



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/015, 9/107, 47/00, 47/14	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/16441 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juni 1995 (22.06.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH94/00234 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. December 1994 (07.12.94) (30) Prioritätsdaten: 3783/93-2 19. December 1993 (19.12.93) CH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MARIGEN S.A. [CH/CH]; c/o Eugster Carl, Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EUGSTER, Carl [CH/CH]; Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH). EUGSTER, Conrad, Hans [CH/CH]; Herrengütlistrasse 18, CH-8304 Wallisellen (CH). HALDEMANN, Walter [CH/CH]; Zeigerweg 23, CH-4102 Binningen (CH). RIVARA, Giorgio [IT/IT]; Via Costa, 121, I-10070 San Francesco al Campo (IT). (74) Gemeinsamer Vertreter: MARIGEN S.A.; c/o Eugster, Carl, Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: ULTRAMICROEMULSIONS FROM SPONTANEOUSLY DISPERSIBLE CONCENTRATES WITH PHARMACOLOGICALLY EFFECTIVE ESTERS OF APOCAROTINOLS (54) Bezeichnung: ULTRAMIKROEMULSIONEN AUS SPONTAN DISPERGIERBAREN KONZENTRATEN MIT PHARMAKOLOGISCH WIRKSAMEN ESTERN VON APOCAROTINOLEN (57) Abstract Described are ultramicroemulsions from spontaneously dispersible concentrates with pharmacologically effective esters of apocarotenols, their use as drugs effective against tumors, psoriasis and eczemas, new esters with these apocarotinols and methods for preparing them. (57) Zusammenfassung Ultramikroemulsionen aus spontan dispergierbaren Konzentraten mit pharmakologisch wirksamen Estern von Apocarotinolen, deren Verwendung als Arzneimittel mit Wirksamkeit gegen Tumore, Psoriasis und Ekzeme, neue Ester mit diesen Apocarotinolen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung werden beschrieben.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

ULTRAMIKROEMULSIONEN AUS SPONTAN DISPERGIERBAREN KONZENTRATEN MIT PHARMAKOLOGISCH WIRKSAMEN ESTERN VON APOCAROTINOLEN

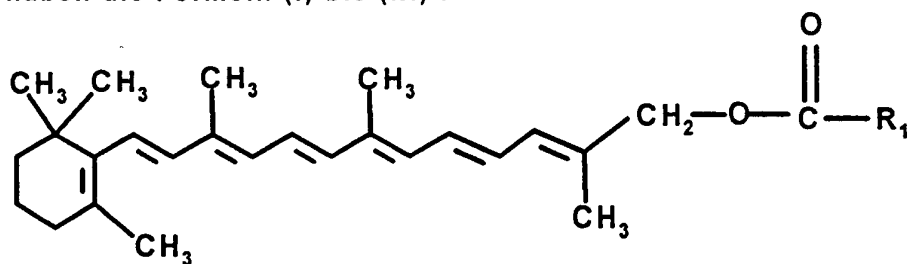
EINLEITUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Ultramikroemulsionen aus spontan dispergierbaren Konzentraten mit Estern von Apocarotinolen, neue Ester mit Apocarotinolen, Verfahren zu ihrer Herstellung, sowie ihre Verwendung zur Behandlung von Tumoren, Psoriasis und Ekzemen.

Ausgewählte Ester von Apocarotinolen haben überraschenderweise eine sehr gute Wirkung gegen Tumore, Psoriasis und Ekzeme, insbesondere dann, wenn sie in spontan dispergierbare Konzentrate eingearbeitet worden sind, welche mit Wasser verdünnt thermodynamisch stabile Ultramikroemulsionen ergeben mit Mizellen, die einen hydrodynamischen Radius von 1,5 bis 3 nm aufweisen. Messungen wurden durchgeführt mit (dynamischer) quasielastischer Lichtstreuung am Institut für Polymere an der E.T.H., Zürich (Prof.Dr. Pier Luigi LUISI und Prof.Dr. Peter SCHURTENBERGER).

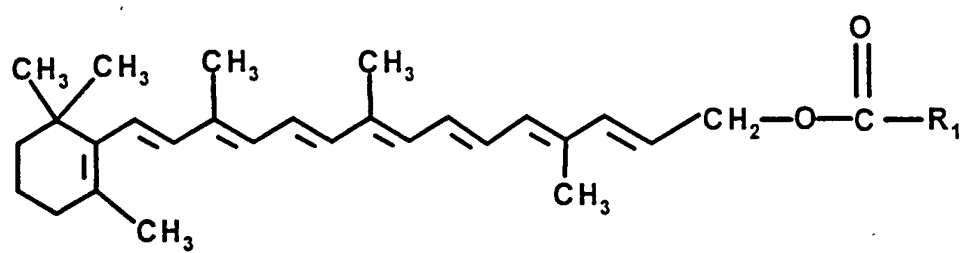
BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Die für die vorliegende Erfindung ausgewählten Ester mit Apocarotinolen haben die Formeln (I) bis (IX) :

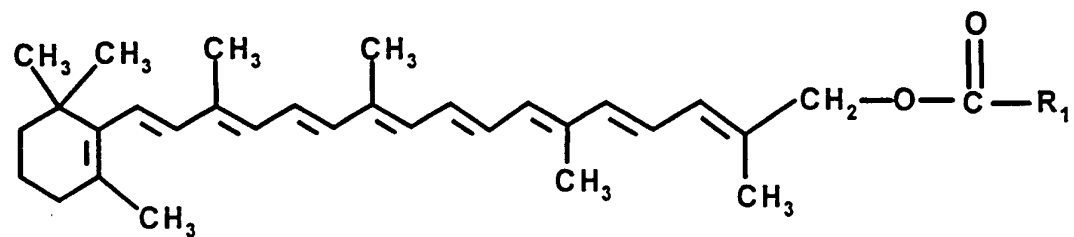


(I)

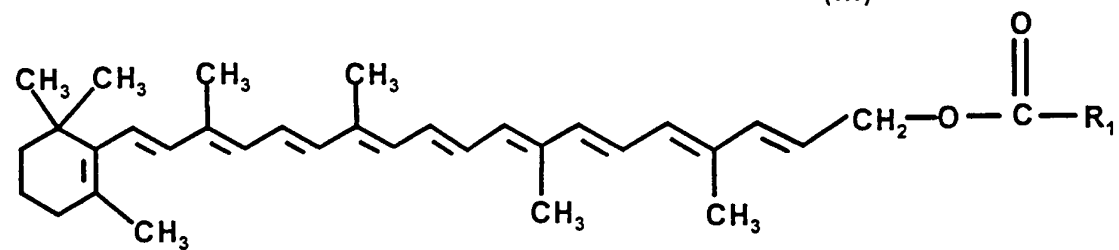
-- 2 --



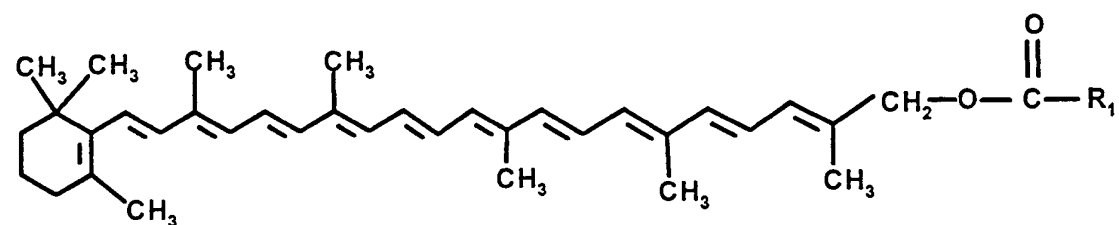
(II)



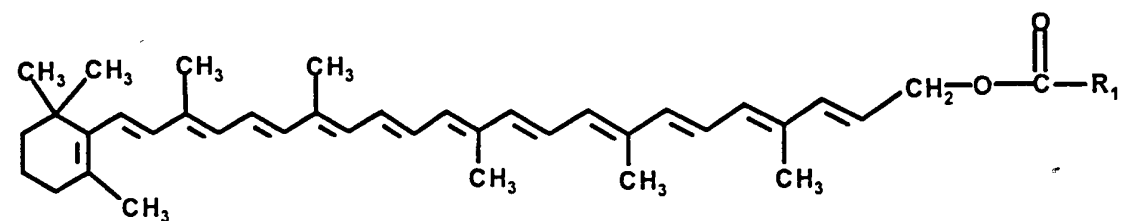
(III)



(IV)

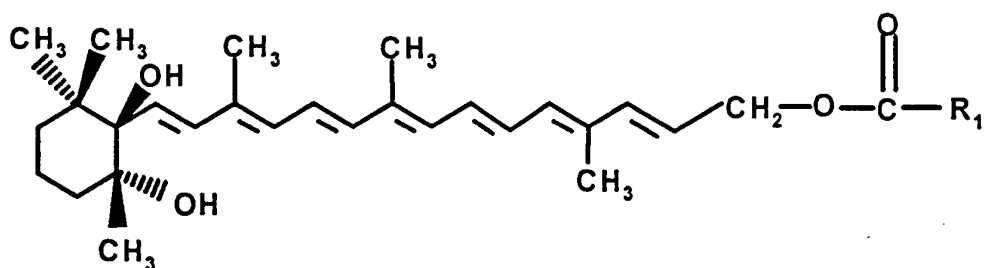


(V)

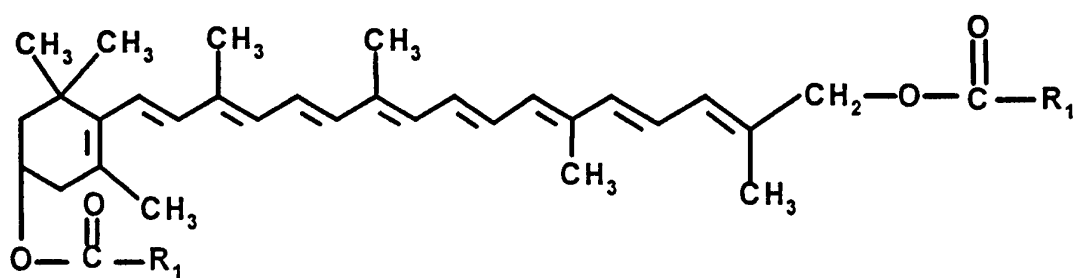


(VI)

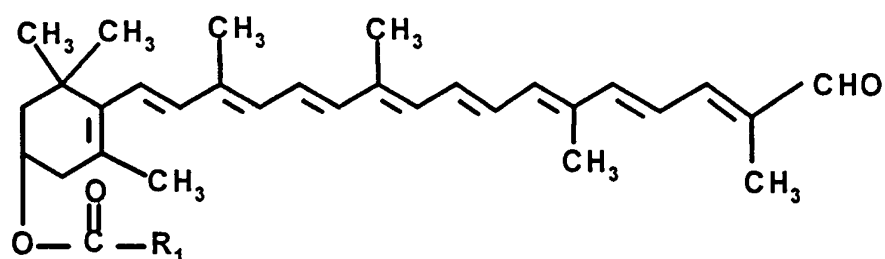
-- 3 --



(VII)

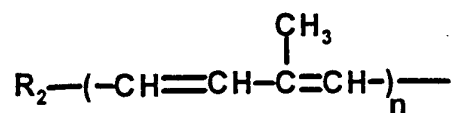


(VIII)

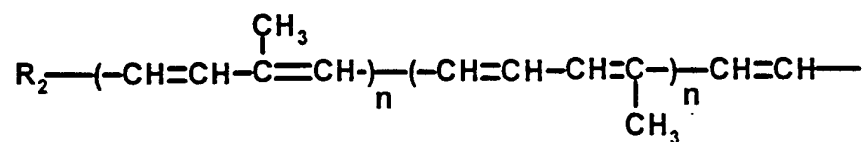


(IX)

wobei in den Formeln (I) bis (IX) R_1 eine C_1 - bis C_{32} -Alkyl-, eine C_2 - bis C_{32} -Alkenyl-, bzw. Alkapolyen-, eine C_2 - bis C_{32} -Alkynylgruppe oder ein Radikal der Formeln (X), bzw. (XI) darstellt:



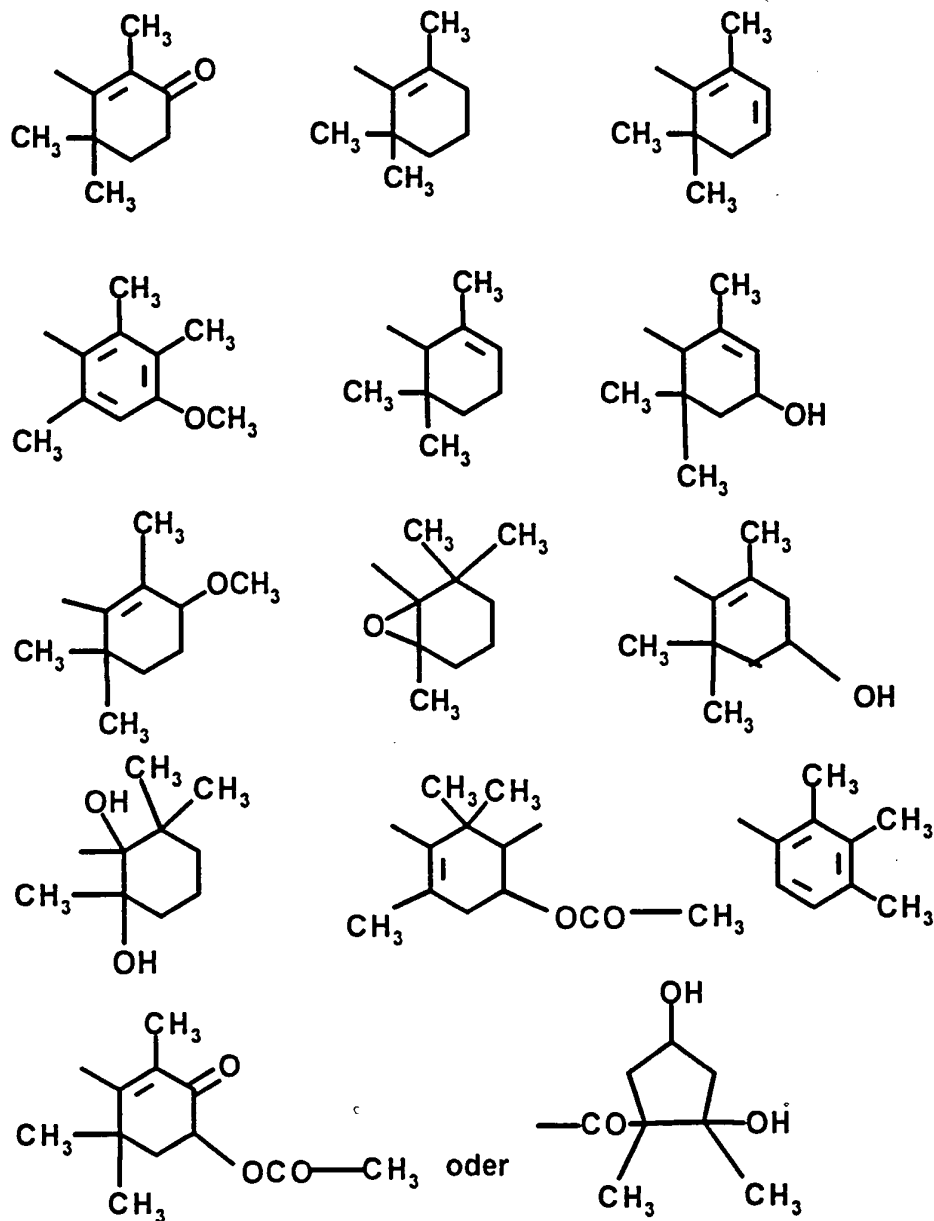
(X)



(XI)

worin n die Zahlen 1, 2, 3, 4 oder 5 bezeichnet und R_2 für eines der Radikale der Formeln

-- 4 --

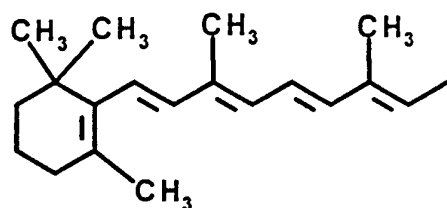


steht.

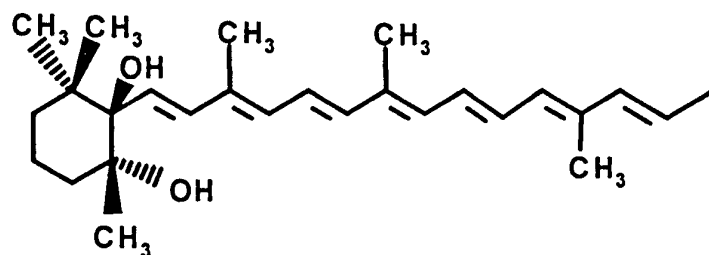
Die Alkyl-, Alkenyl-, bzw. Alkapolyengruppen (d.h. die entsprechenden Alkadiene, Alkatriene, Alkatetraene, Alkapentaene, Alkahexaene oder Alkapentaene), sowie die Alkinylgruppen bei R₁ können geradkettig oder verzweigt sein.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formeln (I) bis (IX), worin R₁ eine C₁- bis C₁₈-Alkyl-, eine C₂- bis C₁₈-Alkenyl-, bzw. Alkapolyen-, eine C₂- bis C₁₈-Alkinylgruppe oder ein Radikal der Formeln (XII) und (XIII) bezeichnet :

-- 5 --



(XII)



(XIII)

Besonders wichtig sind Verbindungen der Formeln (I) bis (IX), worin R_1 eine C₄- bis C₁₈-Alkyl-, eine C₂- bis C₁₈-Alkenyl-, bzw. Alkapolyen-, eine C₂- bis C₁₈-Alkynylgruppe oder ein Radikal der Formel (XII) darstellt.

Die Verbindungen der Formeln (I) bis (IX) können in verschiedenen Stereoisomeren oder Drehformen vorliegen. Beispiele von Verbindungen der Formeln (I) bis (IX) sind u.a.:

- 8'-Apo- β -carotin-3-ol-10-undecenoat
- 8'-Apo- β -carotin-3,8'-ol-di-10-undecenoat
- 3',4'-Dihydro-2'-apo- β -carotin-2-ol-10-undecenoat
- β -Apo-12'-carotin-12'-ol-10-undecenoat
- β -Apo-10'-carotin-10'-ol-10-undecenoat
- β -Apo-8'-carotin-8'-ol-10-undecenoat
- β -Apo-8'-carotin-8'-ol-laurat
- β -Apo-8'-carotin-8'-ol-palmitat
- β -Apo-8'-carotin-8'-ol-10-stearat
- β -Apo-6'-carotin-6'-ol-10-undecenoat
- Azafrinyl-10-undecenoat
- Azafrinyl-laurat
- Azafrinyl-palmitat
- Azafrinyl-stearat

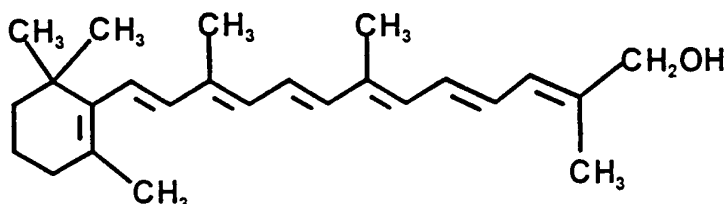
Die neuen Verbindungen der Formeln (I) bis (IX) lassen sich allgemein nach folgenden, an sich bekannten Verfahren a) oder b) herstellen:

-- 6 --

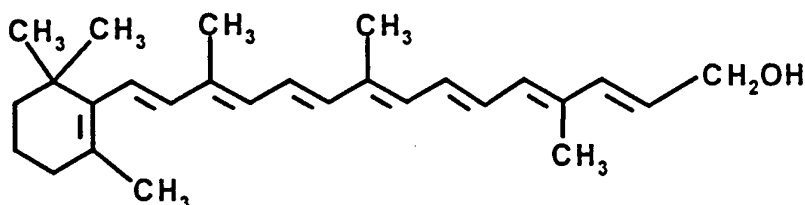
a) Umsetzung einer Verbindung der Formel (XIV)



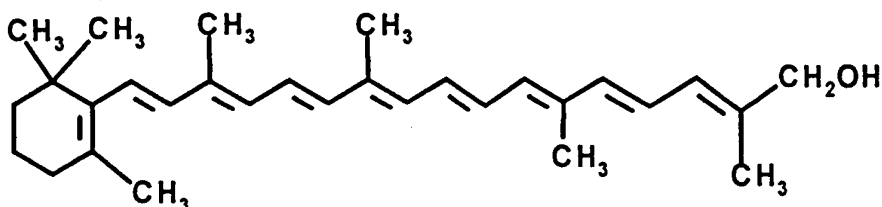
worin R_3 für eine C_1 - bis C_{32} -Alkyl-, eine C_2 - bis C_{32} -Alkenyl-, bzw. Alkapolen-, eine C_2 - bis C_{32} -Alkynylgruppe oder ein Radikal der Formeln (X), oder (XI) steht, mit N,N'-Carbonyldiimidazol bei 0 bis 50 °C unter Schutzgasleitung und Zusatz einer katalytischen Menge eines Alkoholates in einem indifferenten Lösungsmittel und anschliessender Alkoholyse der gebildeten Imidazolide mit einer Verbindung der Formeln (XV) bis (XXIII):



(XV)

 β -Apo-12'-carotin-12'-olTotalsynthese: R. Rüegg et al., *Helv.Chim.Acta* 42, 847-864 (1959)

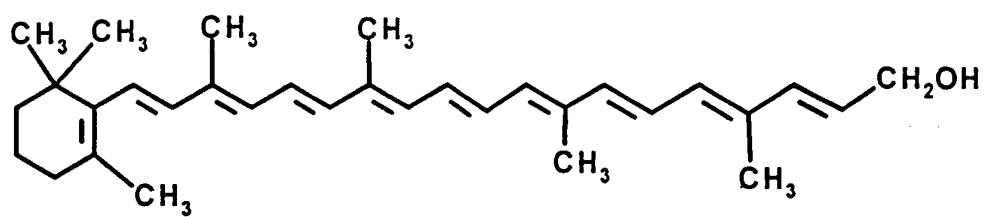
(XVI)

 β -Apo-10'-carotin-10'-olTotalsynthese: R. Rüegg et al., *Helv.Chim.Acta* 42, 847-864 (1959)

(XVII)

 β -Apo-8'-carotin-8'-olTotalsynthese: R. Rüegg et al., *Helv.Chim.Acta* 42, 847-864 (1959)

-- 7 --

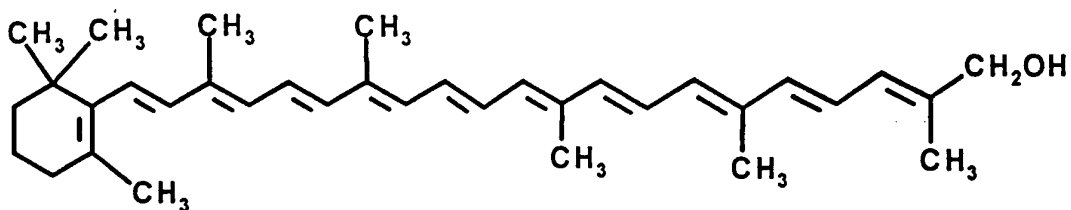


(XVIII)

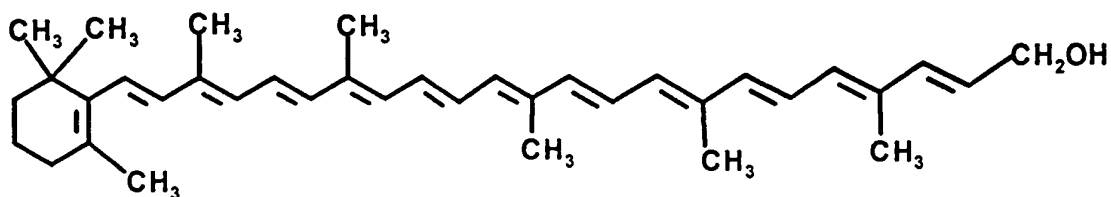
β -Apo-6'-carotin-6'-ol

Totalsynthese: R. Rüegg et al., *Helv.Chim.Acta* 42, 847-864 (1959)

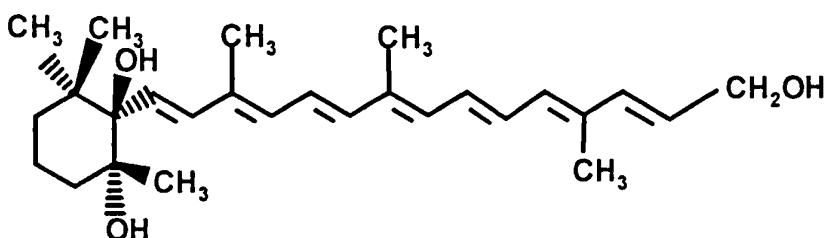
-- 8 --



(XIX)

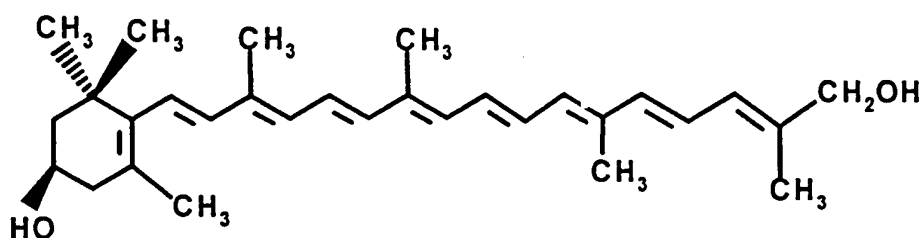
 β -Apo-4'-carotin-4'-olTotalsynthese: R. Rüegg et al., *Helv.Chim.Acta* 42, 847-864 (1959)

(XX)

 β -Apo-2'-carotin-2'-olTotalsynthese: R. Rüegg et al., *Helv.Chim.Acta* 42, 847-864 (1959)

(XXI)

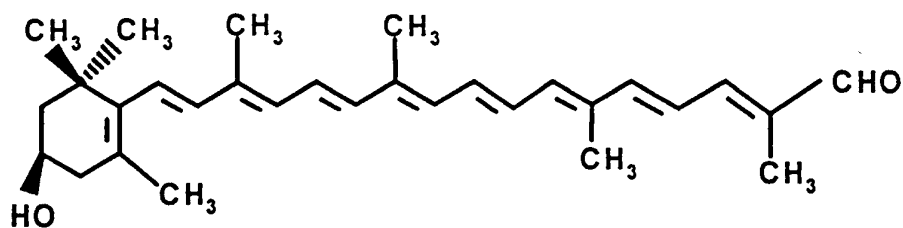
Azafrinol; (5R,6R)-5,6-Dihydroxy-5,6-dihydro-10'-apo-carotin-10'-ol

Totalsynthese: W. Eschenmoser und C.H. Eugster, *Helv.Chim.Acta* 61, 822 (1978). Merck-Index 11.911

(XXII)

 β -Citraurol; β -CitraurinolSynthese: H. Pfander et al., *Helv.Chim.Acta* 63, 716-727, (1980)

-- 9 --

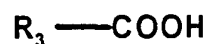


(XXIII)

β -Citraurin; β -Citraurinin, Apo-2-Zeaxanthinal, (3R)-3-Hydroxy-8'-apo- β -carotin-8'-al

Synthese: H. Pfander et al., *Helv.Chim.Acta* **63**, 716, 1377 (1980). Merck-Index 11.2326.

b) Bildung des Chlorides, bzw. Bromides einer Verbindung der Formel (XIV)

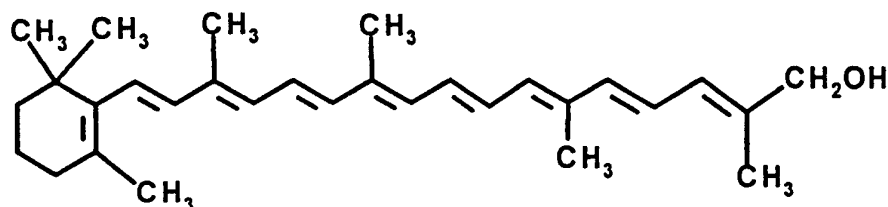


(XIV)

worin R_3 für eine C_1 - bis C_{32} -Alkyl-, eine C_2 - bis C_{32} -Alkenyl-, bzw. Alkapolen-, eine C_2 - bis C_{32} -Alkynylgruppe oder für ein Radikal der Formeln (X) oder (XI) steht, mit einem Chlorierungs- oder Bromierungsmittel, wie z.B. Thionylchlorid, Oxalylchlorid, und anschließende Umsetzung mit einer Verbindung der Formeln (XV) bis (XXIII) bei einer Temperatur von 0 bis 50 °C unter Schutzgaszuleitung, in einem indifferenten Lösungsmittel, wie z.B. Toluol oder Tetrahydrofuran, und in Gegenwart eines Katalysatoren, wie z.B. Pyridin, Dimethylformamid oder p-Dimethylaminopyridin.

c) Herstellung von Fettsäureestern von 8'-Apo- β -carotin-8'-ol im Wege des DIBAH-Verfahrens.

Die Verbindung (XVII), d.h. der C_{30} -Alkohol:



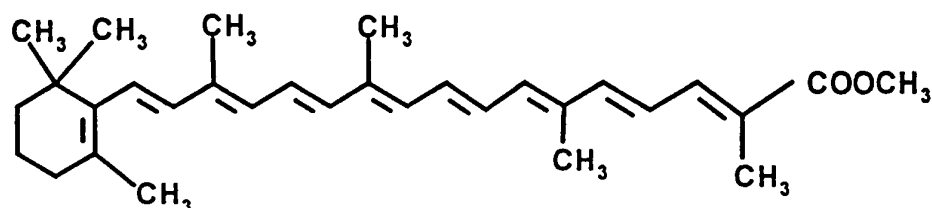
(XVII)

wurde bislang hergestellt durch Reduktion von 8'-Apo- β -carotin-8'-al mit LiAlH_4 in Ether. [R. Rüegg, M. Montavon, G. Ryser, G. Saucy, G. Schwieter und O. Isler, *Helv.Chim.Acta* 1959, **42**, 854]. Der C_{30} -Alkohol wurde wie folgt charakterisiert: instabile orange Kristalle mit Smp. 148-149 °C; λ_{max}

-- 10 --

(Petrolether): 426, 453 nm; O-Acetylverbindung: orange Blättchen, Smp. 130-132 °C, $\lambda_{\max}$ (Petrolether): 426, 452 nm; leicht erfolgende Eliminationsreaktion bei Chromatographieversuchen an Al_2O_3 . Andere, insbes. höhere Ester sind bisher nicht beschrieben worden.

Das neue, ergiebige Herstellverfahren für den C_{30} -Alkohol führt über die Reduktion des 8'-Apo- β -carotin-8'-säuremethylesters



mittels DIBAH (Diisobutylaluminiumhydrid).

C_{30} -Alkohol, 8'-Apo- β -carotin-8'-ol

In einem trockenen 1 liter Dreihalskolben mit Einleitrohr für Schutzgas, Kühler, Magnetrührer und Septum werden 3.0 g Methyl-8'-Apo- β -carotin-8'-oat und 300 ml absoluter Diethylether vorgelegt. Hierauf wird unter N_2 auf -30°C gekühlt und dann 3,0 ml einer ca. 4,5 molaren Lösung von DIBAH in Hexan mithilfe einer Spritze langsam zugetropft. Es tritt keine sichtbare Reaktion ein. Nun lässt man das Gemisch langsam auf RT kommen und kontrolliert die Vollständigkeit der Reduktion mit UV/VIS-Spektren und DC. Wenn noch nicht aller Ester reduziert ist, wird erneut auf -30 °C gekühlt und die benötigte Menge DIBAH zugefügt; etc. Ein Überschuss an DIBAH verringert die erreichbare Ausbeute an C_{30} -Alkohol beträchtlich.

Zur Aufarbeitung wird der Ansatz auf 0 °C gekühlt, dann mit 5 ml Essigester versetzt und schliesslich vorsichtig solange mit kleinen Eisstückchen versetzt, bis kein Aufschäumen mehr eintritt. Hierauf wird das Kühlbad entfernt, das Gemisch mit Celite versetzt und dann abgenutscht. Der Filterkuchen wird mit $\text{Et}_2\text{O}/\text{AcOEt}/\text{Isopropanol}$ 10:4:1 farbstofffrei gewaschen und das klare, rote Filtrat i.V. zur Trockene eingedampft. Der bereits kristalline, rote Rückstand lässt sich entweder aus heissem Toluol/Hexan oder Essigester/Hexan umkristallisieren.

Ausbeute an C_{30} -Alkohol 2,2 bis 2,4 g (80-90%). Orangerote Nadeln, Smp. 148-149 °C; UV/VIS (Et_2O , qualitativ): $\lambda_{\max}$: 416, 425, 452 nm; IR (KBr): 2,77 (3603 cm^{-1} , OH frei), keine Banden im Carbonylbereich; CI-MS (NH_3): 419 [$\text{M}+1$, (16)] 401 [$\text{M}+1-\text{H}_2\text{O}$, (100)], 402 [$\text{M}+2-\text{H}_2\text{O}$, (30)], 309 [$\text{M}+1$ -Toluol, (5%)]

-- 11 --

Herstellung und Charakterisierung von Undec-10-ensäure -[8'-Apo-β-carotin-8'-yl-ester]

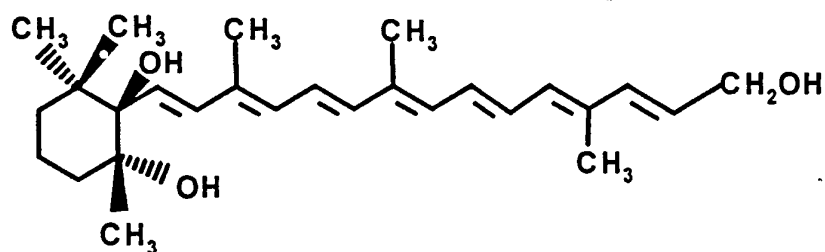
Eine Lösung von 400 mg C₃₀-Alkohol in 20 ml abs. Et₂O und 1,5 ml abs. Pyridin wird in einem Dreihalskolben mit Magnetrührer, N₂-Einleitrohr, Rückflusskühler und Septum unter N₂ auf -30 °C gekühlt und hierauf unter Rühren mit 200 ml Undec-10-enoylchlorid tröpfchenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe lässt man die Temperatur langsam auf 20 °C steigen und kontrolliert die Vollständigkeit der Veresterung durch DC auf Kieselgelplatten mit dem Fließmittel Benzol/Petrolether 1:1. Der Ester weist einen bedeutend höheren R_f.-Wert als der Alkohol auf. Nun wird das Gemisch i.V. eingedampft, der Rückstand in Benzol aufgenommen und das Gelöste rasch durch eine kurze Säule von CaCO₃ (Merck Art. 2066) filtriert. Das Filtrat wird eingedampft und der Rückstand an 40 g Kieselgel (Merck, 15-40 μm) mit Benzol chromatographiert. Die Substanz aus der roten Zone wird aufgefangen, i.V. eingedampft und der erhaltene Ester aus t-Butylmethylether/Pentan bei -20 °C kristallisiert. Man erhält 450 mg hellrote Kristalle, nach Trocknen bei 40 °C/0,01 Torr; Ausbeute 80%. Smp. 76-77 °C, nach Sintern ab 75 °C. Analytische Details vgl. die technische Beilage 1/2.

In analoger Weise werden die Ester mit Laurinsäure-, Palmitinsäure- und Stearinsäurechlorid hergestellt. Vgl. die technische Beilage 1/2.

d) Herstellung von Azafrinol und von Azafrinylestern

Azafrinol

Die Verbindung

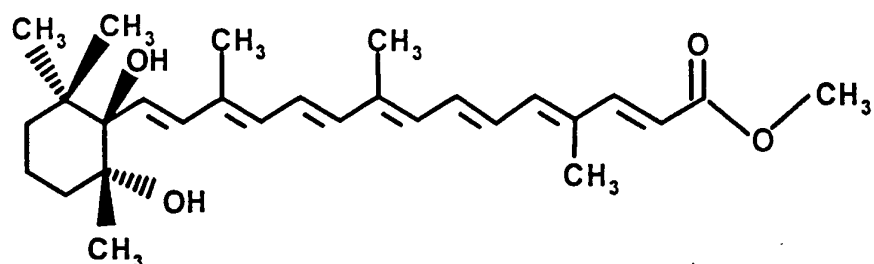


(XXI)

Azafrinol; (5R,6R)-5,6-Dihydro-10'-apo-8-β-carotin-5,6,10'-triol)

wurde erstmals von W. Eschenmoser und C.H. Eugster durch Reduktion von Azafrinmethylester

-- 12 --



hergestellt und als labiles Öl beschrieben; s. *Helv.Chim.Acta* 1975, **58**, 1722.

Durch eine modifizierte Reduktion und Aufarbeitung kann Azafrinol als wohlkristallisierte Verbindung isoliert und anschliessend auch eingehend charakterisiert werden. Azafrinol wird so durch Kristallisation aus Benzol/Hexan in leuchtend hellorangefarbenen Nadeln erhalten. Die Verbindung ist besonders gegen Säuren sehr empfindlich und verliert dabei unter Ringaufspaltung Wasser. Diese Reaktion tritt bereits bei einer Chromatographie an Kieselgel ein.

Herstellung und Charakterisierung

In einem sorgfältig getrockneten Dreihalskolben, versehen mit Rückflusskühler, Gaseinleitrohr, Septum und Magnetrührer werden 3 g Azafrinmethylester mit 300 ml absolutem Ether übergossen und hierauf unter Schutzgas und gutem Rühren auf -30 °C gekühlt. Dann werden durch das Septum 3,5 ml einer ca. 4,5 molaren Lösung von DIBAH (Diisobutylaluminiumhydrid) in Hexan mittels einer Spritze tropfenweise zugegeben; es tritt keine sichtbare Reaktion ein. Während einer langsamen Temperaturerhöhung bis auf 0 °C wird der Verlauf der Reaktion mithilfe von UV/VIS-Spektren und DC überprüft.

Zeigt sich, dass die Reduktion noch unvollständig ist, wird erneut auf -30 °C gekühlt und eine entsprechende Menge von DIBAH-Lösung zugegeben. Ein geringer Überschuss an DIBAH wirkt sich auf die Ausbeute nicht wesentlich aus, doch muss ein grösserer Überschuss unbedingt vermieden werden.

Nach Beendigung der Reaktion wird die Lösung sehr vorsichtig solange mit kleinen Eisstückchen versetzt, bis kein Aufschäumen mehr eintritt und das Ausfallen von Aluminiumhydroxid beendet ist. Nach Zugabe von genügend Celite und von 0,2 ml Ethyldiisopropylamin wird abgenutscht und der Filterkuchen mit einem Gemisch von Ether/Isopropylalkohol 5:1 farbstofffrei gewaschen. Das gelborange gefärbte Filtrat wird hierauf i.V. eingedampft und der kristalline Rückstand in Toluol/Isopropylalkohol 99:1 heiss gelöst und im Falle einer Trübung die Lösung rasch durch eine kleine, breite Säule

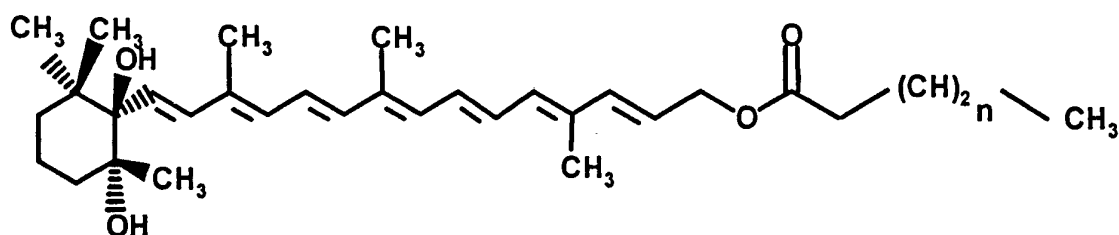
-- 13 --

von CaCO_3 filtriert. Es folgt ein erneutes Eindampfen des Filtrates und die Umkristallisation des Rückstandes aus heissem Benzol/Hexan oder Essigester/Hexan. Nach Trocknen bei $40^\circ\text{C}/0,01$ Torr erhält man 2,2 g leuchtend hellorange Nadeln. Smp. $133-134^\circ\text{C}$ (Vakuummörchen). Für die analytischen Einzelheiten vgl. die technische Beilage 2/2.

Herstellung von Undec-10-ensäure[azafrinyl]ester

In einer geeigneten, gut getrockneten Schliffapparatur mit Magnetrührer, Schutzgaseinleitrohr, Kühler und Septum werden 180 mg frisch umkristallisiertes Azafrinol unter N_2 in 15 ml Et_2O und 0,5 ml abs. Pyridin gelöst und hierauf auf -30°C gekühlt. Dann werden mit einer Spritze 100 ml 10-Undenoylchlorid tröpfchenweise zugegeben. Nach einer h Rühren bei einer Temperatur von -30°C lässt man auf RT kommen. Anschliessend wird das Gemisch i.V. eingedampft, der Rückstand in Hexan/Ether 3:1 aufgenommen und das Lösliche durch eine kurze und breite Säule aus CaCO_3 (Merck, Art. 2066) filtriert. Das zitronengelbe Eluat wird erneut eingedampft und mit Et_2O /Hexan/Isopropanol 50:49:1 + einer Spur Ethyldiisopropylamin an einer Säule aus Sephadex LH-20 (im selben Lösungsmittel gequollen) chromatographiert. Aus der orangen Hauptzone wurden 161 mg vakuumtrockenes, zähes Öl erhalten, das allmählich durchkristallisierte. Es konnte kein signifikanter Smp. erhalten werden. UV/VIS (Et_2O , qual.): scharfes Dreibandenspektrum mit λ_{max} 375, 394,5, 419 nm; (Benzol qual.): 377, 402, 428 nm. Für die übrigen analytischen Daten vgl. die technische Beilage 2/2.

In analoger Weise wurden die Ester



$n = 9$; $n = 13$; $n = 15$, bzw.

Azafrinyl-Laurat, Azafrinyl-Palmitat und Azafrinyl-Oleat hergestellt. Für die analytischen Daten vgl. die techn. Beilage 2/2.

Die Apocarotinester der Formeln (I) bis (IX) haben überraschenderweise eine ausgezeichnete antitumorale Wirkung, insbesondere dann, wenn sie in spontan dispergierbare Konzentrate eingearbeitet worden sind, welche mit Wasser verdünnt thermodynamisch stabile Ultramikroemulsionen mit einem

-- 14 --

hydrodynamischen Radius von 1,5 bis 3 nm ergeben. (Messungen mit dynamischer, quasi-elastischer Lichtstreuung QLS). Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb wesentlich auch *spontan dispergierbare Konzentrate mit den Apocarotinestern der Formeln (I) bis (IX)*.

Die Apocarotinester der Formeln (I) bis (IX) sind nahezu wasserunlösliche und polymer agglomerierte Verbindungen. Damit die Moleküle dieser Verbindungen aber durch die Membranbarriere der Tumorzellen diffundieren und im Innern der Zelle wirksam werden können, müssen derartige Verbindungen vorerst in geeigneter Weise im wässrigen Medium *solubilisiert* werden. Im Wege der Bildung von thermodynamisch stabilen Oel-in-Wasser *Ultramikroemulsionen* mithilfe von besonders ausgewählten Cotensiden oder Lösungsvermittlern einerseits und geeigneten Tensiden andererseits gelingt es, einen optimalen Solubilisierungsgrad der Apocarotin-Ester zu erzielen.

Alle experimentellen Beobachtungen an dergestalt ausgebildeten Ultramikroemulsionen lassen sich einheitlich durch die Annahme deuten, dass die ausgewählten Tenside und Cotenside als ausgewogenes System genommen in der wässrigen Phase organisierte Aggregate, sog. *Mizellen*, bilden. Sie besitzen mehr oder weniger kugelförmige Gestalt, mit einem hydrodynamischen Radius von 1,5 bis 3 nm. Die Tenside und Hydrotrope (Cotenside) lassen zwischen der äusseren, wässrigen Phase und der inneren, öligen Phase der Mikroemulsion [enthaltend die pharmazeutischen Wirksubstanzen gelöst im biotensiden Lösungsvermittler] eine *Grenzschicht* entstehen, wodurch die Mischung dieser beiden Phasen unterbleibt. In der öligen, inneren Phase liegen die Wirksubstanz-Moleküle in monomerer oder in oligomer agglomerierter Form vor.

Die *Mizellen* der erfindungsgemässen Ultramikroemulsionen mit der Wirksubstanz-haltigen *inneren Phase* sind an ihrer Grenzschicht mit einem Tensidmantel versehen, was sie instand setzt, leicht durch die Zellmembran ins Innere der Zelle zu diffundieren. Die Diffusion durch die Plasmamembran der Zellen erfolgt ausschliesslich aufgrund thermischer Molekularbewegungen.

Die Richtung, die ein konkreter Diffusionsvorgang einschlägt, wird vom Konzentrationsunterschied bestimmt, welcher an der Plasmamembran zwischen ausserhalb und innerhalb der einzelnen Zelle besteht. Die Diffusion

-- 15 --

verläuft solange entlang dem Konzentrationsgefälle, bis es abgebaut ist. Zwischen der extrazellulären Zone und dem Inneren der einzelnen Zelle wird die Konzentration an Wirksubstanz, bzw. am Wirkstoffsystem ("multiple drug system") ausgeglichen, wobei auch verzögerte Abgabeeffekte ("slow release effects") auftreten können. Derartige Diffusionsvorgänge verlaufen unabhängig von jeglicher Energiezufuhr. Sie haben keinen Bezug auf die zelluläre Stoffwechselenergie.

Die Diffusionsgeschwindigkeit gehorcht dem Fick'schen Gesetz für Diffusionsvorgänge in Richtung eines Konzentrationsgefälles:

$$\frac{dm}{dt} \frac{1}{q} = -D \frac{dc}{dx} \quad \text{GLEICHUNG (A)}$$

wobei dm die Menge in Mol der eine Zellmembranoberfläche q (in cm²) durchdringenden Wirkstoffmoleküle pro Zeit dt (in Sekunden) ist. D ist der Diffusionskoeffizient und dc der Konzentrationsunterschied über die Distanz dx.

Nach Nernst ist der Diffusionskoeffizient abhängig von der absoluten Temperatur und dem Reibungswiderstand f

$$D = \frac{R}{N} \frac{T}{f} = \frac{kT}{f} \quad \text{GLEICHUNG (B)}$$

Der Reibungswiderstand hängt gemäss dem Stoke'schen Gesetz

$$f = 6 \pi \eta r \quad \text{GLEICHUNG (C)}$$

von der Viskosität der diffundierenden Lösung und vom Radius der diffundierenden Partikel ab. Durch Substitution von f mit $6 \pi \eta r$ in der Nernst-Gleichung erhält man die Sutherland-Einstein Gleichung für den Diffusionskoeffizienten

$$D = \frac{RT}{N} \frac{1}{6 \pi \eta r} = \frac{kT}{6 \pi \eta r} \quad \text{GLEICHUNG (D)}$$

worin k die Boltzmann-Konstante darstellt.

Wird bei einem Diffusionsvorgang ein gleichmässiger Konzentrationsabfall in der Membran der Tumorzelle angenommen, so kann der Ausdruck $\frac{dc}{dx}$ im

Diffusionsgesetz durch $\frac{\Delta c}{x}$ ersetzt werden. (Konzentrationsunterschied Δc über der Zellmembran der Dicke x). x ist für eine bestimmte Zellmembran

-- 16 --

eine konstante Grösse, weshalb man sie zusammen mit dem Diffusionskoeffizienten zu einer neuen Konstanten, dem *Permeabilitätskoeffizienten* P , vereinigen kann

$$P = \frac{D}{x} \quad \text{GLEICHUNG (E)}$$

Der Ausdruck $\frac{dm}{dt} \frac{1}{q}$ in der Diffusionsgleichung wird der *Flux* J genannt und hat die Dimension Mol pro Sekunde pro cm^2 . Das negative Vorzeichen auf der rechten Seite der Diffusionsgleichung deutet an, dass der Transport der Wirkstoffmoleküle oder des Wirkstoffsystems in Richtung der abnehmenden Konzentration abläuft.

Es ist somit

$$J = -F\Delta c = -\frac{RT}{Nx} \frac{1}{6 \pi \eta r} \Delta c = \frac{kT}{x} \frac{1}{6 \pi \eta r} -\Delta c \quad \text{GLEICHUNG (F)}$$

Aus dieser Gleichung folgt, dass die Geschwindigkeit des Diffusionsvorganges, bzw. die Stärke des Wirkstofftransportes durch die Membran der Tumorzelle bestimmt wird:

1. vom Konzentrationsunterschied Δc in den beiden Kompartimenten
2. vom Teilchenradius des diffundierenden Wirkstoffmoleküls oder Wirkstoffsystems
3. von der Viskosität der diffundierenden wässrigen Lösung (Emulsion)
4. von der Temperatur.

-- 17 --

Die erfindungsgemäss spontan dispergierbaren Konzentrate enthalten:
0,001 bis 30 Gewichts-% einzelner Ester von Apocarotinolen der Formeln (I) bis (IX), bzw. Kombinationen solcher Ester, sowie
0 bis 40 Gewichts-% eines als Hydrotrop, bzw. Co-Emulgator dienenden, pharmaverträglichen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches
0,001 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches
0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins
0 bis 10 Gewichts-% eines Penetrationsverbesserers ("flux enhancer"), eines Stabilisators oder Radikalfängers und übliche Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

Die erfindungsgemäss einzusetzenden Tenside oder Tensidgemische können anionaktiv, kationaktiv, amphoter oder nicht-ionogen sein. Bevorzugt sind sie amphoter oder nicht-ionogen und haben ein HLB-Verhältnis (d.h. eine "hydrophilic-lipophilic-balance") zwischen 2 und 18; vorzugsweise liegt er zwischen 2 und 6 einerseits und 10 und 15 andererseits. HLB-Werte geben Auskunft über die hydrophilen und lipophilen Eigenschaften eines Emulgators. Vgl. dazu "Hydrophile-Lipophile Balance: History and recent Developments" von Paul Becher im Journal of Dispersion Science and Technology 5 (1), 81-96 (1984).

Geeignete anionische Tenside können sowohl sog. wasserlösliche Seifen als auch wasserlösliche synthetische Verbindungen sein.

Als Seifen eignen sich die Alkali-, Erdalkali- oder gegebenenfalls substituierten Ammoniumsalze von höheren Fettsäuren (C₁₀ bis C₂₂), wie z.B. die natürlichen Na- oder K-Salze der Oel- oder Stearinsäure, oder von natürlichen Fettsäuregemischen, welche sich u.a. aus Kokosnuss- oder Talgöl gewinnen lassen. Ferner sind als Tenside auch die Fettsäure-Methyltaurinsalze, sowie modifizierte und nicht-modifizierte Phospholipide zu erwähnen.

Häufiger werden jedoch sogenannte synthetische Tenside verwendet, insbesondere Fettsulfonate, Fettsulfate, sulfonierte Benzimidazol-Derivate oder Alkylarylsulfonate.

Die Fettsulfonate und -sulfate liegen in der Regel als Alkali-, Erdalkali- oder gegebenenfalls substituierte Ammoniumsalze vor und weisen im allgemeinen einen Alkylrest mit 8 bis 22 C-Atomen auf, wobei Alkyl auch den Alkylteil von Acylresten einschliesst. Beispiele hierfür sind das Na- oder Ca-Salz der Ligninsulfosäure, des Dodecylschwefelsäureesters und Sulfonsäuren von

-- 18 --

Fettalkohol-Äthylenoxyd-Addukten. Die sulfonierten Benzimidazol-Derivate enthalten vorzugsweise zwei Sulfonsäuregruppen und einen Fettsäurerest mit etwa 8 bis 22 C-Atomen. Alkylaryl-Sulfonate sind z.B. die Na-, Ca- oder Triäthanolaminsalze der Dodecyl-benzolsulfonsäure, der Dibutyl-naphthalinsulfonsäure oder eines Naphthalinsulfonsäure-Formaldehyd-Kondensationsproduktes.

Als nichtionische Tenside stehen in erster Linie zur Wahl die Polyglykolätherderivate von aliphatischen oder cycloaliphatischen Alkoholen, gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren und Alkylphenolen, welche 3 bis 30 Glykoläthergruppen und 8 bis 20 C-Atome im (aliphatischen) Kohlenwasserstoffrest und 6 bis 18 C-Atome im Alkylrest enthalten können. Weiterhin kommen als nichtionische Tenside in Frage die wasserlöslichen, 20 bis 250 Äthylenglykoläthergruppen und 10 bis 100 Propylenäthergruppen enthaltenden Polyäthylenoxydaddukte an Polypropylen glykol und Alkylpolypropylen glykol mit 1 bis 10 C-Atomen in der Alkylkette. Die genannten Verbindungen enthalten üblicherweise pro Propylen glykoleinheit 1 bis 5 Äthylenglykoleinheiten.

Als Beispiele nicht-ionischer Tenside seien erwähnt:

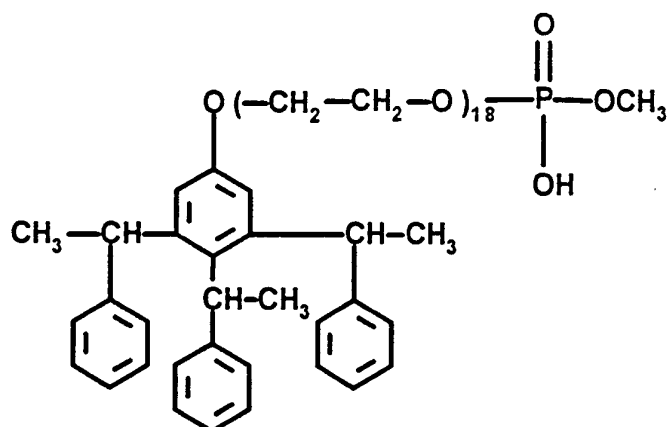
Nonylphenolpolyäthoxyäthanol, Ricinusölpolyglykoläther, Polypropylenpolyäthylenoxyd-Addukte, Tributylphenoxypolyäthoxyäthanol, Polyäthylenglykol und Octylphenoxypolyäthoxyäthanol. Ueberdies kommen auch Fettsäureester von Polyoxyäthylensorbitan, wie das Polyoxyäthylensorbitan-Trioleat, in Betracht.

Bei den kationischen Tensiden handelt es sich vor allem um quaternäre Ammoniumsalze, welche als N-Substituenten mindestens einen Alkylrest mit 8 bis 22 C-Atomen enthalten und als weitere Substituenten niedrige, gegebenenfalls halogenierte Alkyl-, Benzyl- oder niedrige Hydroxy-alkylreste aufweisen. Die Salze liegen vorab als Halogenide, Methylsulfate oder Äthylsulfate vor, z.B. das Stearyltrimethylammoniumchlorid oder das Benzyl-di(2-chloräthyl)äthylammoniumbromid.

In hohem Masse bevorzugt zur Herstellung von erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentraten sind einerseits Phosphorsäure-estertenside, wie z.B.

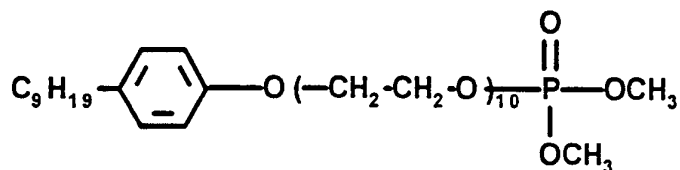
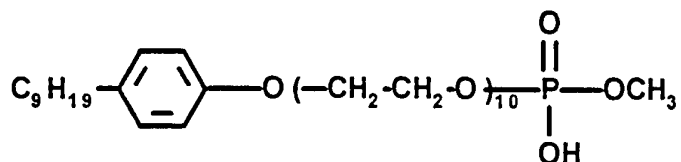
Tristyrylphenolpolyoxyäthylen-18-mono/dimethylphosphorsäureester

-- 19 --



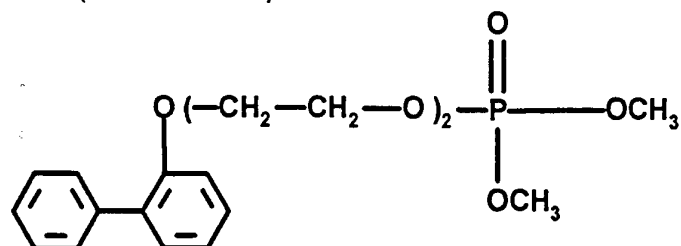
(Soprophor® FL, Rhône-Poulenc);

Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY), bzw. das identische Sermul® EA 188 (SERVO), ein Mischemulgator, bestehend aus je 50 % der beiden Verbindungen mit den Formeln:



Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY)

Tensid 508 (CIBA-GEIGY)

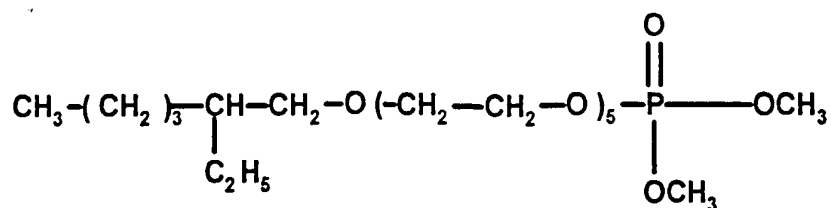


(Tensid 508, CIBA-GEIGY);

Tinovetin® JU (CIBA-GEIGY), ein Hydroxybiphenyl-10-Äthoxy-Phosphorsäureester

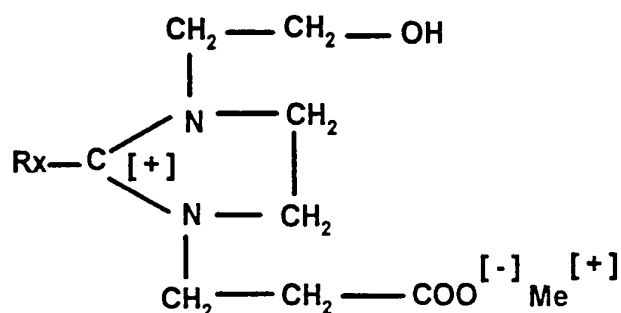
Butyl-mono-4-Äthoxy-Phosphorsäureester (Zerostat® AT, CIBA-GEIGY), bzw.

-- 20 --



(Zerostat® AN, CIBA-GEIGY)

und andererseits Betainverbindungen, d.h. amphotere, salz- und wasserfreie Imidazolderivate, wie z.B.:



worin Me[+] für Wasserstoff, Alkali- und Erdalkaliatome und R_x für C₁- bis C₃₂-Alkyl oder C₂- bis C₃₂-Alkenylgruppen stehen.

Verwendung finden auch sog. "multi-functional Glucose Derivatives", wie z.B. Glucate® SS (Methyl-Glucose-Sesquistearat) und Glucamate® SSE-20 (PEG-20 Methyl-Glucose-Sesquistearat) von Amerchol, Edison, N.J.

Als Hydrotrop, bzw. als Co-Emulgator dienende, pharmaverträgliche Lösungsmittel lassen sich einsetzen, z.B.:

Ester eines aliphatischen Alkohols (C₃ bis C₁₈) mit einer aliphatischen Carbonsäure (C₁₀ bis C₂₂), wie etwa Isopropylaurat, Hexyllaurat, Decyllaurat, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat und Laurylmyristat; Kohlenwasserstoffe mit einer geraden Kohlenstoffkette (C₁₂ bis C₃₂), welche mit 6 bis 16 Methylgruppen substituiert ist und 1 bis 6 Doppelbindungen aufweisen kann, wofür Terpene wie Polymethylbutane und Polymethylbutene als Beispiele dienen mögen.

Mono-Ester aus Äthylenglykol oder Propylenglykol mit einer aliphatischen Carbonsäure (C₆ bis C₂₂), wie etwa Propylenglykolmonolaurat und Propylenglykolmonomyristat.

Ester aus einem aliphatischen Alkohol (C₁₂ bis C₂₂) mit Milchsäure, wie z.B. Myristyl- oder vorzugsweise Lauryl-Lactat; Mono-, Di- oder Triester des

-- 21 --

Glycerins mit einer aliphatischen Carbonsäure (C₆ bis C₂₂), wie z.B. Glyceryl-Caprylat, oder Miglyol® 812 Neutralöl (Oleum neutrale).

Ester aus einem Poly(2-7)äthylenglykolyglyzerinäther mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe mit einer aliphatischen Carbonsäure (C₆ bis C₂₂), wie z.B. aliphatische Alkohole (C₁₂ bis C₂₂), somit u.a. Dodecanol, Tetradecanol, Oleylalkohol, 2-Hexyldecanol und 2-Octyldecanol.

Ester mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe, aus Poly-(2-10)glykol mit einer aliphatischen Carbonsäure (C₆ bis C₂₂), Monoäther aus einem Poly-äthylenglykol mit einem aliphatischen Alkohol (C₁₂ bis C₁₈), wie z.B. Polyoxyäthylen (C₁₀)-octyläther.

Heterocyclische Verbindungen, wie z.B. 1-Methyl-2-Pyrrolidon.

Biotenside Ester der allgemeinen Formel:



(XXIV)

worin R₄ Citronellyl, Geranyl, Farnesyl, Phityl oder Isophityl und R₅ eine C₁- bis C₃₂-Aky, bzw. C₂- bis C₃₂-Alkenyl- oder Alkapolyengruppe bedeuten,

Alle technischen Tenside wurden vor dem Eintrag in die spontan dispergierbaren Konzentrate mittels Filtration, bzw. Chromatographie über neutralem Aluminiumoxyd mit einem inerten Lösungsmittel wie z.B. Tetrahydrofuran, Äthylalkohol oder Methylenchlorid gereinigt.

Als Zusätze in die erfindungsgemässen spontan dispergierbaren Konzentrate eignen sich Vitamine und Provitamine (wie z.B. Vitamin A, Retinol, Tocopherole), sowie auch ausgewählte Penetrationsverbesserer ("Flux enhancers") und Radikalfänger.

Die zur pharmazeutischen Anwendung erforderliche Tagesdosis beträgt 0,001 bis 25 mg/kg Körpergewicht, wenn möglich verteilt auf 2 bis 3 Einzeldosen. Hiefür lassen sich die neuen Ester mit Apocarotinolen oder die spontan dispergierbaren Konzentrate mit diesen Verbindungen in die gängigen pharmazeutischen Zubereitungen und Darreichungsformen wie Dragées, Tabletten, Kapseln, Pulver, Granulate, Pellets, Lösungen, Ampullen, Emulsionen, Crèmes oder Zäpfchen zusammen mit den üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungs- und Stabilisierungsmitteln einarbeiten.

-- 22 --

Die Gegenstand der Erfindung bildenden Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen, sowie die spontan dispergierbaren Konzentrate, welche diese Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen enthalten, können dem Menschen oral, durch Injektion (intravenös, subkutan oder intramuskulär) oder in anderer Weise verabreicht werden. Wenn sie als feste Darreichungsformen für die orale Verwendung aufbereitet werden, kann dies in Form von Tabletten, Granulaten, Pellets, Pulvern oder Kapseln, usw. geschehen. Die Aufbereitungen können Zusatzstoffe enthalten, z.B. einen Arzneimittelträger wie eine Saccharid- oder Cellulose-Grundlage, ein Bindemittel wie Stärkepaste oder Methylcellulose, ein Füllmittel oder ein Desintegriermittel, usw. - wobei Zusatzstoffe eingesetzt werden, wie sie üblicherweise bei der Herstellung medizinischer oder paramedizinischer Formulierungen verwendet werden. Wenn die erfindungsgetreuen Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen als flüssige Darreichungsformen zu oraler Verabreichung gelangen, so können sie irgend eine aus wässrigen Zubereitungen für innere Verwendung, aus Suspensionen, Emulsionen und Sirups usw. ausgewählte Form haben, und sie können ausserdem in der Form Vacuum-getrockneter Präparate vorliegen, welche vor ihrer Verwendung in Lösung oder Emulsion gebracht werden.

Wenn die erfindungsgemässen Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen in der Form wässriger Lösungen, Suspensionen oder ölicher, bzw. wässriger Emulsionen, vorzugsweise als Mikroemulsionen aus den erfindungskonformen, spontan dispergierbaren Konzentraten aufbereitet sind, können sie auch injiziert werden. Die Injektionslösungen werden jedoch üblicherweise kurz vor der Anwendung hergestellt, indem man die Extrakte oder Konzentrate in wässrigen, flüssigen Medien wie sterilem Wasser, Glucoselösung oder physiologischer Kochsalzlösung auflöst oder suspendiert.

Falls erforderlich, können zu einem Injektionspräparat üblicherweise verwendete Lösungsmittel, Stabilisierungsmittel, Konservierungsmittel und Zusätze für die Herstellung isotonischer Lösungen hinzugegeben werden. Die auf diese Weise erhaltenen Injektions-Präparate werden intravenös, intramuskulär, subkutan oder in einer anderen geeigneten Weise verabreicht.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls *pharmazeutische Präparate*, welche die Wirkstoffe, bzw. Wirkstoffgemische, und/oder die beschriebenen, spontan dispergierbaren Konzentrate zur Bekämpfung des Wachstums von Tumorzellen enthalten. Bei den der Erfindung entsprechenden pharma-

-- 23 --

zeutischen Präparaten handelt es sich um solche zur enteralen (wie oralen oder rektalen), sowie zur parenteralen oder topischen Verabreichung an Warmblüter, welche das spontan dispergierbare Konzentrat allein oder zusammen mit einem pharmazeutisch anwendbaren Trägermaterial enthalten.

Die Dosierung der erfindungsgemässen Konzentrate hängt von der Warmblüterspezies, dem Alter und dem individuellen Zustand, sowie von der Verabreichungsart ab. So werden z.B. zur Erzielung eines Abtötungseffektes von Tumorzellen an Warmblütern mit geringem Körpergewicht, wie z.B. Mäusen, Ratten und Hamstern, bei sukutaner Verabreichung Dosen im Bereich von ca. 0,1 bis 50 mg/kg Körpergewicht, und bei intraperitonealer Verabreichung Dosen im Bereich von 0,05 bis 5 mg/kg Körpergewicht angewandt.

Die oralen und rektalen Formen der neuen pharmazeutischen Präparate enthalten zwischen 1 - 95 %, vorzugsweise zwischen 10 - 95 %, insbesondere zwischen 20 - 95 % des erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentrates. Sie können z.B. in Dosis-Einheitsform vorliegen, also als Dragées, Micropellets, Tabletten, Suppositorien oder Ampullen und vor allem als Kapseln.

Geeignete pharmazeutisch anwendbare Trägerstoffe für die oralen Formen sind hauptsächlich Füllstoffe, wie Zucker (z.B. Lactose, Saccharose, Mannit oder Sorbit), Cellulosepräparate und/oder Calciumphosphate (z.B. Tricalcium- oder Calciumhydrogenphosphat), ferner Bindemittel wie Stärkekleister unter Verwendung von u.a. Mais-, Weizen-, Reis- oder Kartoffelstärke, Gelatine, Traganth, Methylcellulose, Hydroxymethylcellulose, Hydroxypropyl-Methylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon und/oder Sprengmittel (wenn erwünscht), wie die obgenannten Stärken, ferner Carboxymethylstärke, quervernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar, Alginsäure oder ein Salz davon, wie z.B. Natriumalginat.

Als Fliessregulierungsmittel sind z.B. die Polyäthylenglykole Nr. 200 bis 600 und höher geeignet.

Die beim Menschen als Darreichungsform bevorzugten Gelatinekapseln werden mit geeigneten Ueberzügen versehen, wobei man u.a. konzentrierte Zuckerlösungen - welche gegebenenfalls arabischen Gummi, Talk, Polyvinylpyrrolidon, Polyäthylenglykol und/oder Titandioxid enthalten - Lacklösungen (wässrige oder solche, die unter Verwendung organischer Lösungsmittel aufbereitet worden sind), oder magensaftresistente Ueber-

-- 24 --

züge aus Lösungen von geeigneten Cellulosepräparaten, wie mikrokristalliner Cellulose (Avicel®), Acetylcellulosephthalat, Hydroxymethylcellulosephthalat (Metolose®), Hydroxypropylmethylcellulose-Acetat-succinat (AQOAT®) oder einem Copolymerisat wie Eudragit® L30D verwendet.

Als erfindungsgemäss besonders geeignete, oral anwendbare pharmazeutische Darreichungsform eignen sich Steckkapseln aus Gelatine und einem Weichmacher, wie Glyzerin oder Sorbitol. Die Weich- bzw. Hartgelatine-Kapseln, sowie solche aus AQOAT® (Hydroxypropyl-Methylcellulose-Acetat-Succinat) können das der Erfindung entsprechende, spontan dispergierbare Konzentrat im Gemisch mit Füllstoffen, wie Laktose, Bindemitteln wie Stärke und/oder Gleitmitteln wie Talk oder Magnesium-Stearat und gegebenenfalls mit Stabilisatoren und Antioxydantien wie z.B. α -, β - oder γ -Tocopherol enthalten. Der Einsatz von geeigneten Flüssigkeiten wie flüssigen Polyäthylenglykolen No. 200 bis 600 als Verdünnungsmittel kann sich empfehlen, wobei sich ebenfalls Stabilisatoren und Antioxydantien zufügen lassen.

Zur parenteralen Verabreichung werden die erfindungsgemässen Konzentrate mit destilliertem Wasser versetzt. Der entstehenden wässrigen Injektions-Mikroemulsion können viskositätserhöhende Stoffe, wie z.B. Na-Carboxymethylcellulose, Sorbit, Mannit und/oder Dextran, und gegebenenfalls auch Stabilisatoren und Antioxydantien zugefügt werden.

Die pharmazeutischen Präparate für die parenterale Anwendung enthalten vorzugsweise zwischen 0,1 bis 60 %, und hauptsächlich zwischen 1 bis 40 % des erfindungskonformen, spontan dispergierbaren Konzentrates.

Als topisch anwendbare Präparate, welche sich vornehmlich zur Prophylaxe und Therapie von Hautkrebsarten eignen, kommen z.B. Crèmen, Salben, Pasten, Pomaden, Schäume, Tinkturen und Lösungen in Betracht, welche zwischen 0,01 bis 70 % des erfindungsgemässen Konzentrates enthalten.

Für Crèmen und Oel-in-Wasser-Emulsionen, welche mehr als 50 % Wasser aufweisen, verwendet man als oelige Grundlage in erster Linie Fettalkohole, z.B. Lauryl-, Cetyl- oder Stearylalkohol, flüssige bis feste Wachse, z.B. Isopropylmyristat, Woll- oder Bienenwachs und/oder Kohlenwasserstoffe wie z.B. Vaseline (Petrolatum) oder Paraffinoel. Zur Emulgierung dieser öligen Grundlagen eignen sich in erster Linie oberflächenaktive, pharmaverträgliche Substanzen mit vorwiegend hydrophilen Eigenschaften, wie z.B. nicht-ionogene Emulgatoren, vorab Fettsäureester von Polyalkoholen oder Äthylenoxydaddukten (etwa Polyglycerinfettsäureester oder Polyäthylen-

-- 25 --

sorbitan-Fettsäureester) mit einem HLB-Wert von unter 8. Zusätze zur Wasserphase sind u.a. Mittel, welche die Austrocknung der Crèmen vermindern, z.B. Polyalkohole wie Glycerin, Sorbit, Propylenglykol und/oder Polyäthylenglykole No. 200 bis 600, ferner Konservierungsmittel, Riechstoffe, etc.

Salben sind Wasser-in-Oel Emulsionen, die bis zu 70 %, vorzugsweise jedoch zwischen 20 und 50 % Wasser oder wässrige Phasen enthalten.

Als Fettphase kommen in erster Linie Kohlenwasserstoffe, z.B. Vaseline, Paraffinoel und/oder Hartparaffine in Frage, welche zur Verbesserung des Wasserbindungsvermögens geeignete Hydroxydverbindungen, wie z.B. Fettalkohole oder Ester, davon etwa Cetylalkohol oder Wollwachsalkohole, enthalten.

Fallweise werden noch Emulgatoren mit einem HLB-Wert von 8 bis 16, wie z.B. Sorbitan-Fettsäureester (etwa Sorbitanisostearol) zugesetzt. Zusätze zur Wasserphase sind u.a. Feuchthaltungsmittel, wie Polyalkohole (Glycerin, Propylenglykol, Sorbit und/oder Polyäthylenglykole No. 200, 400, 600); ferner Konservierungsmittel, Riechstoffe, etc.

Fettsalben sind wasserfrei und enthalten als Grundlage vornehmlich Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Vaseline und/oder flüssige Paraffine; überdies natürliche oder partial synthetische Fette wie z.B. Kokosfettsäuretriglycerid, ferner: Fettsäurepartialester des Glycerins, wie z.B. die im Zusammenhang mit den Salben erwähnten, die Wasser-Aufnahmefähigkeit steigernden Fettalkohole, Emulgatoren und/oder Zusätze.

Pasten sind Crèmen und Salben mit sekretabsorbierenden Puderbestandteilen, wie beispielsweise Metalloxide (etwa Titanoxid oder Zinkoxid), ferner Talk und/oder Aluminiumsilikate, welche die Aufgabe haben, vorhandene Feuchtigkeit oder Sekrete zu binden.

Schäume werden aus Druckbehältern verabreicht und sind in Aerosolform vorliegende Oel-in-Wasser Emulsionen der erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentrate, wobei halogenierte Kohlenwasserstoffe (wie z.B. Chlorfluorniederalkane: etwa Dichlordifluormethan und Dichlortetrafluoräthan) als Treibmittel verwendet werden. Dazu kommen gegebenenfalls die üblichen Zusätze wie Konservierungsmittel, usw.

-- 26 --

VERFAHRENSBEISPIELE zur Herstellung von Estern mit Apocarotinolen der Formeln (I) bis (IX) :

a) Herstellung von β -Apo-8'-carotinol-10-undecenoat

Zu 85 mg β -Apo-8'-carotinol (Synthese vgl. R. Rüegg et al., *Helv.Chim Acta* **42**,847-864)1959), 100 mg Pyridin und 100 mg Dimethylformamid in 20 ml Chloroform werden bei 0 °C und unter Schutzgaszuleitung 100 mg 10-Undecenoylchlorid in 10 ml Chloroform zugetropft. Nach einstündigem Rühren bei 0 °C und zweistündigem Rühren bei 20 bis 40 °C wird mit Wasser verdünnt und ausgeschüttelt. Der Rückstand wird schonend getrocknet und anschliessend auf einer Silicagelsäule mit Hexan/Essigester (90:10) als Eluiermittel chromatographiert.

Man erhält das β -Apo-8'-Carotinol-10-undecenoat mit einem Schmelzpunkt von 76-77 °C, nach Sintern ab 75 °C; UV λ_{max} . 425 nm (in Methylenchlorid); R_f -Wert im DC mit Hexan/Essigester (80:20) 0,92.

IR	3054 cm ⁻¹	δ (Olefin.CH)
	2855 "	ν (CH)
	1724 "	ν (C=O) Ester
	1639 "	ν (C-C)
	1465 "	δ (CH)
	1374 "	δ (CH ₃)
	1185 "	ν (C-O) Ester
	1032 "	ν (C-O)
	914 "	δ (CH) von Olefin
		trans disubst. C=C

Auf analoge Weise wird auch das Azafrinyl-10-undecenoat hergestellt: Brechungsindex $n_{\frac{20}{D}}$ von 1.44210; UV λ_{max} . 420,0 nm (in Methylenchlorid);

R_f -Wert im DC mit Hexan/Essigester (80:20): 0,94.

b) Herstellung von β -Apo-8'-carotinol-10-undecenoat

Ausgangsmaterial: 8'-Apo- β -carotin-8'-säure-äthyl und/oder -methylester. In einer geeigneten Apparatur mit Magnetrührer, N₂-Einleitrohr, Rückflusskühler und Septum werden 2 g 8'-Apo- β -carotin-8'-säuremethylester zu 25 ml Et₂O gegeben, das Gemisch unter N₂ und Rühren auf -35 °C gekühlt und mit der berechneten Menge DIBAH (Diisobutylaluminiumhydrid) in Hexan tropfenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe wird das Kühlbad

-- 27 --

entfernt. Man lässt auf RT kommen. Nach vollständiger Reduktion wird sehr vorsichtig wenig Eis zugegeben und damit solange fortgefahren, bis eine Trübung eintritt. Jetzt kühlen. $\text{Al}(\text{OH})_3$ fällt langsam aus. Nach Beendigung der Fällung wird über genügend Celite filtriert, mit MeOH nachgewaschen und das Filtrat eingedampft. Wenn der Rückstand zu kristallisieren beginnt, kann ohne weitere Reinigung aus heissem Benzol und unter Zugabe von Hexan umkristallisiert werden. Ausbeute 1,2 g braunrote Kristalle; UV/VIS λ_{max} . 425, 452 nm (in Et_2O)

Veresterung von 8'-Apo- β -carotin-8'-ol mit Undecenoylchlorid.

400 mg C_{30} -Alkohol, sowie 20 ml Et_2O und 1 ml Pyridin werden unter Rühren und unter N_2 bei -30°C tropfenweise mit 0,22 ml Undecenoylchlorid versetzt.

Man lässt langsam auf RT kommen, verdünnt mit Petroläther und schüttelt nacheinander mit Wasser und Sole aus. Dann Trocknen über MgSO_4 , Eindampfen und Chromatographie an 40 g Kieselgel (Merck, 15 bis 40 μm Korngrösse) mit Benzol/Hexan 2:1. Nach dem Verwerfen einer gelben Vorzone wird die rote Hauptzone aufgefangen, eingedampft und bei 0,01 Torr bei 40°C getrocknet. Dabei kristallisiert das Produkt vollständig durch. Smp. $76-77^\circ\text{C}$ nach Sintern ab 75°C . UV/VIS λ_{max} . 425,5, 452,5 nm (in Et_2O).

CI-MS (mit sehr schonender chemischer Ionisation) mit peaks bei 575 und 401 nm; m/z. Mw. ($\text{M}^+ + 1$); IR-Spektrum Ester-peak bei 1724 cm^{-1} . ^1H -NMR Spektrum entspricht.

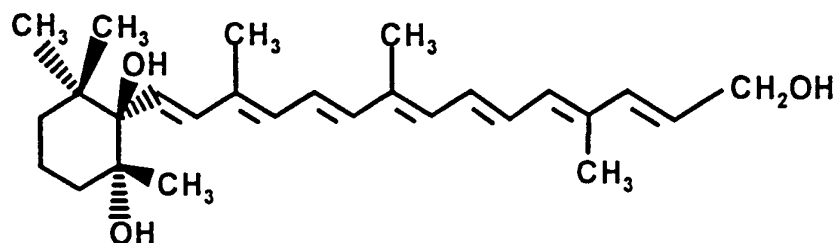
c) Herstellung von Azafrinyl-10-Undecenoat

Ausgangsmaterial Azafrin, isoliert aus Rhizomen von *Escobedia scabifolia*. Herstellung des Methylesters aus der C_{27} -Säure mit Diazomethan/Ether, vgl. W. Eschenmoser und C.H. Eugster, *Helv.Chim.Acta*, **58**, 1722 (1975), Reduktion mit DIBAH analog dem Verfahren b); kein Ausschütteln, sondern direkte Filtration unter Zugabe von 0,5 % Hünigbase. Das Filtrat eindampfen, den Rückstand aufnehmen in Et_2OH und vorhandenes Wasser abscheiden, trocknen über MgSO_4 , filtrieren, eindampfen, den Rückstand mit Toluol/Hexan an einer CaCO_3 -Säule $4,3 \times 20\text{ cm}$ chromatographieren. Die Hauptzone wird mit Toluol/Isopropylalkohol (99:1) eluiert, das Filtrat i.V. zur Trockene gebracht. Nach dem Umkristallisieren aus Benzol/Hexan und AcOEt/Hexan erhält man leuchtend gelbe, sehr säureempfindliche Nadelchen mit einem Smp. von 135°C .

-- 28 --

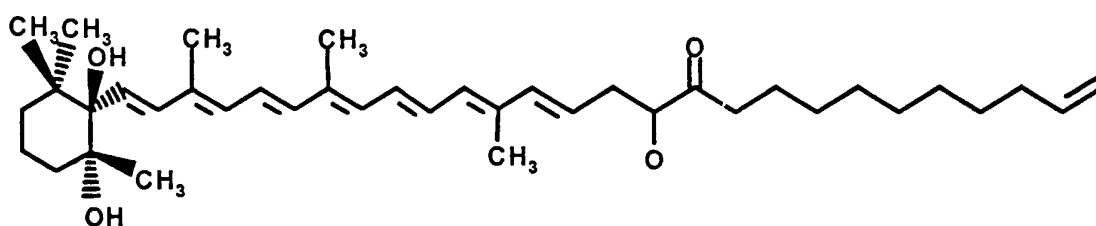
Bildung von Azafrin-10'-ol[undec-10-enoyl]ester.

Apparatur wie beim Verfahren b). Ansatz von 450 mg der Verbindung mit Formel



AZAFRINOL

1,5 ml Pyridin, 2 ml DMF, 20 ml Et₂O; N₂, Rührer, Septum, Temperatur -40 bis -50 °C, Zugabe von 0,20 ml Undecenoylchlorid. Auf 0 °C kommen lassen, dann nochmals 0,20 ml Undecenoylchlorid zugeben und 3½ h bei RT rühren. Verdünnen mit Et₂O und H₂O, Phasentrennung im Scheidetrichter, nochmals H₂O zufügen, dann Sole, Trocknen über MgSO₄; eindampfen. Den Rückstand in wenig CH₂Cl₂/Hexan (10:15) + 0,25 % Hünigbase (N,N-Diisopropyläthylamin) lösen und auf einer Sephadex LH-20-Säule 3,6 x 34,5 cm chromatographieren. Die breite, gelborange Zone auffangen und eindampfen. Zweite Chromatographie-Passage auf einer Kieselgelsäule 3,3 x 17,5 cm mit Toluol/Isopropylalkohol (99:1 bis 98:2), was eine gute Trennung ergibt. Die hellorange Fraktion auffangen, eindampfen, trocknen 0,002 Torr bei 42 °C. Man erhält das Produkt: 376 mg als ein viskoses, hellorangerotes Öl.



AZAFRINYL-10-UNDECENOAT

Charakterisierung: UV/VIS (Et₂O): scharfes Dreibandenspektrum λ_{max} . 374, 394,5, 419 nm.

IR-Spektrum (CH₂Cl₂): Carbonylbande ausgeprägt bei 1723 cm⁻¹

CI-MS : m/z 579 (M⁺ +1 schwach), 395 (M⁺ +1- Undecenylsäure, sehr stark), 561 (M⁺ +1-H₂O), 593 (M⁺ +1-H₂O-H₂O).

-- 29 --

ZUSAMMENSETZUNGSBEISPIELE von *erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren KONZENTRATEN*, welche die Wirkstoffe der Formeln (I) bis (IX) enthalten und welche, wenn sie mit Wasser verdünnt werden, thermodynamisch stabile ULTRAMIKROEMULSIONEN mit einem hydrodynamischen Radius von 1,5 bis 3,0 nm ergeben

a) 0,5 bis 30 Gewichts-% eines oder mehrerer Wirkstoffe der Formeln (I) bis (IX)

0 bis 40 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Miglyol® 812 (Dynamit Nobel)

0 bis 45 Gewichts-% eines Phosphorsäureester-Tensides, wie z.B. Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY), Tensid 508 (CIBA-GEIGY), Zerostat® AN oder AT (CIBA-GEIGY), Tinovetin® JU (CIBA-GEIGY), Soprophor® FL (Rhône-Poulenc)

5 bis 90 Gewichts-% Invadin JFC 800 % (CIBA-GEIGY).

b) 0,001 bis 30 Gewichts-% eines oder mehrerer antitumoraler Wirkstoffe der Formeln (I) bis (IX)

0,001 bis 50 Gewichts-% eines oder mehrerer biotensider Ester der allgemeinen Formel



(XXIV)

worin R_4 Citronellyl, Geranyl, Farnesyl, Phityl oder Isophityl und R_5 eine C_1 - bis C_{32} -A kyl, bzw. C_2 - bis C_{32} -Alkenyl- oder Alkapolyengruppe bedeuten,

0,001 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches

0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins

0 bis 10 Gewichts-% eines Penetrationsverbesserers oder eines Stabilisators und Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

c) 10 Gewichts-% eines öligen antitumoralen Wirkstoffes der Formeln (I) bis (IX)

0 bis 20 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Miglyol® 812 oder eines, bzw. mehrerer der biotensiden Ester der allgemeinen Formel:



(XXIV)

-- 30 --

worin R₄ Citronellyl, Geranyl, Farnesyl, Phytyl oder Isophytyl und R₅ eine C₁- bis C₃₂-A kyl, bzw. C₂- bis C₃₂-Alkenyl- oder Alkapolyengruppe bedeuten,

35 bis 45 Gewichts-% Invadin® JFC 800%

35 bis 45 Gewichts-% Soprophor® FL.

d) 2 bis 5 Gewichts-% eines kristallinen Wirkstoffes der Formeln (I) bis (IX)
10 bis 20 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Miglyol® 812
oder eines, bzw. mehrerer der biotensiden Ester der allgemeinen Formel:



(XXIV)

worin R₄ Citronellyl, Geranyl, Farnesyl, Phytyl oder Isophytyl und R₅ eine C₁- bis C₃₂-A kyl, bzw. C₂- bis C₃₂-Alkenyl- oder Alkapolyengruppe bedeuten,

35 bis 45 Gewichts-% Invadin® JFC 800%

35 bis 45 Gewichts-% Diphasol 3873 oder Soprophor® FL.

BEISPIEL für die pharmazeutische Herstellung eines Systempräparates mit erfindungsgemässen Konzentraten in der Form von "multiple units".

a) Granulierung

Metolose® 90 SH-4000 (Shin-Etsu Chemical)	90.0 g
Avicel® PH-101	80.3 g
Erfindungsgemässes KONZENTRAT	139.4 g
Aerosil® 200	80.3 g
Σ	390.0 g

Granulieren/formen im Schnellmischer oder im Rotationsbett unter Zusatz von 110 g Ethanol, brechen, sieben 18 bis 42 mesh, trocknen 24 h bei 40 °C.

b) MSR- und RETARD-Ausrüstung

im Rotationsbett mit AQOAT® AS-HG (Shin-Etsu Chemical) und Talk

c) Zusammensetzung fertiges Granulat/bzw. Micropellets

Kernmaterial	44 %
Erfindungsgemässes KONZENTRAT	25 %
MSR-Beschichtung	31 %
Σ	100 %

-- 31 --

N.B.: MSR = Magensaft-Resistenz. Die Pellets/Granulate gemäss a) können auch ohne Befilmung unmittelbar in Kapseln abgefüllt werden, welche aus AQOAT® (HPMC-AS-M oder HPMC-AS-N) hergestellt sind, mit Aceton/Ethanol 1:1 verschlossen werden und so die Funktionen der MSR und der verzögerten Abgabe (Retard) angemessen steuern.

-- 32 --

Biologische Prüfungen.

Die antitumorale Wirkung von spontan dispergierbaren Konzentraten mit Wirkstoffen gemäss den Herstellungsbeispielen a) bis d), sowie den Aufarbeitungsbeispielen a) bis d) wird anhand folgender Prüfungsergebnisse bestätigt:

1. In vitro-Tests mit geeigneten Tumorzell-Linien

Es wurde ein biologisches Assay-System entwickelt, das mit Mikrotiterplatten und Verdünnungsreihen arbeitet. Angesetzt werden je 10^4 /ml Tumorzellen in Kulturmedium RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kalbserum inaktiviert (GIBCO); sie werden so undicht ausgesät, dass sie während des Assays wachsen können, in sog. nichtkonfluenten Monolayers. Die Probenzugabe erfolgt nach 6 bis 24 Stunden, mit 100 µl pro Reihe, die man im 1. Loch mit 100 µl Medium versetzt. Davon wird die Hälfte entnommen und in das folgende Loch eingebracht, wieder mit 100 µl Medium versetzt, usf. Es entsteht eine geometrische Verdünnungsreihe $n\frac{1}{2}$.

Die Proben werden im Plaque Assay während 3 bis 5 Tagen bei 37° C mit 3½ % CO₂ inkubiert. Anschliessend färben/fixieren mit 0,1 % Kristallviolett (Fluka, Buchs) in einer Lösung von 70 % Methanol, 1 % Formaldehyd, 29 % Wasser. Die Auswertung wird am Mikroskop vorgenommen, Vergrösserung 300-fach. Man bestimmt die grösste zytotoxische Verdünnung. Die quantitative Auswertung lässt sich auch mittels Scanning und Absorptionsmessung am Spektrophotometer vornehmen.

-- 33 --

ZYTOTOXIZITÄTSTEST**mit Py6-Zellen (Virus transformierten Maus-Fibroblasten)**

**Prüfung eines 2 %-Konzentrates verschiedener Zusammensetzung mit
C 11:1- AZAFRINYLESTER-WIRKSUBSTANZ**

KONZENTRAT	Nach 24 h Zelltoxisch bis:	Nach 48 h Zelltoxisch bis:	Nach 72 h Zelltoxisch bis:
No.1 mit IPM	1 : 800'000	1 : 3'200'000	1 : 6'400'000
No 2 mit C 11:1- CITRONELLYL- ESTER	1 : 800'000	1 : 6'400'000	1 : 6'400'000
No. 3 mit IPM und AOT	1 : 800'000	1 : 3'200'000	1 : 6'400'000
No. 4 mit C 11:1- CITRO und CAA	1 : 1'600'000	1 : 12'800'000	1 : 25'600'000

- No. 1** **2 Gewichts-% Wirksubstanz C 11:1-AZAFRINYLESTER**
 12 Gewichts-% I P M
 86 Gewichts-% Invadin JFC 800%/Soprophor FL, 50:50
- No. 2** **mit 12 Gewichts-% C 11:1-Citronellylester statt IPM, sonst**
 gleiche Zusammensetzung wie No. 1
- No. 3** **mit 86 Gewichts-% Invadin JFC 800%/Soprophor FL/AOT,**
 40:40:20
- No. 4** **mit 12 Gewichts-% C 11:1-Citronellylester statt IPM und**
 mit 86 Gewichts-% Invadin JFC 800%/Soprophor FL/Amphonyl
 CAA 40:40:20

Mikroemulsionen 1:10'000 (100 ppm W.S.), bzw. 6 mg W.S. in 60 ml dest. Wasser

N.B.: AOT (Fluka 86139) = Sulfobernsteinsäure-bis-2-äthyl-hexylester Na-Salz.

-- 34 --

ZYTOTOXIZITÄTSTEST*mit Py6-Zellen (Virus transformierten Maus-Fibroblasten)*

Prüfung verschiedener Konzentrate gleicher Zusammensetzung, aber mit
 unterschiedlichen APOCAROTIN-/AZAFRINYL-Estern
 (auf 2%-Konzentrat berechnet)

PRÄPARAT	48 h In Verdünnung wirksam bis 1 :	72 h In Verdünnung wirksam bis 1 :	96 h In Verdünnung wirksam bis 1 :
8'-APOCAROTIN- 10-UNDECENOAT	160'000	160'000	320'000
C 11:1-AZA- FRINYLESTER	320'000	320'000	640'000

ZYTOTOXIZITÄTSTEST*mit Py6-Zellen (Virus transformierten Maus-Fibroblasten)*

PRÄPARAT	ZELLTOXISCH bis: EXPOSITION 72 h, auf Konzentrat berechnet	ZELLTOXISCH bis: EXPOSITION 72 h auf Wirksubst. berechnet
C30-Stearat	1:160'000	16 Mio.
8'-APOCAROTIN-10- UNDECENOAT	1:640'000	32 Mio.
8'-APOCAROTIN- LAURAT	1:512'000	51 Mio.
8'-APOCAROTIN- PALMITAT	1:128'000	12,8 Mio.
AZAFRINYL-10- UNDECENOAT	1:256'000	25,6 Mio.

-- 35 --

VITALITÄTSTEST
mit humanen Tumorzell-Linien

A

HL 60 promyeolytische LEUKÄMIE**1 x 10⁴ Zellen pro Well****Proliferationstest (Tritium: 1 μ Ci/well H⁺)**

PRÄPARAT	10-5 0,2 ppm W.S.	10-4 2 ppm W.S.	10-3 20 ppm W.S.
8'-APOCAROTIN- 10-UNDECENOAT	11,8 %	3,5 %	3,7 %
C 11:1-AZA- FRINYLESTER	32,4 %	12,7 %	2,7 %

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 2-% MARIGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion (in Verdünnung 1:100'000, 1:10'000, 1:1'000) dem Medium einmal beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Kontrollen: 76'589 cpm.

Test durchgeführt von Dottoressa Anna Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica. 24.-27.1. und 14.-17.2.1994

VITALITÄTSTEST
mit humanen Tumorzell-Linien

B

K 562 LEUKÄMIE**2 x 10⁴ Zellen pro Well****Proliferationstest (Tritium: 1 μ Ci/well H⁺)**

PRÄPARAT	10-5 0,2 ppm W.S.	10-4 2 ppm W.S.	10-3 20 ppm W.S.
8'-APOCAROTIN- 10-UNDECENOAT	28,5 %	1,1 %	0 %
C 11:1-AZA- FRINYLESTER	68,6 %	8,2 %	0 %

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 2-% MARIGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion dem Medium einmalig

-- 36 --

beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Kontrollen: 247'125 cpm.

Tests durchgeführt von Dottoressa Anna Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica.

VITALITÄTSTEST
mit humanen Tumorzell-Linien

C

TOM MELANOM1 x 10⁴ Zellen pro WellProliferationstest (Tritium: 1 μ Ci/well H⁺)2 x 10⁴ Zellen pro Well

PRÄPARAT	10-5 0,2 ppm W.S.	10-4 2 ppm W.S.	10-3 20 ppm W.S.
8'-APOCAROTIN- 10-UNDECENOAT	69,1 %	65,5 %	17,2 %
C 11:1-AZA- FRINYLESTER	57,9 %	56,8 %	9,2 %

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 2-% MARIGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion (in Verdünnung 1:100'000, 1:10'000 und 1:1'000) dem Medium einmalig beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Kontrollen: 57'816 cpm.

Tests durchgeführt von Dottoressa Anna Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica.

-- 37 --

VITALITÄTSTEST
mit humanen Tumorzell-Linien

D

ADK: Humanes pulmonares Adenocarcinom **2 x 10⁴ Zellen pro Well**
Proliferationstest (Tritium: 1 μ Ci/well H⁺)

PRÄPARAT	10 ⁻⁵ 0,2 ppm W.S.	10 ⁻⁴ 2 ppm W.S.	10 ⁻³ 20 ppm W.S.
8'-APOCAROTIN- 10-UNDECENOAT	11.7 %	6.7 %	0 %

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 2-% MARIGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion dem Medium einmalig beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Kontrollen: 57'816 cpm.

Tests durchgeführt von Dottoressa Anna Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica.

VITALITÄTSTEST
mit humanen Tumorzell-Linien

E

HL 60 promyeolytische LEUKÄMIE **2 x 10⁴ Zellen pro Well**
Proliferationstest (Tritium: 1 μ Ci/well H⁺) **cpm = 82'667**

PRÄPARAT (2 %-MARIGENOL®- KONZENTRAT)	10 ⁻⁴ 2 ppm W.S.	10 ⁻³ 20 ppm W.S.
C-30-ALKOHOL	2,3	0,99
C 30-SÄURE	1,7	0,75
C 11:1-8'-APOCAROTINYL- ESTER	1,7	1,5
ZEAXANTHIN-di-UNDE- CENOAT	3,5	1,2
β -CAROTIN	3,2	1,1

-- 38 --

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 2-% MARIGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion dem Medium einmalig beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Kontrollen: 82'667 cpm.

Tests durchgeführt am 7.-10.6.1994 von Dottoressa Anna Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica.

-- 39 --

VITALITÄTSTEST
mit humanen Tumorzell-Linien

F

K 562 Chronische LEUKÄMIE

(Leucemia mieloide cronica, crisi blastica)

2 x 10⁴ Zellen pro WellProliferationstest (Tritium: 1µCi/well H⁺)

cpm = 138'833

PRÄPARAT (2 %-MARIGENOL®- KONZENTRAT)	10 ⁻⁴ 2 ppm W.S.	10 ⁻³ 20 ppm W.S.
C-30-ALKOHOL	37,1	0,7
C 30-SÄURE	18,6	0,5
C 11:1-8'-APOCAROTINYL- ESTER	17,4	0,4
ZEAXANTHIN-di-UNDE- CENOAT	38,6	1,0
β-CAROTIN	18,5	0,6

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 2-% MARIGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion dem Medium einmalig beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Kontrollen: 138'833 cpm.

Tests durchgeführt am 7.-10.6.1994 von Dottoressa Anna Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica.

LANGZEITVERSUCH

Um herauszufinden, ob bei längerer Exposition signifikante Veränderungen an der Tumorzelle - sei es in Richtung Regression oder Redifferenzierung - festzustellen seien, wurde mit Py6-Zellen auch ein Langzeitversuch angestellt, der über 41 Tage geführt wurde. (Experiment vom 24.05.1994 bis zum 29.06.1994). Eingesetzt wurden als Kontrollen nicht transformierte 3T3 Mausfibroblasten, sowie die Polyomavirus-transformierten 3T3 MT 18 Zellen. Als Leitpräparate wurden geprüft: ein 2%-PHYSALIEN-Konzentrat (Zeaxanthin-di-Palmitat) und ein 2 % C11:1-8'-APOCAROTINYLESTER-Konzentrat.

-- 40 --

Einzelheiten zum Prüfprotokoll: Nach der Aussaat ist das Zellwachstum anfänglich langsam. Nach 12 Tagen treten, Dosis-abhängig, viele nekrotische Zellen auf. Auswaschen der Kulturen mit EDTA. Neuzusatz von Medium und wirkstoffhaltiger Mikroemulsion in je 3 verschiedenen Konzentrationen (wie zu Beginn des Versuches) nach 13 und 20 Tagen. Wiedereinsetzen des Zellwachstums bei allen überlebenden Gruppen. Nach 34 Tagen erneutes Auswaschen, sowie Zugabe von frischem Medium und Konzentrat. Abbruch des Versuchs nach 41 Tagen.

Ergebnis: Die morphologischen Unterschiede zwischen den transformierten und den nicht-transformierten Zellen sind im in-vitro Test selbst bei Versuchsende an den überlebenden Populationen immer noch feststellbar. Die transformierten Zellen besitzen längere Filopodien und behalten diese Charakteristik bei.

Analytischer Nachweis

1) Identifikation der APOCAROTIN-ESTER

Kapillarzonen-Elektrophorese mit einem Gerät von Beckman Instruments, bzw. von BIORAD.

Bedingungen: DL- α -Tocopherol 50 mM; Puffer pH = 9,5 Na-tetra-Borat
Run 15 kV, Messung bei 195 nm
Der Wirksubstanz-Peak erscheint nach ca. 4 Minuten.
Auflösung bis 0,5 ppm.

2) Identifikation der Konzentrat-Mizellen in der wässrigen Mikroemulsion/bzw. im Zellplasma der Tumorzellen.

Gleiche Methodik wie 1).

Der charakteristische Peak für die Apocarotin-Ester erscheint nach ca. 8 Minuten; die Verzögerung gegenüber der reinen W.S.-Messung ist eine Folge der Ummantelung der inneren Phase der Konzentrate mit Tensiden. Sie gibt einen wichtigen Hinweis auf das Diffusionsverhalten der Ultramikroemulsion.

3) Nachweis der Membran-Penetration an der Tumorzelle

Am Lichtmikroskop (wie auch am Elektronenmikroskop) lässt sich aufzeigen, dass wenige Stunden nach der Inkubation (Beispiel 3T3 Py6-Zellen der Maus; dünn ausgesät, mittlere Verdünnung der Wirkstoff-Konzentrate) sich ein Kranz von Vakuolen um den Zellkern herum ausbildet.

-- 41 --

4) APOCAROTIN-PALMITAT, n = 13

Orange Kristalle aus t-Butylmethylester/Pentan bei - 20 °C. Smp. 73,5-75,5 °C, nach Sintern ab 70 °C; Wiedererstarren und endgültiger Smp. 87-91 °C. UV/VIS (CH₂Cl₂, quantitativ): $\lambda_{\max}$ sh 410 nm (44'000), 432 nm (59'400) 457 nm (50'800). IR (CHCl₃, Auswahl von Banden); frei von OH-Banden, 1728 cm⁻¹ (vs., Estercarbonyl); ¹H-NMR (CDCl₃), 300 MHz : 0,888 (t, ω -CH₃); 1,038 [CH₃ (16,17)]; 1,264 [(CH₂)₁₆]; 1,725 [CH₃ (18)]; 1,846 [CH₃ (19')]; 1,956 [CH₃ (19,20)]; 2,344 [t, α -CH₂]; 4,565 [s, CH₂(8')]; 6,1 - 6,7 ppm (Vinylprotonen).

5) APOCAROTIN-STEARAT, n = 15

Orange Kristalle aus t-Butylmethylester/Pentan bei - 20 °C. Smp. 80-81 °C, nach Wiedererstarren 80-89 °C; IR (CHCl₃, Auswahl von Banden); frei von OH-Banden, 1728 cm⁻¹ (vs., Estercarbonyl); UV/VIS (CHCl₂), quantitativ): $\lambda_{\max}$ sh 410 nm (61'700), 433 nm (87'900) 458 nm (76'400). ¹H-NMR (CDCl₃), 300 MHz : 0,888 (t, ω -CH₃); 1,039 [CH₃ (16,17)]; 1,264 [(CH₂)₁₆]; 1,726 [CH₃ (18)]; 1,848 [CH₃ (19')]; 1,957 [CH₃ (20')]; 1,982 [CH₃ (19,20)]; 2,345 [t, ω -CH₂]; 4,566 [s, CH₂(8')]; 6,1 - 6,7 ppm (Vinylprotonen).

B. DATEN zu AZAFRINOL und AZAFRINYL-ESTERN**1) Eigenschaften von Azafrinol:**

Smp. 133-134 °C (Vakuumröhrchen). Verbrennungsanalyse für C₂₇H₄₀O₃ (412,6): Ber. C 78,59 H 9,77 % ; gefunden C 78,30 H 9,56 %. UV/VIS (EtOH, log ϵ): 432,4 (4,514), 375,2 (4,805), 396,0 (5,011), 420,0 (5,005);

$$[\alpha]_{\frac{20}{D}} = 85,1^{\circ} \quad (c = 21,80 \text{ mg in } 2,00 \text{ ml EtOH});$$

CD ((EtOH, c = 1,192 · 10⁻⁵ M, $\Delta\epsilon$, Hauptbanden) : 237,2 (-2,5), 370,4 (-1,4), 386,0 (-1,2), 420,4 (-1,6). IR (KBr): sehr breite OH-Banden um 3450 cm⁻¹, keine Banden im Carbonylbereich; IR (CH₂Cl₂): 3600 cm⁻¹, keine Carbonylbanden;

CI-MS (NH₃): 413 [M+1 (13)], 396 [M+2-H₂O (30)], 395 [M+1-18 (100)].

2) Eigenschaften von AZAFRINYL-ESTERN**2.1) AZAFRINYL-10-UNDECENOAT**

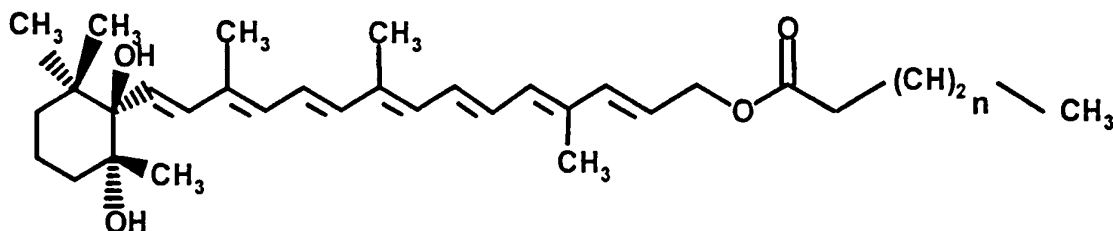
UV/VIS (Et₂O, qual.): scharfes Dreibandenspektrum mit $\lambda_{\max}$ 375, 394,5, 419 nm; (Benzol qual.): 377, 402, 428 nm. IR (CH₂Cl₂, Auswahl von Banden): 2,78

-- 42 --

μ , (= OH-frei), ca. 2,9 μ = OH intermolekular gebunden), 5,8 μ (1723 cm^{-1}), vs. Estercarbonyl; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), 300 MHz. Auswahl von Banden): für den Azafrinolteil*): 0,85, ($\text{CH}_3(16)$); 1,15 ($\text{CH}_3(17)$); 1,19 ($\text{CH}_3(18)$); 1,91 ($\text{CH}_3(20')$); 1,98 ($\text{CH}_3(19,20)$); für den Säureteil: 1,30 ($(\text{CH}_2)_7$); 2,33 (t, α - CH_2); 4,9 (m, ω - CH_2); 5,8 (m, ψ -CH).

*) Neuere NMR-Spektren von Azafrin und Derivaten, vgl. P. Uebelhart und C.H. Eugster, *Helv.Chim.Acta* 1982, 65, 353.

2.2) Andere Ester:



$n = 9$; $n = 13$; $n = 15$, bzw.

Azafrinyl-Laurat	UV/VIS 376, 402, 428 nm,
Azafrinyl-Palmitat	UV/VIS 372, 402, 428 nm
Azafrinyl-Oleat	UV/VIS 379, 402, 428 nm.

C) Chromatographische Identifikation der APOCAROTIN-ESTER

Kapillarzonen-Elektrophorese mit einem Gerät von Beckman Instruments, bzw. von BIORAD.

Bedingungen: DL- α -Tocopherol 50 mM; Puffer pH = 9,5 Na-tetra-Borat
Run 15 kV, Messung bei 195 nm
Der Wirksubstanz-Peak erscheint nach ca. 4 Minuten.
Auflösung bis 0,5 ppm.

D) Chromatographische Identifikation der Konzentrat-Mizellen in der wässrigen Mikroemulsion/bzw. im Zellplasma der Tumorzellen.

Gleiche Methodik wie C).

Der charakteristische Peak für die Apocarotin-Ester erscheint nach ca. 8 Minuten; die Verzögerung gegenüber der reinen W.S.-Messung ist eine Folge der Ummantelung der inneren Phase der Konzentrate mit Tensiden. Sie gibt einen wichtigen Hinweis auf das Diffusionsverhalten der Ultra-mikroemulsion.

-- 43 --

E) Nachweis der Membran-Penetration an der Tumorzelle

Am Lichtmikroskop (wie auch am Elektronenmikroskop) lässt sich aufzeigen, dass wenige Stunden nach der Inkubation (Beispiel 3T3 Py6-Zellen der Maus, d.h. transformierte Fibroblasten; dünn ausgesät, mittlere Verdünnung der Wirkstoff-Konzentrate) sich ein Kranz von Vakuolen um den Zellkern herum ausbildet.

Der analytische Nachweis, dass diese Vakuolen die Apocarotinester-Wirksamstoffe enthalten, kann sehr deutlich dadurch erbracht werden, dass man den gereinigten inkubierten Tumorzellen das Zellplasma entnimmt, es zentrifugiert und mit einer 0,05 %-Lösung von Uvitex® CF conc. (CIBA-GEIGY) in Aceton/Wasser (85:15) oder von Uvitex® EBF (CIBA-GEIGY) oder von Tinopal® GS (CIBA-GEIGY) versetzt.

Die eingesetzten erfindungsgetreuen Apocarotinester löschen die durch den Marker Uvitex CF conc., bzw. Uvitex EBF, bzw. Tinopal GS hervorgerufene Fluoreszenz im langwelligen UV-Lichtbereich aus; auf der Dünnschicht-Platte entsteht eine blaue Färbung. UV-Scanning bei 366 nm. Kontrolle mithilfe von mizellarer Kapillar-Zonen-Electrophorese, (Beckman Instruments, P/ACE System 2100).

-- 44 --

AUSWIRKUNG auf das BLUTBILD
(Verträglichkeit der MARIGENOL®-PRÄPARATE)

TOXIZITÄT von MARIGENOL®-KONZENTRATEN
an der BALB/c-Maus

%-Anteil der Blutkörperchen

Präparat		L	M	N	E	B
G 17	10 ⁻⁷	70 ± 6	11 ± 3	13 ± 4	6 ± 4	0
	10 ⁻⁵	77 ± 6	6 ± 3	11 ± 4	5 ± 4	1 ± 1
	10 ⁻³	69 ± 10	7 ± 5	22 ± 8	2 ± 2	0
G 41	10 ⁻⁷	77 ± 6	6 ± 3	13 ± 5	3 ± 3	0
	10 ⁻⁵	78 ± 4	10 ± 2	10 ± 4	1 ± 1	1 ± 1
	10 ⁻³	80 ± 6	8 ± 2	10 ± 6	12 ± 1	0
G 44	10 ⁻⁷	74 ± 17	10 ± 1	20 ± 9	1 ± 1	0
	10 ⁻⁵	74 ± 6	9 ± 4	14 ± 7	4 ± 3	0
	10 ⁻³	76 ± 5	6 ± 4	16 ± 8	2 ± 1	0
G 55	10 ⁻⁷	78 ± 4	10 ± 4	10 ± 4	2 ± 1	0
	10 ⁻⁵	69 ± 10	11 ± 3	18 ± 4	1 ± 1	0
	10 ⁻³	77 ± 5	6 ± 4	14 ± 2	2 ± 1	1 ± 1
KONTROLLEN (Phys.Puffer)		76 ± 5	8 ± 2	15 ± 4	1 ± 1	0

G 17 2 %-Konzentrat mit C 5:0-iso-CHOLESTERYLESTER
(Cholesteryl-iso-Valerat)

G 41 2 %-Konzentrat mit C 11:1-ERGOSTERYLESTER
(Ergosteryl-10-Undecenoat)

G 44 2 %-Konzentrat mit C 18:2-CHOLECALCIFERYLESTER
(C 18:2-D₃ ; Vitamin-D₃-Linolat)

G 55 2 %-Konzentrat mit C 4:1-CHOLECALCIFERYLESTER
(C 4:1-D₃ ; Vitamin-D₃-Crotonat)

Verdünnungen: 10⁻⁷ = 0,1 ppm Konzentrat; 0,002 ppm Wirksubstanz
 10⁻⁵ = 10 ppm Konzentrat; 0,200 ppm Wirksubstanz
 10⁻³ = 1'000 ppm Konzentrat; 20,000 ppm Wirksubstanz
 (auf die wässrige Mikroemulsion berechnet)

-- 45 --

Legende:**L = Lymphocyten****M = Monocyten (Makrophagen)****N = Neutrophile Granulocyten****E = Eosinophile Granulocyten****B = Basophile Granulocyten**

Durchführung der Proben: Prof. Dott. Guido FORNI, Dott^a Stefania VAI, Università di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Ospedale San Luigi Gonzaga, I-10'043 ORBASSANO (TO), August/September 1993.

Test mit normalen 8-wöchigen weiblichen BALB/c nAncr (H-2d)-Mäusen, geliefert von Charles River Laboratories, Calco (Italien). Während 4 Wochen täglich zweimalige Injektion i.v. von je 0,250 ml wässriger Mikroemulsion, gebildet aus den angegebenen Konzentraten, bzw. mit physiologischem Puffer für die Kontrollen. Färbung mit May Grünwald-Giemsa.

Zeit der Behandlung: 28 Tg.

Blutanalyse nach der letzten Injektion

Anzahl Tiere: 13 Gruppen zu 5 je Tieren

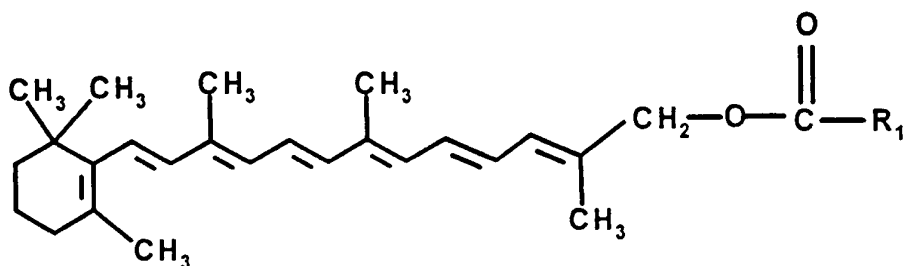
RESULTAT: *Es treten keine signifikanten Unterschiede auf zu den Kontrollen. Es konnte keine Toxizität der Konzentrate auf die Leukozyten-Population festgestellt werden. Auch die Erythrozyten-Population zeigte normale Werte. Alle Tiere waren und blieben gesund bis zum Schluss der Versuche.*

-- 46 --

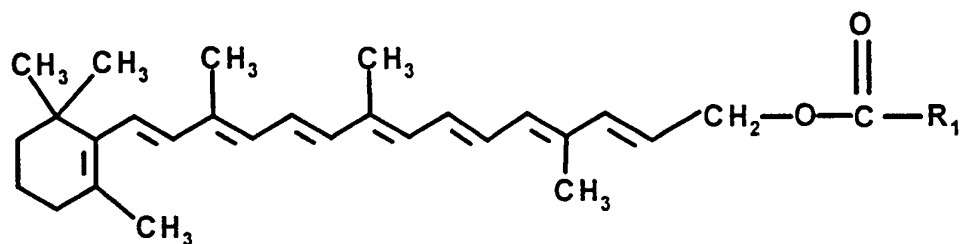
PATENTANSPRÜCHE

1) Spontan dispergierbare Konzentrate, welche mit Wasser oder 5%-Glucoselösung verdünnt, thermodynamisch stabile Ultramikroemulsionen ergeben mit Mizellen, die einen hydrodynamischen Radius von 1,5 bis 3 nm aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Komponenten zu einem System zusammengefügt sind:

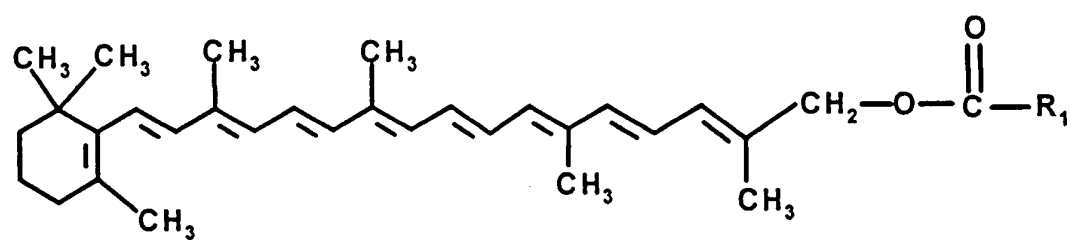
0,001 bis 30 Gewichts-% einzelner Ester mit Apocarotinolen der Formeln (I) bis (IX), bzw. eine Kombination solcher Ester



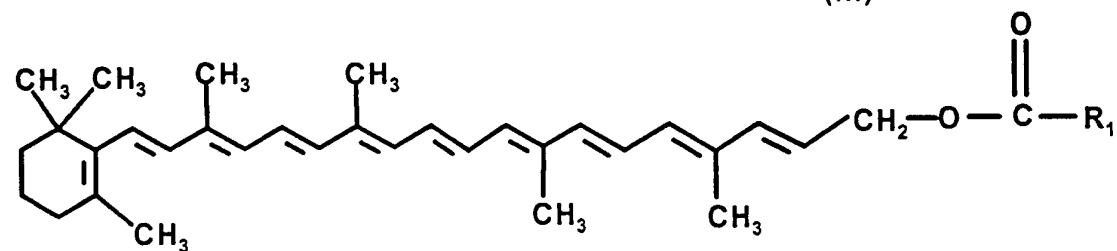
(I)



(II)

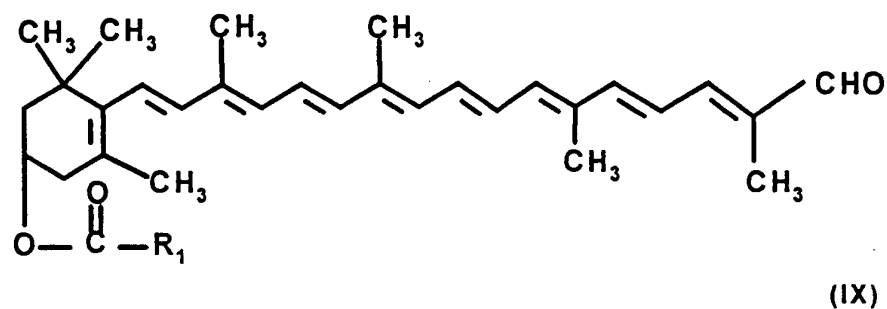
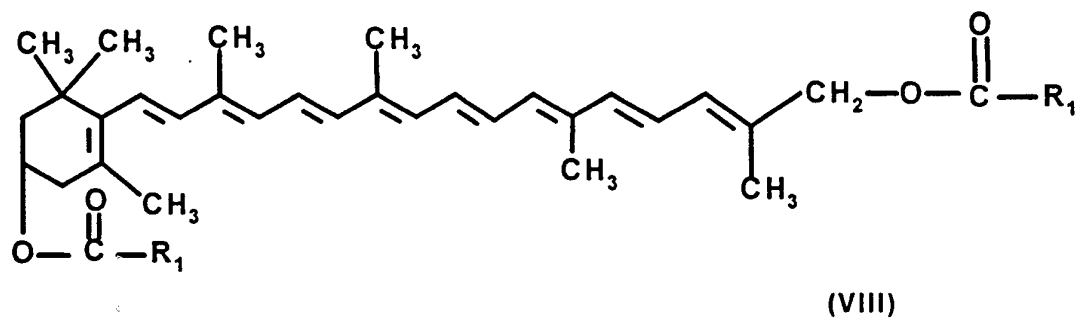
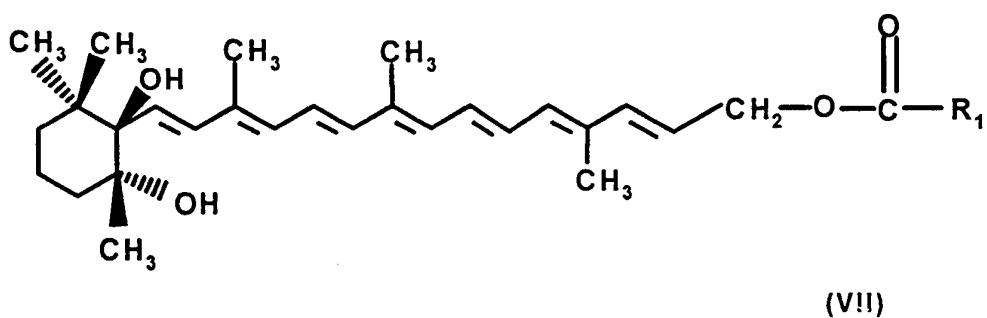
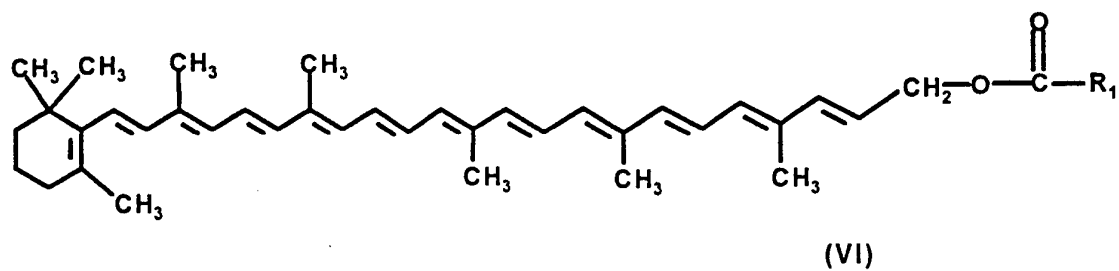
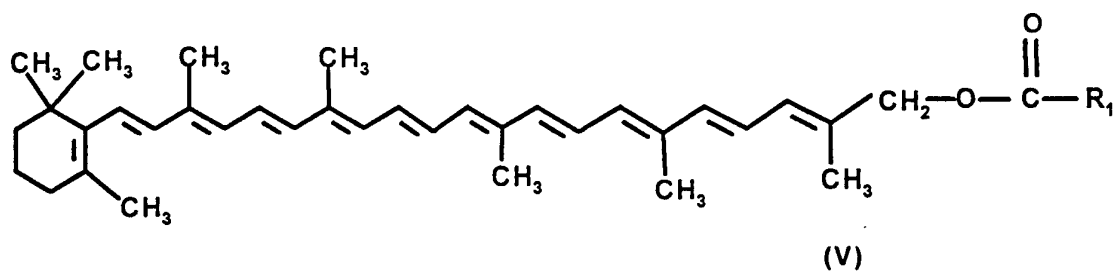


(III)



(IV)

-- 47 --



0 bis 40 Gewichts-% eines als Hydrotrop oder Co-Emulgator dienenden pharmazeutisch verträglichen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches,

-- 48 --

0,001 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches,

0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,

0 bis 10 Gewichts-% eines Stabilisators oder eines Penetrationsverbessers und Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

2) Spontan dispergierbares Konzentrat, enthaltend Apocarotinylder der Formeln (I) bis (IX) gemäss Anspruch 1, zur Verwendung als Arzneimittel mit Wirksamkeit gegen Tumore, Psoriasis und Ekzeme.

3) Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Komponenten zusammengefügt sind:

0,5 bis 30 Gewichts-% eines oder mehrerer Wirkstoffe der Formeln (I) bis (IX),

1 bis 40 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Oleum neutrale,

0 bis 45 Gewichts-% eines Phosphorsäureester-Tensides,

5 bis 90 Gewichts-% des wasserfreien Octylphenylpolyoxyäthylenäther-Tensids mit 9 bis 10 Oxyäthylengruppen.

4) Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Komponenten zusammengefügt sind:

0,5 bis 30 Gewichts-% eines oder mehrerer Wirkstoffe der Formeln (I) bis (IX),

1 bis 40 Gewichts-% eines oder mehrerer biotensider Ester der allgemeinen Formel (XXIV),



(XXIV)

worin R_4 Citronellyl, Geranyl, Farnesyl, Phytyl oder Isophytyl und R_5 eine C_1 - bis C_{32} -Aky, bzw. C_2 - bis C_{32} -Alkenyl- oder Alkapolyengruppe bedeuten,

5 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches,

0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,

0 bis 10 Gewichts-% eines Stabilisators oder eines Penetrationsverbessers und Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

-- 49 --

5) Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Komponenten zu einem Systempräparat zusammengefügt sind:

10 Gewichts-% eines öligen Wirkstoffes der Formeln (I) bis (IX),

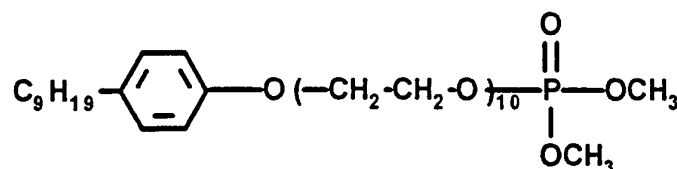
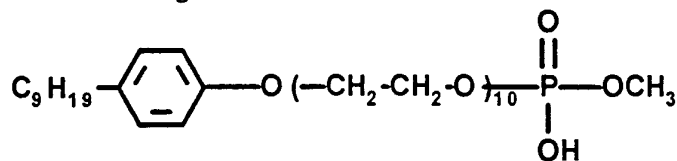
0 bis 20 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, Oleum neutrale oder eines/bzw. mehrerer biotensider Ester der allgemeinen Formel (XXIV)



worin R_4 Citronellyl, Geranyl, Farnesyl, Phytyl oder Isophytyl und R_5 eine C_1 - bis C_{32} -Aky, bzw. C_2 - bis C_{32} -Alkenyl- oder Alkapolyengruppe bedeuten,

35 bis 45 Gewichts-% des wasserfreien Octylphenylpolyoxyäthylenäther-Tensids mit 9 bis 10 Oxyäthylengruppen,

35 bis 45 Gewichts-% des Mischemulgators, bestehend aus je 50 % der beiden Verbindungen mit Formeln:



oder des Tristyrylphenolpolyoxyäthylen-18-mono/dimethyl-phosphorsäure-ester Tensids.

6) Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Komponenten zu einem Systempräparat zusammengefügt sind:

2 bis 5 Gewichts-% eines kristallinen Wirkstoffes der Formeln (I) bis (IX),

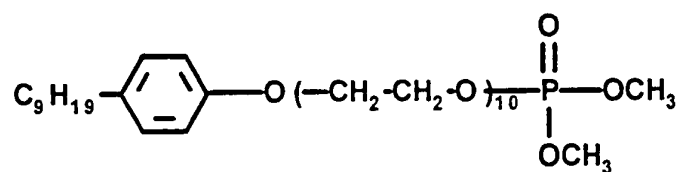
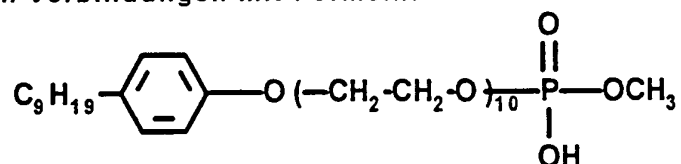
10 bis 20 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, Neutralöl oder eines/bzw. mehrerer biotensider Ester der allgemeinen Formel (XXIV)



worin R_4 Citronellyl, Geranyl, Farnesyl, Phytyl oder Isophytyl und R_5 eine C_1 - bis C_{32} -Aky, bzw. C_2 - bis C_{32} -Alkenyl- oder Alkapolyengruppe bedeuten,

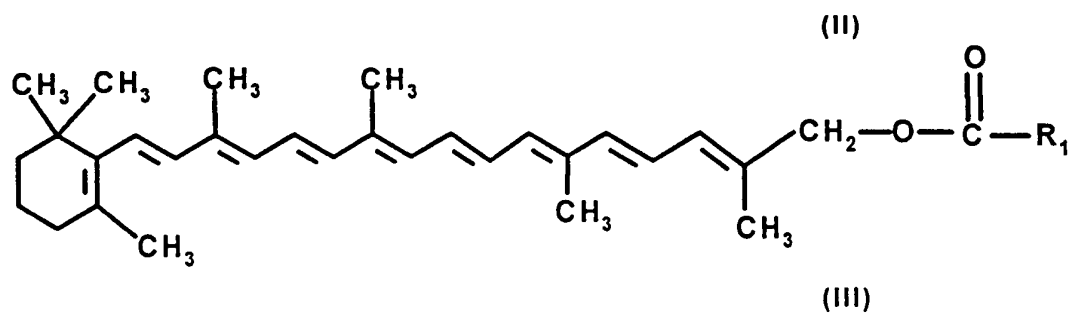
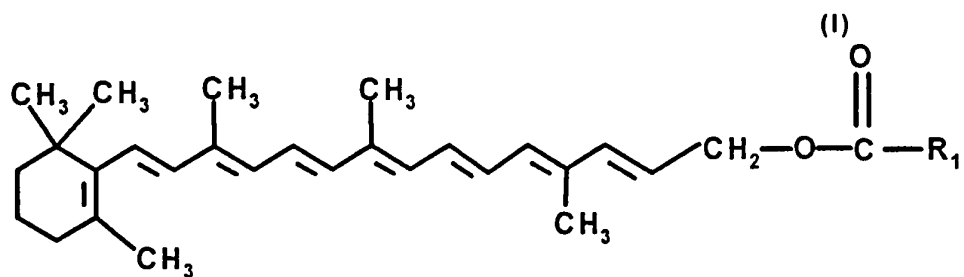
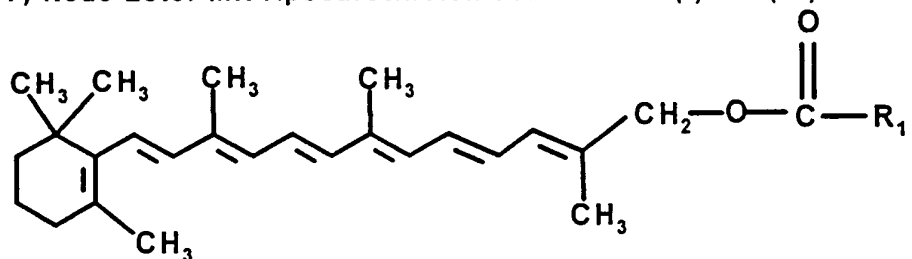
35 bis 45 Gewichts-% des wasserfreien Octylphenylpolyoxyäthylenäther-Tensids mit 9 bis 10 Oxyäthylengruppen,

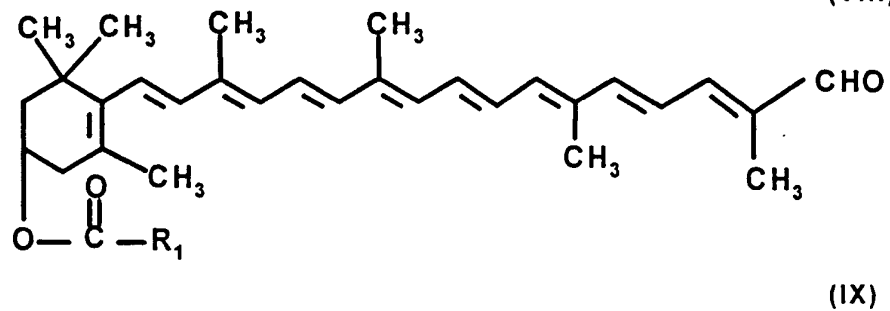
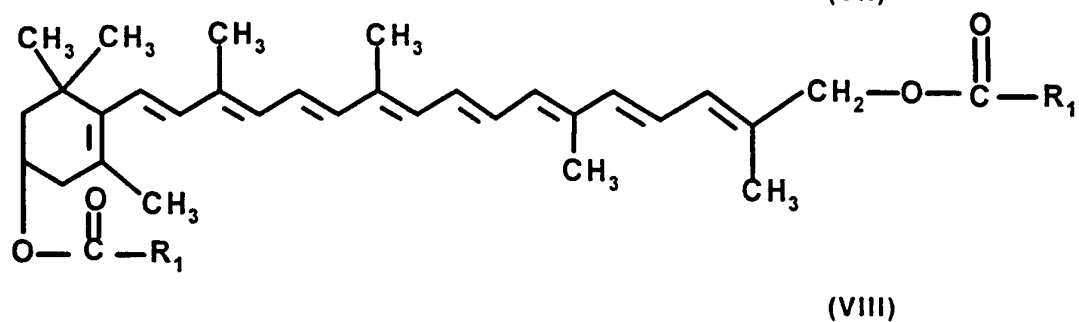
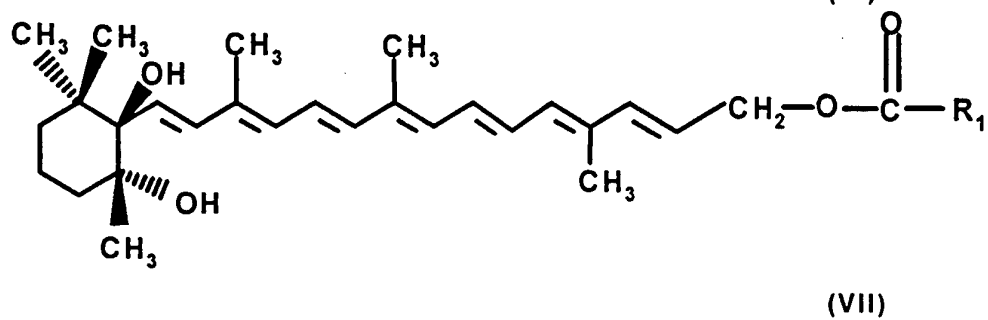
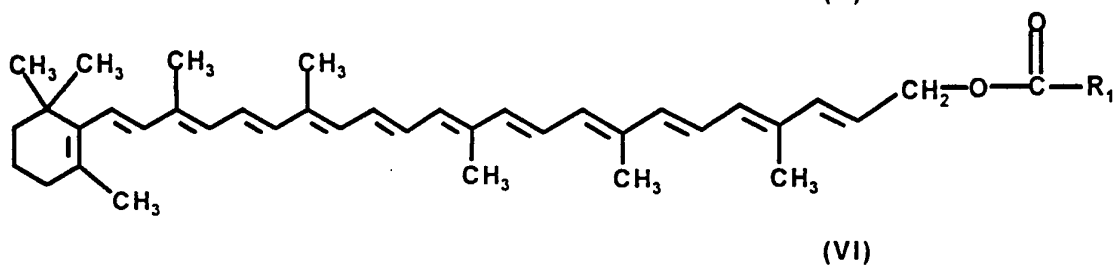
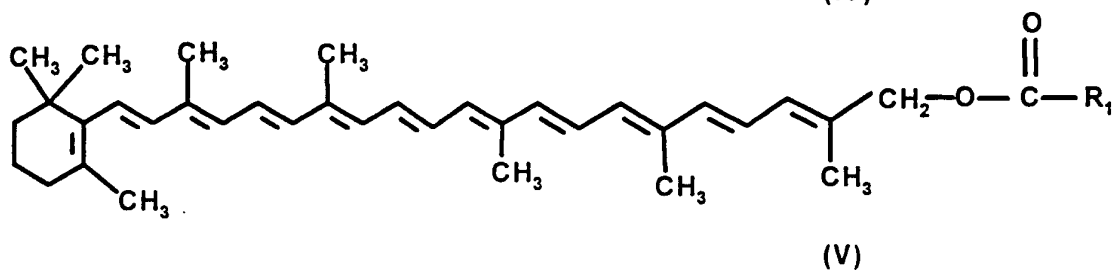
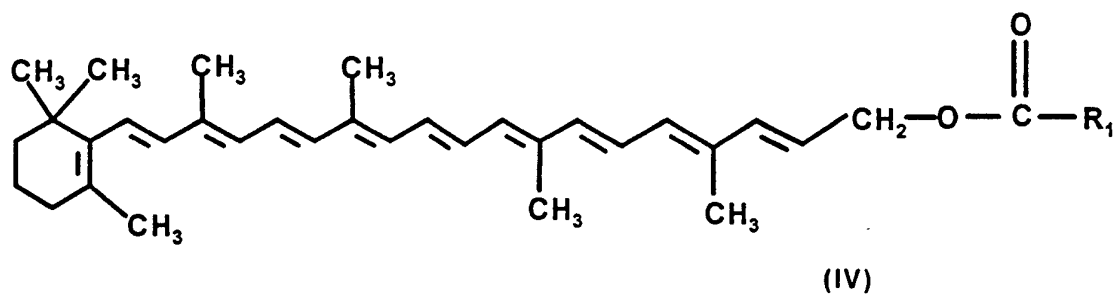
35 bis 45 Gewichts-% des Mischemulgators, bestehend aus je 50 % der beiden Verbindungen mit Formeln:



oder des Tristyrylphenolpolyoxyäthylen-18-mono/dimethyl-phosphorsäure-
ester Tensids.

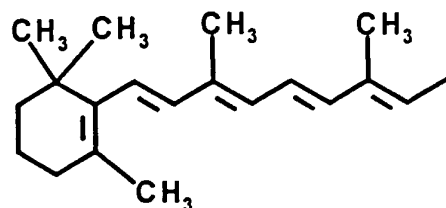
7) Neue Ester mit Apocarotinolen der Formeln (I) bis (IX)





-- 52 --

worin R_1 für eine C_4 - bis C_{18} -Alkyl-, eine C_2 - bis C_{18} -Alkenyl-, bzw. Alkapolyen-, eine C_2 - bis C_{18} -Alkynylgruppe oder für ein Radikal der Formel (XII)

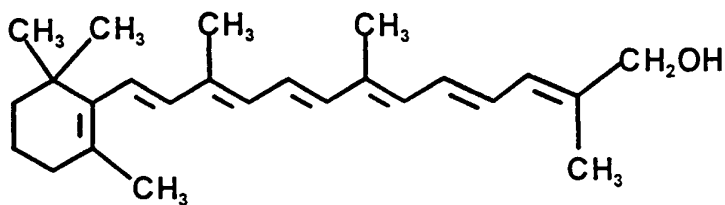


(XII)

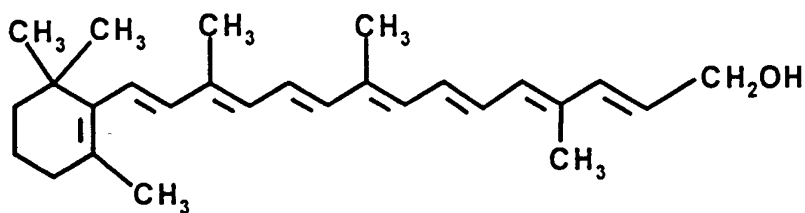
steht.

8) Das β -Apo-8'-carotiny-10-undecenoat, β -Apo-8'-carotiny-laurat, β -Apo-8'-carotiny-palmitat, β -Apo-8'-carotiny-stearat, sowie das Azafriny-10-undecenoat, Azafriny-laurat, Azafriny-palmitat und das Azafriny-stearat gemäss Anspruch 7.

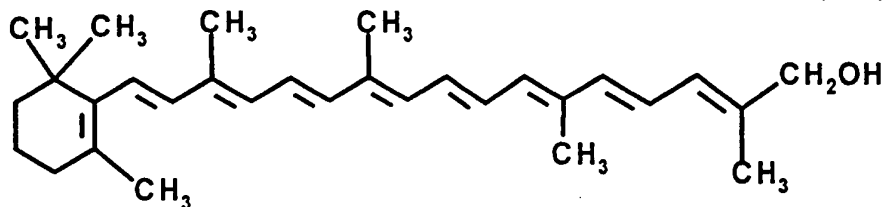
9) Verfahren zur Herstellung von Estern mit Apocarotinolen gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Apocarotin der Formeln (XV) bis (XXXIII) :



(XV)

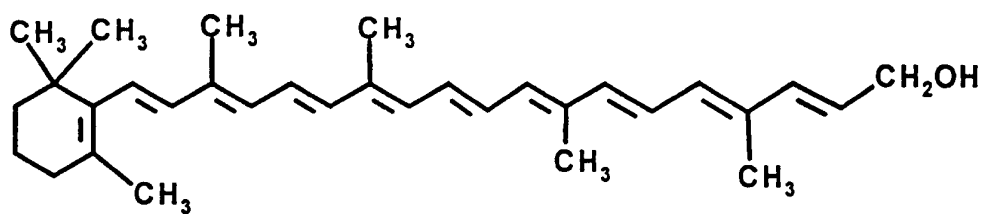


(XVI)

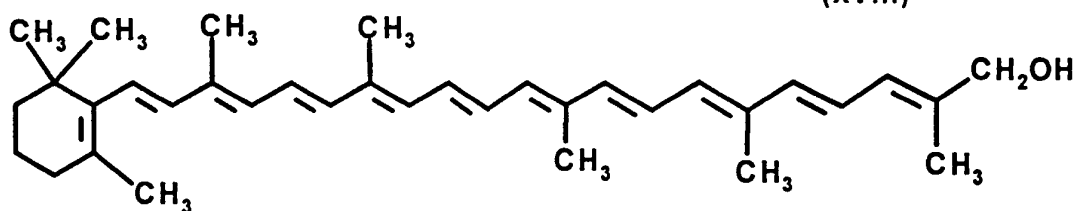


(XVII)

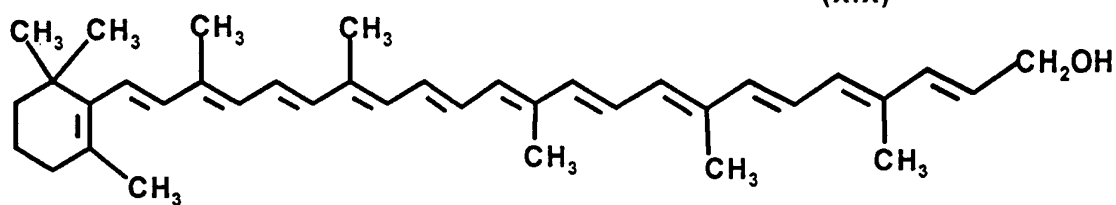
-- 53 --



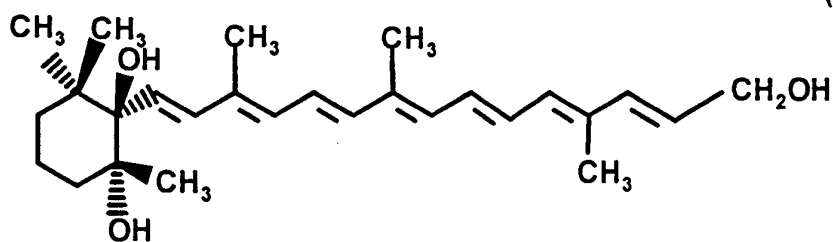
(XVIII)



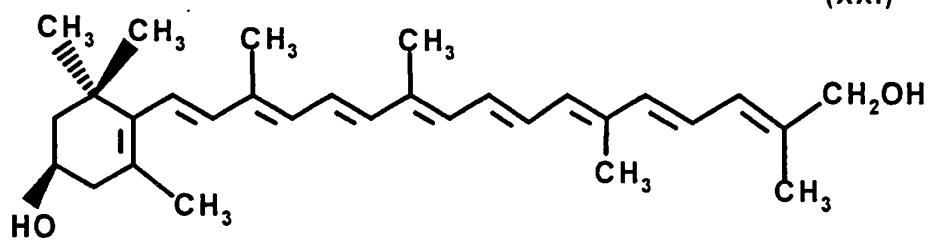
(XIX)



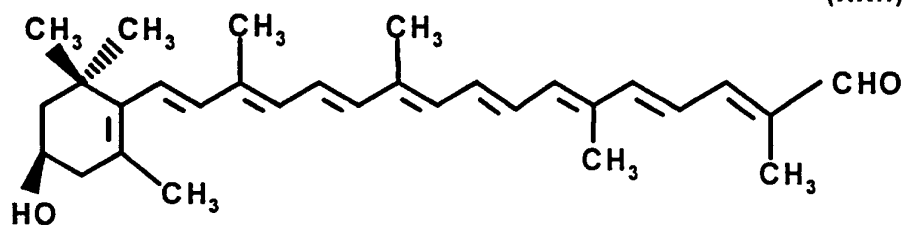
(XX)



(XXI)

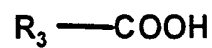


(XXII)



(XXIII)

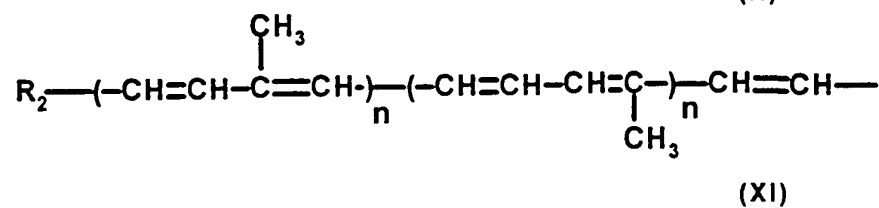
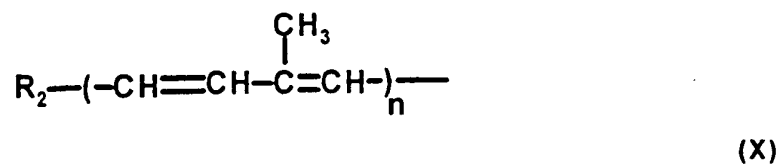
mit dem Chlorid, bzw. Bromid einer Säure der Formel (XIV)



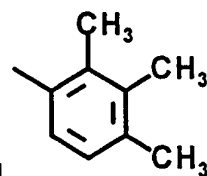
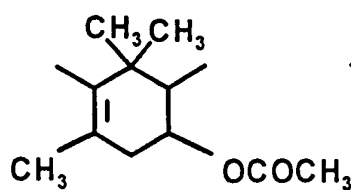
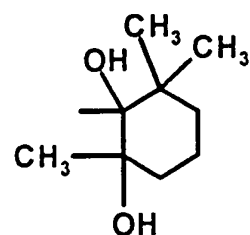
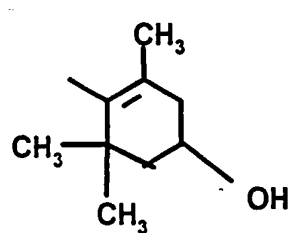
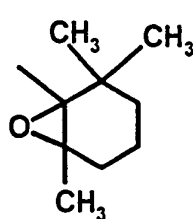
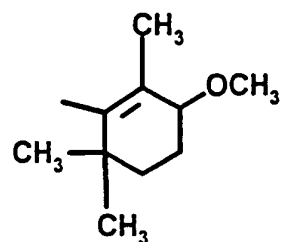
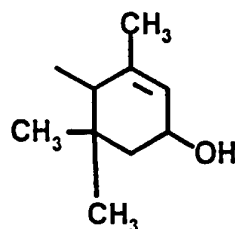
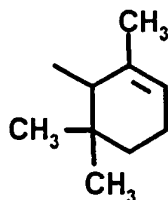
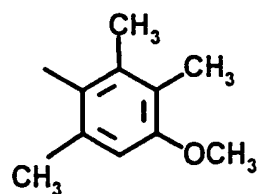
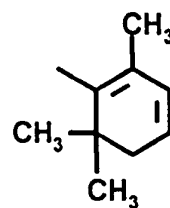
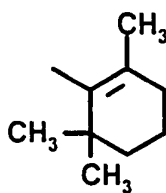
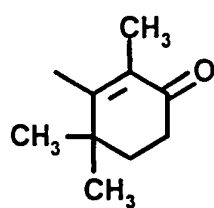
(XIV)

-- 54 --

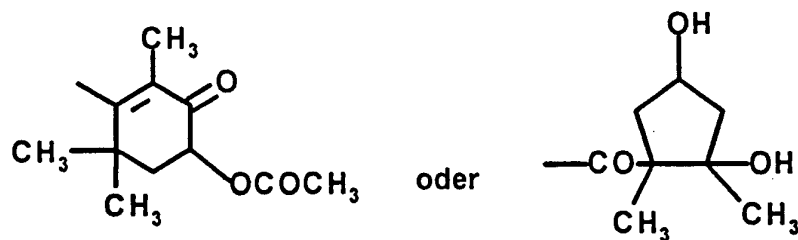
wobei R₃ für eine C₁- bis C₃₂-Alkyl-, eine C₂- bis C₃₂-Alkenyl-, bzw. Alkapolyen-, eine C₂- bis C₃₂-Alkynylgruppe oder für ein Radikal der Formeln (X) oder (XI) steht



worin n die Zahlen 1, 2, 3, 4 oder 5 bezeichnet und R₂ eines der Radikale der Formeln



-- 55 --



wiedergibt, bei einer Temperatur von 0 bis 60 °C unter Schutzgaszuleitung in einem indifferenten Lösungsmittel und in Gegenwart eines Katalysatoren umgesetzt.

10) Verfahren zur Herstellung von β -Apo-8'-carotinylestern, dadurch gekennzeichnet, dass man den 8'-Apo- β -carotin-8'-säuremethylester bei -30 °C mit DIBAH (Diisobutylaluminiumhydrid) reduziert, um den C₃₀-Alkohol als Zwischenstufe zu gewinnen, der sodann mit einem aliphatischen Säurechlorid in Et₂O und Pyridin bei - 30 °C and anschliessend bei Raumtemperatur verestert wird.

11) Verfahren zur Herstellung von Azafrinylestern, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst Azafrinol aus Azafrinmethylester mittels DIBAH-Reaktion herstellt und diese Verbindung unmittelbar anschliessend mit einem aliphatischen Säurechlorid in Et₂O und Pyridin bei - 30 °C and anschliessend bei Raumtemperatur verestert.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CH 94/00234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/015 A61K9/107 A61K47/00 A61K47/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol.41, no.5, 5 March 1976 pages 891 - 892 I. STELLERT ET AL. 'Isolation and Identification of beta-Citraurol, a C-30 Carotenoid in Citrus' see page 891, Formulae 2a, 2c see page 891, right-hand column, line 1 --- -/--	7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 1995

Date of mailing of the international search report

28.03.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/CH 94/00234

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 7, 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 56052, see abstract & J. AGRIC. FOOD CHEM., vol.37, no.1, 1989 pages 90 - 95 T. PHILIP ET AL. 'DETECTION OF ADULTERATION OF CALIFORNIA ORANGE JUICE CONCENTRATES WITH EXTERNALLY ADDED CAROTENOIDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, no. 23, 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 209718, see abstract & J. CHROMATOGR., vol.442, 1988 pages 249 - 265 T. PHILIP ET AL. 'LIQUID CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF MAJOR CAROTENOID ESTERS IN COMMERCIALY PROCESSED CALIFORNIA NAVEL AND VALENCIA ORANGE JUICE CONCENTRATES' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 15, 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 127844, see abstract & J. CHROMATOGR., vol.435, no.1, 1988 pages 113 - 126 T. PHILIP ET AL. 'SEPARATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF SOME CAROTENOID FATTY ACID ESTERS OF FRUITS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 1, 6 January 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2944, see abstract & J. FOOD SCIENCE, vol.38, no.6, 1973 pages 1032 - 1034 T. PHILIP 'NATURE OF CAROTENOID ESTERIFICATION IN TANGERINES' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 79, no. 25, 1973, Columbus, Ohio, US; abstract no. 145012, see abstract & J. AGR. FOOD CHEM., vol.21, no.6, 1973 pages 963 - 964 T. PHILIP 'NATURE OF XANTHOPHYLL ESTERIFICATION IN GRAPEFRUIT' ---	7
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Jnal Application No

PCT/CH 94/00234

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 467 795 (PATRINOVE-TEXINFINE) 22 January 1992 see claims see column 6, line 24 - line 48 ---	1-6
Y	FR,A,2 345 087 (UNILEVER N.V.) 21 October 1977 see claims 1,6,7,13-16 see page 3, line 25 - line 26 ---	1-6
Y	FR,A,2 221 499 (F. HOFFMANN-LA ROCHE &CIE.) 11 October 1974 see claims 7-9 see page 1, line 5 - line 7 see page 1, line 31 - line 34 ---	1-6
Y	FR,A,2 187 291 (QUATRAR) 18 January 1974 see claims 1-4,8,10,11,17,18 see page 1, line 20 - line 22 ---	1-6
Y	FR,A,1 581 390 (BADISCHE ANILIN- & SODA-FABRIK AKTIENGESELLSCHAFT) 12 September 1969 see claims see page 1, line 9 - line 12 ---	1-6
Y	US,A,3 316 101 (B. BORENSTEIN ET AL.) 25 April 1967 see claims 1-3,6,12,13 see column 1, line 64 - line 67 ---	1-6
Y	DATABASE WPI Week 8336, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 83-756026 (36) see abstract & JP,A,58 128 141 (SUMITOMO CHEMICAL KK) 30 July 1983 ---	1-6
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 7, 1994, Columbus, Ohio, US; abstract no. 81220, see abstract & J. PLANT PHYSIOL., vol.143, no.4-5, 1994 page 520-525 P.A.BIACS ET AL. 'HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PHOTODIODE-ARRAY DETECTION OF CAROTENOIDS AND CAROTENOID ESTERS IN FRUITS AND VEGETABLES' ---	7
P,Y	CH,A,683 426 (MARIGEN S.A.) 15 March 1994 see the whole document -----	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH 94/00234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0467795	22-01-92	FR-A- 2664164 AU-A- 8021891 JP-A- 5025036	10-01-92 09-01-92 02-02-93
FR-A-2345087	21-10-77	GB-A- 1581744 AT-B- 374344 CA-A- 1083960 CH-A- 627350 DE-A, C 2711486 JP-C- 1366342 JP-A- 52117449 JP-B- 61027028 NL-A- 7703074 SE-B- 428520 SE-A- 7703227 US-A- 4141994	17-12-80 10-04-84 19-08-80 15-01-82 06-10-77 26-02-87 01-10-77 23-06-86 26-09-77 11-07-83 23-09-77 27-02-79
FR-A-2221499	11-10-74	US-A- 3886294 CH-A- 585525 DE-A- 2411529 GB-A- 1407779 JP-A- 49126727	27-05-75 15-03-77 26-09-74 24-09-75 04-12-74
FR-A-2187291	18-01-74	BE-A- 805242	25-03-74
FR-A-1581390	12-09-69	CH-A- 523024	31-05-72
US-A-3316101	25-04-67	NONE	
JP-A-58128141	30-07-83	NONE	
CH-A-683426	15-03-94	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 94/00234

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K31/015 A61K9/107 A61K47/00 A61K47/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd.41, Nr.5, 5. März 1976 Seiten 891 - 892 I.STEWART ET AL. 'Isolation and Identification of beta-Citraurol , a C-30 Carotenoid in Citrus' siehe Seite 891,Formeln 2a,2c siehe Seite 891,rechte Spalte,Zeile 1 --- -/--	7

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. März 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28.03.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scarponi, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 7, 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 56052, siehe Zusammenfassung & J. AGRIC. FOOD CHEM., Bd.37, Nr.1, 1989 Seiten 90 - 95 T. PHILIP ET AL. 'DETECTION OF ADULTERATION OF CALIFORNIA ORANGE JUICE CONCENTRATES WITH EXTERNALLY ADDED CAROTENOIDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, no. 23, 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 209718, siehe Zusammenfassung & J. CHROMATOGR., Bd.442, 1988 Seiten 249 - 265 T. PHILIP ET AL. 'LIQUID CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF MAJOR CAROTENOID ESTERS IN COMMERCIALY PROCESSED CALIFORNIA NAVEL AND VALENCIA ORANGE JUICE CONCENTRATES' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 15, 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 127844, siehe Zusammenfassung & J. CHROMATOGR., Bd.435, Nr.1, 1988 Seiten 113 - 126 T. PHILIP ET AL. 'SEPARATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF SOME CAROTENOID FATTY ACID ESTERS OF FRUITS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 1, 6. Januar 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2944, siehe Zusammenfassung & J. FOOD SCIENCE, Bd.38, Nr.6, 1973 Seiten 1032 - 1034 T. PHILIP 'NATURE OF CAROTENOID ESTERIFICATION IN TANGERINES' ---	7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 79, no. 25, 1973, Columbus, Ohio, US; abstract no. 145012, siehe Zusammenfassung & J. AGR. FOOD CHEM., Bd.21, Nr.6, 1973 Seiten 963 - 964 T. PHILIP 'NATURE OF XANTHOPHYLL ESTERIFICATION IN GRAPEFRUIT' ---	7
	--- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
1	Y EP,A,0 467 795 (PATRINOVE-TEXINFINE) 22. Januar 1992 siehe Ansprüche siehe Spalte 6, Zeile 24 - Zeile 48 ---	1-6
5	Y FR,A,2 345 087 (UNILEVER N.V.) 21. Oktober 1977 siehe Ansprüche 1,6,7,13-16 siehe Seite 3, Zeile 25 - Zeile 26 ---	1-6
5	Y FR,A,2 221 499 (F. HOFFMANN-LA ROCHE &CIE.) 11. Oktober 1974 siehe Ansprüche 7-9 siehe Seite 1, Zeile 5 - Zeile 7 siehe Seite 1, Zeile 31 - Zeile 34 ---	1-6
3	Y FR,A,2 187 291 (QUATRAR) 18. Januar 1974 siehe Ansprüche 1-4,8,10,11,17,18 siehe Seite 1, Zeile 20 - Zeile 22 ---	1-6
5	Y FR,A,1 581 390 (BADISCHE ANILIN- & SODA-FABRIK AKTIENGESELLSCHAFT) 12. September 1969 siehe Ansprüche siehe Seite 1, Zeile 9 - Zeile 12 ---	1-6
5	Y US,A,3 316 101 (B. BORENSTEIN ET AL.) 25. April 1967 siehe Ansprüche 1-3,6,12,13 siehe Spalte 1, Zeile 64 - Zeile 67 ---	1-6
5	Y DATABASE WPI Week 8336, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 83-756026 (36) siehe Zusammenfassung & JP,A,58 128 141 (SUMITOMO CHEMICAL KK) 30. Juli 1983 ---	1-6
8	P,X CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 7, 1994, Columbus, Ohio, US; abstract no. 81220, siehe Zusammenfassung & J. PLANT PHYSIOL., Bd.143, Nr.4-5, 1994 Seite 520-525 P.A.BIACS ET AL. 'HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PHOTODIODE-ARRAY DETECTION OF CAROTENOIDS AND CAROTENOID ESTERS IN FRUITS AND VEGETABLES' ---	7
2 5	P,Y CH,A,683 426 (MARIGEN S.A.) 15. März 1994 siehe das ganze Dokument -----	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 94/00234

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0467795	22-01-92	FR-A- 2664164 AU-A- 8021891 JP-A- 5025036	10-01-92 09-01-92 02-02-93
FR-A-2345087	21-10-77	GB-A- 1581744 AT-B- 374344 CA-A- 1083960 CH-A- 627350 DE-A, C 2711486 JP-C- 1366342 JP-A- 52117449 JP-B- 61027028 NL-A- 7703074 SE-B- 428520 SE-A- 7703227 US-A- 4141994	17-12-80 10-04-84 19-08-80 15-01-82 06-10-77 26-02-87 01-10-77 23-06-86 26-09-77 11-07-83 23-09-77 27-02-79
FR-A-2221499	11-10-74	US-A- 3886294 CH-A- 585525 DE-A- 2411529 GB-A- 1407779 JP-A- 49126727	27-05-75 15-03-77 26-09-74 24-09-75 04-12-74
FR-A-2187291	18-01-74	BE-A- 805242	25-03-74
FR-A-1581390	12-09-69	CH-A- 523024	31-05-72
US-A-3316101	25-04-67	KEINE	
JP-A-58128141	30-07-83	KEINE	
CH-A-683426	15-03-94	KEINE	