CH 638 175 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 07 C 101/24
C 07 C 101/22
C 07 C 57/15
A 61 K 31/205

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11) 638 175

(21) Gesuchsnummer: 10608/78

(22) Anmeldungsdatum: 12.10.1978

(30) Priorität(en): 13.10.1977 HU RI 648

(24) Patent erteilt: 15.09.1983

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.09.1983

(73) Inhaber:
Richter Gedeon Vegyészeti Gyar RT, Budapest X (HU)

(72) Erfinder:
Karoly Lapis, Budapest XI (HU)
Béla Szende, Budapest XI (HU)
Andras Jeney, Budapest I (HU)
Zsuzsa Suba, Budapest II (HU)
Laszlö Kovacs, Budapest VIII (HU)
Ernö Tyihak, Budapest III (HU)
Lajos Kisfaludy, Budapest II (HU)
Lajos Kovacs, Budapest XIX (HU)
György Dobo, Budapest II (HU)
Béla Szarvady, Budapest III (HU)

(74) Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

(54) N-epsilon-Trimethyllysinsalze, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie diese Salze enthaltende Arzneimittel.

(57) Salze von N-ε-Trimethyl-L-Lysin mit ein oder zwei Molekülen Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure.

Diese neuen Salze werden hergestellt, indem man N-ε-Trimethyl-L-lysin in wässriger Lösung mit einer entsprechende Menge an Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure umsetzt.

Arzneimittelpräparate enthalten als Wirkstoffkomponente mindestens ein mit ein oder zwei Molekülen Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure gebildetes Salz von N-ε-Trimethyl-L-lysin.

Die beschriebenen Arzneimittel haben einen Einfluss auf das Blutbild bei Tumorinfektionen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Die von N-ε-Trimethyl-L-lysin mit ein oder zwei Molekülen Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure gebildeten Salze.

2. N-ε-Trimethyl-L-lysin-monoglutamat nach Anspruch 1.

3. N-ε-Trimethyl-L-lysin-difumarat nach Anspruch 1.

4. N-ε-Trimethyl-L-lysin-diaspartat nach Anspruch 1.

5. Verfahren zur Herstellung von Salzen von N-ε-Trimethyl-L-lysin mit einem oder zwei Molekülen Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure, dadurch gekennzeichnet, dass man N-ε-Trimethyl-L-lysin in wässriger Lösung mit einer entsprechenden Menge an Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure umsetzt.

6. Arzneimittelpräparate, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Wirkstoffkomponente mindestens ein mit ein oder zwei Molekülen Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure gebildetes Salz von N-ε-Trimethyl-L-lysin enthalten.

Die Erfindung betrifft neue N-ε-Trimethyllysinsalze, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie Arzneimittel, die diese Salze als Wirkstoffkomponente enthalten. Bei den neuen Verbindungen handelt es sich um die von N-ε-Trimethyllysin mit einem oder zwei Molekülen Asparaginsäure, Fumarsäure oder Glutaminsäure gebildeten Salze.

Das N-ε-Trimethyllysin wurde in zahlreichen Species – von den Actinomycetes bis zu den Säugern –, ferner in unterschiedlichen Pflanzen sowohl in gebundenem wie auch in freiem Zustand gefunden. Die biologische Bedeutung dieser zum Betaintyp gehörenden Aminosäure wie auch die der verwandten Verbindungen, zum Beispiel des N-Dimethyllysins, des methylierten Arginins usw., konnte jedoch bis heute nicht genau geklärt werden [Tyihák u.a.: Life Science 20, 385 (1977)]. So wurde N-ε-Trimethyllysin zum Beispiel in neuerer Zeit aus menschlichen Placenta isoliert [T. Tomita und K. Nakamura: Z. Physiol. Chem. 358, 413 (1977)], was auf eine physiologische oder biochemische Bedeutung in den sich entwickelnden Organen hinweist. Das N-ε-Trimethyllysin reagiert in Form der Base alkalisch und schädigt dadurch die Zellen. Da es von Rezeptoren nur in Form seiner Salze gebunden wird, ist es in vitro wirkungslos. Das N-ε-Trimethyllysin wurde sowohl an sich wie auch für verschiedene Vergleichsversuche in Form seiner unterschiedlichen Salze hergestellt. Eines der am besten untersuchten Salze ist das Dioxalat [T. Takemoto u.a.: Yakugaku Zasshi 84, 1176 (1964); japanische Patentschriften Nr. 24 790 ('65), 09 529 ('68) und 28 092 ('68), französische Patentschrift Nr. 1 442 318, M. Takehara u.a.: Nippon Kagaku Zasshi 1969, 101], welches zwar ein stabiles Salz ist, für die pharmazeutische Anwendung jedoch nicht in Frage kommt. Zu den gründlicher untersuchten Salzen gehören auch das Mono- und Dihydrochlorid [britische Patentschrift Nr. 865 157, französische Patentschrift Nr. 1 442 318, J. Puskás und E. Tyihák: Periodica Polytechnica 13, 261 (1969); J.H. Scoly und N.L. Benoiton: Cand J. Biochem. 48, 1122 (1970); R.A. Cox und C.L. Hoppel: Biochem. J. 136, 1083 (1973)]. Diese Salze sind jedoch stark hygroskopisch, was ihre Lagerung und Dosierung problematisch macht. Von den Salzen des N-ε-Trimethyllysins wurden ferner das Hydrobromid (französische Patentschrift Nr. 1 442 318), das Zitrat [H. Ozawa u.a.: Yakugaku Zasshi 87, 935 (1967)], das Di-p-hydroxyazobenzol-p'-sulfonat [R.T. Markiw: Biochem. Med. 13, 23 (1975); Y. Kakimoto u. S. Akazawa: J. Biol. Chem. 245, 5751 (1970); T. Tomita und K. Nakamura: Z. Physiol. Chem. 358, 413 (1977)], das Nicotinat (französische Patentschrift Nr. 1 442 318) und das N-Acotyl-L-amino-succinat (französische Patentschrift Nr. 1 442 318) beschrieben. Alle diese Salze entsprechen jedoch den an die Stabilität und die pharmazeutische Verwendbarkeit gestellten Anforderungen nicht.

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung neuer, pharmazeutisch verwendbarer N-ε-Trimethyl-L-lysinsalze, die stabil, d.h. nicht hygroskopisch sind, sich gut dosieren und lagern lassen, eine genau definierte Zusammensetzung aufweisen und in wässriger Lösung einen pH-Wert haben, der dem pH-Wert der physiologischen Kochsalzlösung gleich oder ähnlich ist.

Es wurde nun gefunden, dass die von N-ε-Trimethyl-L-lysin mit einem oder zwei Molekülen Fumarsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure gebildeten Salze diesen Anforderungen entsprechen. Besonders bevorzugt ist das N-ε-TrimethylL-lysin-monoglutamat (im folgenden TML-Glu).

Die genannten Salze werden erfindungsgemäss hergestellt, indem man N-ε-Trimethyl-L-lysin in wässriger Lösung mit Asparaginsäure, Fumarsäure oder Glutaminsäure umsetzt.

Zweckmässig werden die wässrigen Lösungen der Ausgangsstoffe miteinander vereinigt, das Reaktionsgemisch wird gewöhnlich nach Ablauf der Reaktion eingedampft, der Rückstand erforderlichenfalls umkristallisiert und dann getrocknet.

Die Menge der als Ausgangsstoff verwendeten Asparaginsäure, Fumarsäure oder Glutaminsäure hängt natürlich davon ab, ob ein mit einem oder mit zwei Molekülen Säure gebildetes Salz hergestellt werden soll.

Die pharmakologische Wirkung der erfindungsgemässen Salze wird durch folgende Versuche veranschaulicht:

Untersucht wurde die Wirkung von TML-Glu auf das Blutbild von mit NK/Ly-Tumor infizierten Mäusen.

50 Mäuse des Stammes CFLP O (Gewicht: 20–22 g, Alter: 8 Wochen) wurden i.p. mit NK/Ly Ascit-Tumor (5×10^5 Zellen pro Tier) infiziert. Von den 50 Tieren dienten 25 als Kontrolle, die restlichen 25 wurden am 2., 5., 9., 11., 13. und 19. Tag nach der Infektion (am 19. Tag nur noch die 5 überlebenden Tiere) i.p. mit 100 mg/kg TML-Glu behandelt. Am 2., 5., 8., 10., 12., 13., 14. und 20. Tag nach der Infektion wurde das Blutbild untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tag der Blutbilduntersuchung	rote Blutkörperchen (Millionen/mm³)		weisse Blutkörperchen (1000/mm³)	
	behandelt	Kontrolle	behandelt	Kontrolle
2.	8,66	7,06	6,446	7,800
5.	7,2	6,95	8,732	8,466
8.	8,2	7,8	7,200	7,733
10.	7,2	6,4	8,520	8,900
12.	7,5	5,7	10,800	6,500
13.	6,6	4,9	8,260	6,700
14.	5,5	4,5	9,000	7,700
20.	5,0	2,1	7,133	5,100

Aus den Daten ist ersichtlich, dass das TML-Glu die sich im Laufe des Wachstums des NK/Ly-Tumors ausbildende schwere Anämie in beträchtlichem Masse vermindert. Der LD_{50}-Wert der Verbindung liegt, gemessen an Mäusen i.p., über 1500 mg/kg.

Ferner wurde der Einbau von Thymidin (^3H TdR) in den Thymus, das Knochenmark, die Milz und die Schleimhaut des Dünndarms von gesunden, 12 Wochen alten weiblichen

Mäusen des Stammes DBA/2 sowie in in vivo prolyferierende NK/Ly-Ascit-Tumorzellen untersucht. Pro Gruppe und Zeitpunkt fanden je 5 Tiere Verwendung. Die Versuche wurden in vier Wiederholungen durchgeführt, das TML-Glu wurde i.p. in einer Dosis von 100 mg/kg appliziert. Es wurde gefunden, dass durch TML-Glu der Einbau von ^{3}H TdR in den Thymus um 85±7%, in die Milz um 75±8% und in die NK/Ly-Tumorzellen um 94±11% verstärkt wird (24 Stunden nach der Behandlung). Die Zellen des Knochenmarks zeigten in der 10. und 48. Stunde einen verstärkten (57±4% beziehungsweise 72±5%) Einbau von ^{3}H TdR. Bei den NK/Ly-Tumorzellen verstärkte sich der Einbau in der 48. Stunde noch mehr (124±14%). Bei i.p. Applikation wurde der Einbau von ^{3}H TdR in die Schleimhaut des Dünndarms nicht gesteigert, während im Falle einer Verabreichung p.o. 32 Stunden nach der Behandlung ein Anstieg des Einbaus um 50±9% zu beobachten war. Dies zeigt, dass die Zellen mit der DMS-Synthese begonnen haben und in die aktive Phase getreten sind.

Die auf die Lymphocyten ausgeübte transformierende Wirkung wurde auch an Humankulturen untersucht. Aus dem peripheren Blut gesunder Blutspender wurden mit Hilfe des Ficoll-Uromiro-Gradienten Lymphocyten isoliert. Diese wurden in einer Zellenzahl von 5×10^5/ml in autologes Serum enthaltendem Parker 199 Medium suspendiert und bei 37 °C 96 Stunden lang inkubiert. Ein Teil der Proben wurde mit 100 µg/ml TML.2HCl, ein weiterer Teil mit 100 µg/ml TML-Glu behandelt, die restlichen Proben dienten als Kontrolle. Die transformierende Wirkung wurde durch das Mass des Einbaus von ^{3}H TdR bestimmt, die Behandlung mit ^{3}H TdR wurde in einer Dosis von 11 µCi/ml 3 Stunden vor Abbruch der Inkubation vorgenommen. Die Züchtung der Kulturen wurde 48, 72 beziehungsweise 96 Stunden nach dem Beginn abgebrochen. Die an DNS gebundene Aktivität wurde nach Extrahieren mit kochender Perchlorsäure durch Flüssigkeitsscintillation bestimmt. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Zeit (h)	Aufnahme von ^{3}H TdR (cpm) TML·2HCl	TML-Glu	Kontrolle
48	146	594	123
	–	756	
	167	413	
72	295	3010	159
	303	2427	
	254	1413	
96	231	2825	271
	330	2878	
	301	3659	

Dass die ruhenden Zellen in die aktive Phase gelangten, beweist, dass sie begannen sich zu vermehren. Deshalb wurde auch die Entwicklung der Gesamtzellenzahl des Tumors untersucht.

20 weibliche Mäuse des Stammes CFLP wurden mit NK/Ly-Tumor beimpft. 24 Stunden später wurden 10 Tiere 8 Tage lang täglich 100 mg/kg TML-Glu appliziert, während die restlichen 10 Tiere als Kontrolle dienten. 9 Tage nach der Impfung wurden die Mäuse getötet, das Gewicht der Tiere und die Gesamtzellenzahl des Tumors wurden bestimmt. Es wurde gefunden, dass bei den behandelten Tieren die Gesamtzellenzahl des Tumors 35% höher lag als bei der Kontrolle.

Schliesslich wurde die Wirkung von TML-Glu auf die humorale und cellulare Immunantwort von Mäusen untersucht. Als Vergleichssubstanz diente Levamisol (L-6-Phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-b]thiazol). Die Untersuchungen wurden an Gruppen von je 10 weiblichen, 2 Monate alten Mäusen des Stammes DBA/2 vorgenommen, als Antigen wurden die roten Blutkörperchen des Schafes i.p. verwendet. Als positive Kontrolle wurden E. coli Endoxin und eine einmalige Behandlung mit 2–5 mg/kg Levamisol gegeben. Das TML-Glu wurde zwei Wochen lang in einer Dosis von 5×100 mg/kg i.p. als Vorbehandlung beziehungsweise als einmalige Behandlung mit 100 mg/kg i.p. ebenfalls vor der Verabreichung des Antigens appliziert. Der Haemagglutinin-Titer wurde mit dem Mikrotitrator nach Takács bestimmt. Es wurde gefunden, dass die einmalige Behandlung mit TML-Glu wirkungslos ist, die wiederholte Vorbehandlung hingegen einen genau so grossen Titeranstieg verursacht wie das Levamisol. Dieses hat jedoch verschiedene Nebenwirkungen, zum Beispiel wirkt es schädlich auf den Magen-Darm-Trakt. TML-Glu hingegen hat keine Nebenwirkungen, es ist das Salz eines Stoffes, der auch im Organismus vorkommt.

Zur Untersuchung der cellularen Immunantwort wurde das von Legrange u.a. beschriebene Versuchsmodell angewendet. Dessen Wesen besteht darin, dass nach mehrmaliger Antigengabe (rote Blutkörperchen des Schafes) die Sohlendicke der Mäuse anwächst. Das Mass dieses Wachstums wird im allgemeinen von den Mitteln, die die humorale Immunantwort stimulieren, bezogen auf die Kontrolle, zuerst vermindert, nach einigen Tagen jedoch, verglichen mit diesem bereits verminderten Kontrollwert, gesteigert wird; diese Erscheinung tritt auch bei einer Vorbehandlung mit TML-Glu (5×100 mg/kg, innerhalb von zwei Wochen) ein.

Auf Grund der beschriebenen Versuchsergebnisse können die Vorteile von TML-Glu wie folgt zusammengefasst werden:

1. Da es zahlreiche Zellen empfindlich für Cytostatika macht, ist es in Kombination mit Cytostatika gut in der Therapie von Geschwulsterkrankungen anwendbar.

2. Infolge seiner auf das Blutbild ausgeübten Wirkung und der an der Darmschleimhaut eintretenden, die Prolyferation steigernden Wirkung vermindert die zu einem geeigneten Zeitpunkt applizierte Verbindung die toxische Wirkung der Cytostatika.

3. Auch für sich allein verabreicht verbessert die Verbindung bei Geschwulstanämie, aber auch bei Anämie sonstigen Ursprungs das Blutbild.

4. Die immunstimulierende Wirkung der Verbindung kann bei Geschwulsterkrankungen, aber auch in sonstigen, mit einer Verminderung der humoralen Immunität verbundenen Fällen gut genutzt werden.

Die Erfindung wird an Hand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Die in den Beispielen benutzten Abkürzungen entsprechen den in der Fachliteratur üblichen Abkürzungen [J. Biol. Chem. 247, 977 (1972)]. Die Abkürzung TML steht für N-ε-Trimethyl-L-lysin.

Bei der Herstellung der neuen Verbindungen wurde zum Eindampfen stets ein Rotavapor-Apparat (Büchi) benutzt. Die Schmelzpunktbestimmung wurde mit dem Apparat nach Tottoli (Büchi) durchgeführt. Die Dünnschichtchromatogramme wurden an Fixion-Schichten aufgenommen. Als Fliessmittel wurde die Lösung von 50 g Zitronensäure, 50 g NaOH und 7 ml konzentrierter Salzsäure in 500 ml destilliertem Wasser verwendet. Die Chromatogramme wurden mit einer Lösung aus 80 ml Methanol, 20 ml Eisessig, 0,2 g Ninhydrin und 0,1 g Kupfer(II)-sulfat entwickelt.

Beispiel 1

N-ε-Trimethyl-L-lysin-monoglutamat

50,0 g (0,265 Mol) chromatographisch einheitliches N-Trimethyl-L-lysin werden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird auf 50 °C erwärmt und mit der Lö-

sung von 39,0 g (0,265 Mol) L-Glutaminsäure in 500 ml destilliertem Wasser vereinigt. Die erhaltene Lösung wird bei 50 °C 30 Minuten lang gerührt und dann mit 5 g Norit-Aktivkohle versetzt. Die Lösung wird einige Minuten lang gerührt, dann filtriert und bei vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Beim Eindampfen darf die Temperatur der Lösung nicht über 50 °C ansteigen. Der erhaltene kristalline Rückstand wird im Vakuum über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. 95–98 g N-ε-Trimethyl-L-lysin-monoglutamat werden erhalten, das bei 104–107 °C schmilzt. $[\alpha]^{25}_D = +5{,}15°$ (c=l, Wasser).

Aminosäureanalyse: Glu: 1,0 (l); TML: 1,13 (l).

Elementaranalyse für $C_{14}H_{30}O_6N_3 \cdot 2H_2O$:

ber.: C 45,2% N 11,3%

gef.: C 45,6% N 11,2%.

Beispiel 2

N-ε-Trimethyl-L-lysin-difumarat

7,0 g (0,37 Mol) chromatographisch einheitliches N-ε-Trimethyl-L-lysin werden in 70 ml destilliertem Wasser gelöst. Zu der Lösung wird unter Rühren die kochende Lösung von 99,5 g (0,85 Mol) Fumarsäure in 4000 ml Äthanol gegeben. Das langsam abgekühlte Gemisch wird 48 Stunden lang bei 0 °C gehalten. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert, zuerst mit Äthanol, dann mit Äther gewaschen und schliesslich getrocknet. 108 g (69%) N-ε-Trimethyl-L-lysin-difumarat werden erhalten. Dieses wird aus 3% Wasser enthaltendem Äthanol umkristallisiert. Das Produkt schmilzt unter Zersetzung bei 147–149 °C. R_f: 0,1; $[\alpha]^{25}_D = +6{,}0°$ (c = 2, Wasser). Aminosäureanalyse: TML: 1,0 (l).

Beispiel 3

N-ε-Trimethyl-L-lysin-diaspartat

50,0 g (0,265 Mol) chromatographisch einheitliches N-ε-Trimethyl-L-lysin werden in 500 ml destilliertem Wasser der Temperatur 50 °C gelöst. Diese Lösung wird zu einer 50 °C warmen Lösung von 70,1 g (0,53 Mol) L-Asparaginsäure in 500 ml destilliertem Wasser gegeben. Die Lösung wird einige Minuten lang gerührt und dann mit 5 g Norit-Aktivkohle versetzt. Nach dem Filtrieren wird die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft. Der ölartige Rückstand wird durch Behandeln mit trockenem Äthanol verfestigt. 60,0 g N-ε-Trimethyl-L-lysin-diaspartat werden erhalten, das bei 142–153 °C schmilzt. (Die Substanz ist stark hygroskopisch).