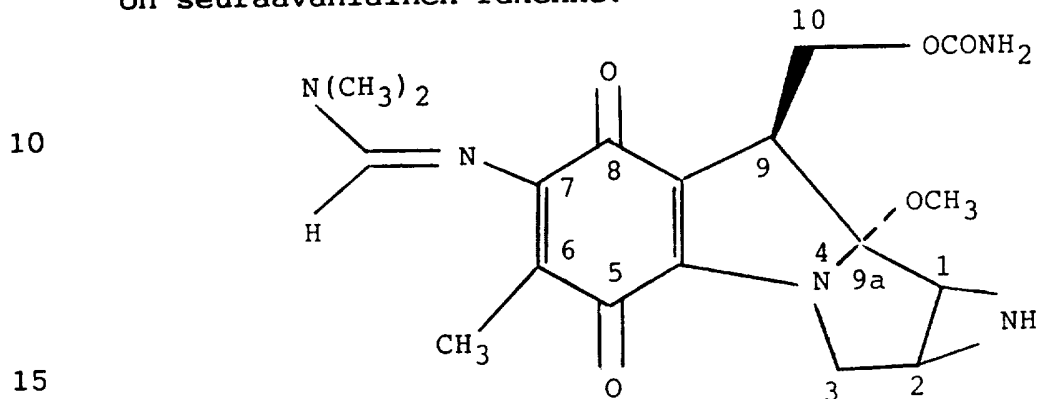
Nakano et al, US-patentti 4 231 936, patentoitu 4. marraskuuta 1980

25 Remers, US-patentti 4 268 676, patentoitu 19. toukokuuta 1981.

Mitomysiini C johdannaisia, joilla on 7-asemassa oleva substituoitu aminosubstituentti, on valmistettu myös suoralla biosynteesillä, so. lisäämällä käymisliuoksiin primaaristen amiinien sarjoja, jonka jälkeen on suoritettu tavanomainen mitomysiinifermentointi (C.A. Claridge et al. Abst. of the Annual Meeting of Amer. Soc. for Microbiology 1982. Abs. 028).

35 BE-patenttijulkaisu 896 963, käsittelee monoguaniidinon uuden ryhmän tai mitomysiini C:n mono- ja bis-ami-

diinoanalogit, joissa toinen tai molemmat mitomysiini C:n
 7-aminotyyppiä ja N¹⁰-karbamyylytyppiä ovat osa ami-
 diinosubstituentista tai 7-aminotyyppi on osa guanidiino-
 ryhmästä. Eräs tällainen yhdiste, joka on valmistettu em.
 5 patentin esimerkeissä 8 ja 15 kuvatulla tavalla, on 7-
 (dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaani, jolla
 on seuraavanlainen rakenne:



Tämä aine, jota saadaan amorfisena aineena, on
 erittäin tehokas P-388 hiiren leukemiaa vastaan. Sekä sen
 20 maksimitehokkuus että sen milligrammavoimakkuus (verrat-
 taessa vastaavien annostusmäärien aiheuttamia vaikutuk-
 sia) ovat suurempia kuin mitomysiini C:n. Se on kuitenkin
 yleensä epästabiili 25-26 °C:n lämpötilassa. Sopivia mene-
 telmiä, joilla tätä yhdistettä voitaisiin valmistaa ste-
 riiliin pulloon yksikköannosmuotoon, joka olisi rekonsti-
 tuoitavissa ruoansulatuskanavan ulkopuolisen aineen kans-
 25 sa, ei ole tähän mennessä ollut käytössä. Koska yksikkö-
 annosmuodossa käytetään erittäin pieniä 7-(dimetyyliami-
 nometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaanimääriä ja koska em.
 30 yhdiste on äärettömän myrkyllinen, ei ole suotavaa val-
 mistaa ainetta suurena määränä, so. kuivaksi jauheeksi.
 Lisäksi, koska yhdiste on vedessä epästabiili, ei voida
 käyttää vesiliuoksia lisättäessä yhdistettä steriiliin
 pulloon yksikköannosmuotoon.

35 On todettu, että 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-

9a-metoksimitosaania voidaan saostaa pieneen lääkepulloon steriiliin yksikköannosmuotoon lisäämällä tämän yhdisteen tertiaarisessa butanolissa olevaa liuosta steriiliin pulloon. Tertiaarinen butanoli poistetaan sen jälkeen esimerkiksi haihduttamalla tai lyofilisoimalla ja pullo suljetaan asian mukaisella tavalla esimerkiksi käyttämällä korkkia. Tällä tavalla saostettu aine saattaa sisältää 0,5 mooliekvivalenttiin asti tertiaarista butanolia hemisolvattina ja se on hyvin stabiili lämmön suhteen. Se voidaan rekonstituoida sekoittamalla sopivan ruoansulatuskanavan ulkopuolisen aineen kanssa.

Tämän tutkimuksen kokeissa käytettävä 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaani voi olla amorfinen tai kiteinen.

Amorfista 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaania on valmistettu BE-patenttijulkaisulla 896 963 esimerkeissä 8 ja 15 olevien menetelmien mukaisesti. Näitä menetelmiä on kuvattu alla.

BE-patenttijulkaisun 896 963 esimerkin 8 mukainen menetelmä

Yhdistettä I, 7-[(dimetyyliamino)metyyleeni]amino-N¹⁰-(dimetyyliamino)metyyleeni-9a-metoksimitosaania, valmistettiin seuraavalla tavalla:

Seokseen, jossa oli 500 mg (1,50 mM) mitomysiini C:tä liuotettuna 25 ml:aan kloroformia, lisättiin yhteensä 9,6 ml (2,4 ml:n annoksina 0, 18, 21 ja 23 tunnin kuluttua) N,N-dimetyyliformamididimetyyliasetaaalia ja seosta sekoitettiin noin 50 °C:n lämpötilassa 41 tunnin ajan. Kun liuotin ja ylimääräinen reagenssi oli haihdutettu alipaineella, saatiin tummanvihreä jäännös; tlc:llä (metyleenikloridi/metanoli 20:1) todettiin, että se ei sisältänyt mitomysiini C:tä ja että siinä oli kaksi uutta vihreää aineosaa ($R_f = 0,16$ ja $0,22$). Pääkomponentti ($R_f = 0,16$) erotettiin nopeasti kromatografilla; ajossa käytettiin metyleenikloridi/metanoliseosta (20:1) eluenttina, vih-

reäksi kiinteäksi aineeksi (340 mg 51,5 %), josta syntyi yhdistettä I tummanvihreänä amorfisena jauheena, kun siihen lisättiin dietyylietteriliuotuksen jälkeen heksaania.

5 NMR (pyridiini d_5 , δ): 2,18 (s, 3H), 2,70 (bs, 1H), 2,76 (s, 3H), 2,82 (s, 3H), 2,86 (s, 6H), 3,22 (s, 3H), 3,30 (bs, 1H), 3,60 (d, $J=12\text{Hz}$), 4,12 (dd, 1H, $J=10, 4\text{Hz}$), 4,43 (d, 1H, $J=12\text{Hz}$), 4,90 (bs, 1H), 5,10 (t, 1H, $J=10\text{Hz}$), 5,52 (dd, 1H, $J=10, 4\text{Hz}$), 7,85 (s, 1H), 8,64 (s, 1H).

10 IR(KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 3300, 2930, 1675, 1620, 1545, 1230, 1060.

UV(H_2O) λ_{max} , nm: 390 ja 244

Analyysi $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_5$:lle

Laskettu: C 56,71 H 6,08 N 18,90

15 Saatu: C 56,20 H 6,28 N 17,88.

7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaa-
nia (II) valmistettiin seuraavalla tavalla:

20 Yhdisteeseen I (600 mg, 1,35 mM), joka oli liuotettu metanoliin (10 ml), lisättiin aminodifenyyylimetaania (2,2 ml, 10,8 mM) ja saatua liuosta sekoitettiin 54 °C:n lämpötilassa neljä tuntia. Reaktiokulkua seurattiin tlc:llä (metyleenikloridi/metanoli 90:10). Neljän tunnin kuluttua lähtöaine ($R_f = 0,35$) oli hävinnyt ja sen tilalle oli ilmaantunut uusi runsas vihreä aineosa ($R_f = 0,29$).

25 Liuosta konsentroidiin alipaineella ja saatu siirappimainen aine tutkittiin nopeasti kromatografilla (25 g silikageeliä), ajossa käytettiin eluenttina metyleenikloridi/metanoliseosta 20:1. Fraktiot, joissa oli vihreää aineosaa ($R_f = 0,29$), yhdistettiin, kuivattiin (Na_2SO_4) ja konsentroidiin. Yhdistettä II saatiin amorfisena aineena

30 (215 mg, 41 %).

35 NMR (pyridiini d_5 , δ): 2,18 (s, 3H), 2,70 (bs, 1H), 2,80 (s, 3H), 2,88 (s, 3H), 3,08 (bs, 1H), 3,24 (s, 3H), 3,56 (bd, 1H, $J=12\text{Hz}$), 4,00 (dd, 1H), 4,44 (d, 1H, $J=12\text{Hz}$), 5,06 (t, 1H, $J=10\text{Hz}$), 5,56 (dd, 1H,

$J=10, 4\text{Hz}$), 7,58 (bs, 2H), 7,88 (s, 1H).

IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 3300-3450, 2960-2910,
1715, 1620, 1535, 1050

UV (H_2O) λ_{max} , nm: 390 ja 226

5

BE-patenttijulkaisun 896 963 esimerkin 15 mukainen menetelmä

0,5 M N,N-dimetyylikloorimetyleenikloridiliuos valmistettiin lisäämällä oksalyylikloridia (1,57 g, 12,5 mmol) tipoittain 0 °C:n lämpötilassa liuokseen, jossa oli dimetyyliformamidia (915 mg, 12,5 mmol) 25 ml:ssa CHCl_3 , jonka jälkeen liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. 5 ml:aan dimetyyliformamidia liuotettua mitomysiini C-liuosta (334 mg, 1 mmol) lisättiin erikseen seokseen, jossa oli NaH (36 mg, 1,5 mmol) 3 ml:ssa dimetyyliformamidia. Liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 20 minuuttia, jonka jälkeen se jäähdytettiin -40°N-50 °C:seen ja siihen lisättiin edellä mainittu N,N-dimetyylikloorimetyleenikloridiliuos (3 ml, 1,5 mmol). Kun liuosta oli sekoitettu -40 °C:ssa 10 minuuttia, lisättiin siihen vielä NaH (18 mg, 0,75 mmol). Liuosta pidettiin -40 °C:ssa tunti ja sen jälkeen sitä laimennettiin CH_2Cl_2 :lla ja suodatettiin. Jäännös, joka saatiin suodoksen haihduttamisen jälkeen, tutkittiin ohutlevykromatografilla (TLC) silikageeliä käyttämällä (10 % $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}$ eluenttina). Suuren vihreän aineosan uutteesta saatiin 78 g amorfista ainetta (43 % talteen otetusta mitomysiini C-määrästä laskettuna), jonka NMR-spektri ja TLC-käyttäytyminen olivat samanlaisia kuin edellä kuvatulla tavalla valmistetun yhdisteen II.

Amorfinen 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaani voidaan muuttaa kidemuotoon liuottamalla se asetoniin ja/tai etanoliin ja lisäämällä saatu liuos eetteriin. On suotavaa lisätä liuos jonkin ajan, esimerkiksi 20 minuutin kuluttua. Vaihtoehtoinen menetelmä kidemäisen

35

7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaaninvalmistukselle on sekoittaa tietty määrä amorfista 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania etyylieteriin ja lisätä sen jälkeen pieni määrä kidemäistä 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania. Näin saadaan amorfinen 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaani muutetuksi kidemäiseen muotoon.

Tertiaarisessa butanolissa tai tertiaarisessa butanolissa, joka sisältää 20 paino-%:iin asti etanolia, olevia 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaaniliuoksia on helppo valmistaa. Liuokset ovat stabiileja vähintään 48 tunnin ajan 24 °C:ssa. Liuokset voidaan suodattaa steriilisti ja saostaa steriileihin pulloihin. Liuotin poistetaan sublimoinnilla, jolloin saadaan sienimäinen, oliivinvihreä amorfinen sakka tai valvotulla 25-30 °C:n lämpötilassa suoritettulla haihdutuksella, jolloin saadaan tummanvihreä pääosin kidemäinen lasimainen jäännös. Molemmat kiinteät muodot ovat kyllin stabiileja tuotteen annosmuodoiksi. Tutkimuksen kokeiden mukaan tertiaarisen butanolin käytöllä on useita etuja. Tertiaarisella butanolilla saadaan erittäin stabiili liuos, jota voidaan käsitellä, kun sen sijaan 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaanin vesiliuokset ovat epästabiileja. Lisäksi tertiaarinen butanoli on helposti sublimoitavissa ja se voidaan nopeasti poistaa. Tämän lisäksi pulloihin saostetut tertiaariset butanolisakat ovat paljon stabiilimpia 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaanimuotoja kuin 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaanin aiemmin kuvattu amorfinen muoto.

Seuraavat esimerkit käsittelevät yksityiskohtaisesti menetelmiä, joilla voidaan saostaa 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania pulloon.

Esimerkki 1

1 g 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania sekoitetaan vapaana emäksenä tertiaariseen buta-

noliin, 200 ml:n määrää liuosta pidetään kaksi tuntia himmeässä diffuusiovalossa 26-32 °C:n lämpötilassa. Näin saadaan liuosta, joka sisältää 5 mg/ml 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania. Tämä liuos ajetaan
5 steriileissä olosuhteissa typpipaineessa steriilin 0,22 mikronisen Millipore-suodattimen läpi, joka on suunniteltu alkoholipitoisille liuottimille. Suodos kootaan steriiliin astiaan. Liuoksen lämpötilan ei saa antaa laskea alle 26 °C:n, sillä tertiaarinen butanoli saattaa kiteytyä
10 25 °C:n alapuolella. Kahdella ml:lla liuosta täytetään useita steriilejä lasisia lääkepulloja. Pullot suljetaan osittain halkaistuilla butyylikumisilla lyofilisaatiokorkeilla. Pullot asetetaan steriiliin lyofilisaattoriin, joka on suunniteltu tertiaarisen butanolin kondensoimiseen ja sisällöt jäädytetään -40 °C:seen. Tämän jälkeen tertiaarinen butanoli lyofilisoidaan tai sublimoidaan pois korkealla alipaineella 24-27 °C:n varastointilämpötilassa 24 tunnin ajaksi. Sen jälkeen varastointilämpötila nostetaan 40-50 °C:seen ja pidetään siinä 3-5 tuntia. Tämän jälkeen
15 varastointilämpötila lasketaan 24-27 °C:seen ja alipaine katkaistaan steriilillä typpellä. Pullot suljetaan steriileillä alumiinisulkimilla. Kuhunkin pulloon saadaan untuvainen, sienimäinen, tummanvihreä, pääosin amorfinen, mutta osittain kidemäinen pullosakka, joka sisältää 0,5 mooliekvivalenttiin asti tertiaarista butanolia. Pullot tulee
20 varastoida pimeässä 20-26 °C:n lämpötilassa.

Esimerkki 2

1 g 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania sekoitetaan vapaana emäksenä tertiaariseen butanoliin, 100 ml:n määrää liuosta pidetään neljän tunnin
30 ajan himmeässä diffuusiovalossa 26-32 °C:n lämpötilassa. Näin saadaan liuosta, joka sisältää 10 mg 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania yhtä ml kohden tertiaarista butanolia. Tämä liuos ajetaan steriileissä olosuhteissa typpipaineessa steriilin 0,22 mikronisen Milli-
35

pore-suodattimen läpi, joka on suunniteltu alkoholipitoi-
sille liuottimille. Suodos kootaan steriiliin astiaan.
Suodosta laitetaan 1 ml useisiin steriileihin lasisiin
5 lääkepulloihin. Pullot suljetaan osittain lyofilisaatio-
korkeilla ja sen jälkeen pullot laitetaan steriiliin va-
kuumiuniin, joka on suunniteltu tertiaarisen butanolin
poistamiseen tai kondensoimiseen. Varastointilämpötila
säädetään 26-30 °C:seen ja pullojen sisältöjen annetaan
10 lämmitä tähän lämpötilaan. Käytettäessä muuttuvaa alipai-
nelähdettä pulloihin vaikuttavaa alipainetta nostetaan
asteittain 2-3 tunnin aikavälillä noin 24-27 elohopeatuu-
maan. Tertiaarinen butanoli haihdutetaan nopeudella, joka
on noin 1 ml viidessä tunnissa. 7-(dimetyyliaminometylee-
ni)amino-9a-metoksimitosaani kiteytyy liuoksesta, kun sen
15 pitoisuus liuoksessa kasvaa johtuen tertiaarisen butanolin
hitaasta haihtumisesta. 25-27 elohopeatuuman alipaineen
käyttämistä jatketaan 25-30 °C:n varastointilämpötilassa
vielä 16-24 tunnin ajan. Sen jälkeen käytetään korkeampaa
alipainetta, so. 10-60 millitorria ja varastointilämpöti-
20 laa nostetaan 40-45 °C:seen ja pidetään siinä 4-6 tunnin
ajan. Tämän jälkeen lasketaan varastointilämpötila
24 °C:seen ja pullojen sisältöjen annetaan jäähtyä 24-
27 °C:seen. Sen jälkeen alipaine katkaistaan steriilillä
typellä ja pullot suljetaan steriileillä alumiinisulkimil-
25 la. Näin saadaan sakea tummanvihreä ja pääosin kidemäinen
pullosakka, joka sisältää noin 0,5 mooliekvivalenttiin
asti tertiaarista butanolia.

Näin saostetun 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-
9a-metoksimitosaanin stabiilisuus määritettiin seuraavalla
30 tavalla: tietty määrä pulloja, jotka sisältävät saostet-
tua 7-(dimetyyliaminometyleeni)amino-9a-metoksimitosaania,
laitetaan erilaisiin lämpötiloihin. Kussakin aika-lämpö-
tilajaksossa olleet saostettua 7-(dimetyyliaminometylee-
ni)amino-9a-metoksimitosaania sisältävät pullot, laitetaan
35 HPLC-määritykseen. Tulos annetaan 7-(dimetyyliaminomety-

leeni)-amino-9a-metoksimitosaanin aktiivisuutena µg/mg:na. Tulokset on esitetty taulukossa 1. Tässä taulukossa "amorfiseksi" merkitty aine on 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaania, jota on valmistettu BE-patentissa 896 963 kuvatun menetelmän mukaisesti. Tämä aine on pelkästään mitattu pulloihin pikemminkin kuin saostettu sinne tämän tutkimuksen kokeiden mukaisesti. Merkinnot "esimerkki 1" ja "esimerkki 2" viittaavat 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaaniin, joka on saostettu tämän hakemuksen esimerkeissä 1 ja 2 kuvatulla tavalla. Kohdat, joissa esiintyy useampi kuin yksi arvo, ovat useamman kokeen tuloksia 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaaniin, joka on saostettu tämän hakemuksen esimerkeissä 1 ja 2 kuvatulla tavalla. Kohdat, joissa esiintyy useampi kuin yksi arvo, ovat useamman kokeen tuloksia 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaanille, joka on saostettu tietyn esimerkin mukaisesti.

Taulukko 1

20 Kuvaus ko- keessa ol- leesta ai- neesta	7-dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksi- mitosaanin häviö (%)						
	1 vk	2 vk	4vk	8vk	4 kk @ 37°C	24 h @ 100°C	
25 Amorfinen	14	25	41	--	--	90	
Esimerkki 1	--	--	1,9; 1,2; 0; 1,5-7,0	0-4,6	0	74	
30 Esimerkki 2	--	--	1,8; 0; 1,2; 0	+3,8	+6	27; 7	

35

Muutettaessa tertiaarisen butanolin avulla pulloon saostettua 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaania uudelleen vapaaksi emäkseksi, on edullista käyttää ruoansulatuskanavan ulkopuolisen aineen vesiliuosta, jonka pH on 6,6 ja joka sisältää 0,01 moolia sitraattipuskuria, jossa on 1 mg/ml Pluronic F 68 tai 0,01

40

moolia L-valiniinia, jolloin pH:ksi tulee 6,5. Näiden rekonstituointiliuosten on todettu antavan sopivan mit-
taisia käyttöaikoja, so. vähintään kolme tuntia häviön
ollessa pienempi kuin 10 %. Toinen hyväksyttävä tapa, jol-
5 la saadaan sopivia rekonstituutioaikoja on käyttää liuok-
sia, jotka sisältävät 30 paino-%:iin asti ja edullisesti
10-30 paino-% nikotiiniamidia. Taulukosta 2 näkyy nikotii-
niamidin lisäyksen vaikutus vesipitoiseen rekonstituutio-
liuokseen.

Taulukko 2

7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaani, jossa on mukana (%)

Aika (h)	0 % nikotiiniamidi	10 % nikotiiniamidi	30 % nikotiiniamidi
0	100,0	100,0	100,0
1	88,7	94,1	96,5
2	83,6	91,5	92,8
3	81,2	90,5	94,2
4	79,0	89,0	93,3
5	77,0	88,4	92,5
6	74,8	86,9	91,6

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä 7-(dimetyyliaminometyyleeni)amino-9a-
metoksimitosaanin saostamiseksi pieneen lääkepulloon ste-
5 riiliin yksikköannosmuotoon, jolloin lopputuote voi sisäl-
tää 0,5 mooliekvivalenttiin asti tertiaarista butanolia,
t u n n e t t u siitä, että 7-(dimetyyliaminometyyleeni)-
amino-9a-metoksimitosaanin tert-butanoliliuos lisätään
steriiliin lääkepulloon, jonka jälkeen tertiaarinen buta-
10 noli poistetaan lyofilisoimalla tai haihduttamalla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tertiaarinen butanoliliuos
jähdytetään -40°C :seen ja tertiaarinen butanoli subli-
moidaan korkealla alipaineella.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
15 t u n n e t t u siitä, että tertiaarinen butanoli haih-
dutetaan alipaineessa $25-30^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että 5-10 mg 7-(dimetyy-
20 liaminometyyleeni)amino-9a-metoksimitosaania saostetaan
lääkepulloon.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostettu 7-(dimetyyliamino-
metyyleeni)amino-9a-metoksimitosaani rekonstituoidaan myö-
25 hemmin vesipitoisella ruoansulatuskanavan ulkopuolisella
aineella.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että ruoansulatuskanavan ulkopuo-
lisen aineen pH on 6,6 ja joka sisältää 0,1 moolia sit-
30 raattipuskuria.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että vesipitoinen ruoansulatus-
kanavan ulkopuolinen aine sisältää 0,1 moolia L-valiinia,
jolloin aineen pH on 6,5.

35 8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,

t u n n e t t u siitä, että vesipitoinen ruoansulatuskanavan ulkopuolinen aine sisältää 30 paino-%:iin asti nikotiiniamidia.

5 9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että vesipitoinen ruoansulatuskanavan ulkopuolinen aine sisältää 10-30 paino-% nikotiiniamidia.

Patentkrav

1. Förfarande för utfällning av 7-(dimetylaminometylen)amino-9a-metoximitosan i en liten läkemedelsflaska som en steril enhetsdosform, varvid slutprodukten kan innehålla upp till 0,5 molekvivalenter tertiär butanol, k ä n n e t e c k n a t därav, att en tert.-butanollösning av 7-(dimetylaminometylen)amino-9a-metoximitosan införs i en steril läkemedelsflaska, varefter den tertiära butanolen avlägsnas genom lyofilisering eller avdunstning.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att lösningen innehållande tertiär butanol nerkyls till -40°C och den tertiära butanolen sublimeras i högt undertryck.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den tertiära butanolen avdunstar i undertryck vid en temperatur av $25 - 30^{\circ}\text{C}$.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att 5 - 10 mg 7-(dimetylaminometylen)amino-9a-metoximitosan utfälls i läkemedelsflaskan.

5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det utfällda 7-(dimetylaminometylen)amino-9a-metoximitosanet senare rekonstitueras med ett vattenhaltigt parenteralt medel.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att det parenterala medlet har ett pH av 6,6 och innehåller 0,1 mol citratbuffert.

7. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att det vattenhaltiga parenterala medlet innehåller 0,1 mol L-valin, varvid medlet har ett pH av 6,5.

8. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att det vattenhaltiga parenterala medlet innehåller upp till 30 vikt-% nikotinamid.

9. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det vattenhaltiga parenterala
medlet innehåller 10 - 30 vikt-% nikotinamid.