

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTCHRIFT 147 544

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

			Int. Cl. ³	
(11)	147 544	(44)	08.04.81	3(51) C 07 H 17/06 A 61 K 31/715
(21)	AP C 07 H / 217 287	(22)	30.11.79	
(31)	966 423 062 587	(32)	04.12.78 31.07.79	(33) US

(71) siehe (73)

(72) Nair, Vijay G., IN; Bernstein, Seymour, US

(73) American Cyanamid Company, Stamford, US

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, 1130 Berlin, Frankfurter Allee 286

(54) Verfahren zur Herstellung von Rutin-poly(H)-sulfaten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Rutin-poly(H)-sulfaten und deren Salzen. Die gewonnenen Verbindungen zeichnen sich durch wertvolle pharmazeutische Eigenschaften aus. Sie sind geeignet, das Komplement einer Körperflüssigkeit, vorzugsweise Blut, zu hemmen bzw. zu inaktivieren. Sie eignen sich z.B. zur Behandlung von Arthritis rheumatica, Glomerulo nephritis und anderen Entzündungen. Erfindungsgemäß wird zur Herstellung einer Verbindung der Formel I, worin R Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel $-SO_3A$ (A = pharmazeutisch verträgliches Salzkation) mit der Einschränkung bedeutet, daß zumindest sechs der R-Gruppen $-SO_3A$ sind, Rutin in einem geeigneten Lösungsmittel mit einem Trialkylamin-Schwefel-Trioxyd-Komplex bei 50 bis 90 °C umgesetzt, woraufhin das Trialkylaminsulfat isoliert und abschließend mit einem Alkalimetallazetat in einer wäßrigen Lösung behandelt wird.

- Formel -

26 Seiten

Verfahren zur Herstellung von
Rutinpoly(H-)sulfatsalzen
und verwandten Verbindungen

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft die Konzeption der Herstellung neuartiger Rutinpoly(H-)sulfate und Salze davon.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Es wurde von verschiedenen sulfatierten Polysacchariden berichtet, daß sie Komplementinhibitionswirksamkeit haben, zum Beispiel Heparin, J. Infect. Dis., 44: 250 - 253 (1929); Carrageenin, Immunology, 8: 291 (1965) und Pentosanpolysulfoster, Chemical Abstracts, 75: 33179s (1971). Es ist jedoch kein Patent bekannt, das antikomplementäre Aktivität der erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze offenbart.

Ein Rutinsulfat-Natriumsalz ("Rutin, wasserlöslich") wird von E. Merck, Darmstadt, BRD, Katalog-Nr. 500014, verkauft. Dieses Material, das sich als injizierbare Form von Vitamin P als wertvoll erwiesen hat, ergibt bei der Analyse zwei bis drei Sulfate pro Molekül (Schwefelanalyse, S = 5,45 %). "Rutin, wasserlöslich" wurde hinsichtlich der Komplementäraktivität unter Anwendung der hierin offenbarten Tests untersucht und zeigte keine Komplementinhibitionswirkung. Durch die Sulfatierung dieses Materials entsteht das erfindungsgemäße Rutinpoly(H-)sulfat (Schwefelanalyse, S = 16,5 %), das als Komplementinhibitionsmittel äußerst aktiv ist.

Die Bezeichnung "Komplement" bezieht sich auf eine Komplexgruppe von Proteinen in Körperflüssigkeiten, die beim Zusammenwirken mit Antikörpern oder anderen Faktoren eine wichtige Rolle als Vermittler bei Immunisierungs-, allergischen, immunochemischen und/oder immunopathologischen Reaktionen spielen. Die Reaktionen, bei denen ein Komplement beteiligt ist, finden im Blutserum oder in anderen Körperflüssigkeiten statt und werden daher als Humoralreaktionen betrachtet.

Im menschlichen Blut sind gegenwärtig mehr als 11 Proteine im Komplementsystem bekannt. Diese Komplementproteine werden mit dem Buchstaben C und durch Zahlen, C1, C2, C3 und so weiter bis C9 bezeichnet. Das Komplementprotein C1 ist in Wirklichkeit eine Ansammlung von Untereinheiten mit der Bezeichnung C1q, C1r und C1s. Die den Komplementproteinen zugeordneten Zahlen geben die Reihenfolge wieder, in der sie aktiv werden, mit Ausnahme des Komplementproteins C4, das nach C1 und vor C2 reagiert. Die Zahlenzuordnungen für die Proteine in dem Komplementsystem wurden vorgenommen, bevor die Reaktionsreihenfolge vollkommen bekannt war. Eine ausführlichere Beschreibung des Komplementsystems und seiner Rolle in den Körperprozessen ist beispielsweise in folgender Literatur zu finden: Bull. World Health Org., 39, 935 - 938 (1968); Ann. Rev. Medicine, 19, 1 - 24 (1968); The Johns Hopkins Med. J., 128, 57 - 74 (1971); Harvey Lectures, 66, 75 - 104 (1972); The New England Journal of Medicine, 287, 452 - 454; 489 - 495; 545 - 549; 592 - 596; 642 - 646 (1972); Scientific American, 229, (Nr. 5), 54 - 66 (1973); Federation Proceedings, 32, 134 - 137 (1973); Medical World News, 11. Oktober 1974; S. 53 - 66; J. Allergy Clin. Immunol., 53, 298 - 302 (1974); Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation 2/Proteases Biol. Control/229 - 241 (1975); Ann. Review of Biochemistry, 44, 697 (1975); Complement in Clinical Medicine, Disease-a-Month, (1975); Complement, Scope, Dezember 1975; Annals of Internal Medicine, 84, 580 - 593 (1976); "Complement: Mechanisms and Functions", Prentice-

Hall, Englewood Cliffs, N. J. (1976); Essays Med. Biochem., 2, 1 - 35 (1976); Hospital Practice, 12, 33 - 43 (1977); Perturbation of Complement in Disease, Chap. 15 in Biological Amplification Systems in Immunology (Ed. Day and Good), Plenum, New York und London (1977); Am. J. Clin. Pathology, 68, 647 - 659 (1977).

Man kann annehmen, daß das Komplementsystem aus drei Untersystemen besteht: (1) einer Erkennungseinheit (C1q), die die Kombination mit Antikörpermolekülen, die einen fremden Eindringling entdeckt haben, ermöglicht; (2) einer Aktivierungseinheit (C1r, C1s, C2, C4, C3), die eine Stelle an der benachbarten Membran vorbereitet; und (3) einer Angriffseinheit (C5, C6, C7, C8 und C9), die ein "Loch" in der Membran bildet. Die Membranangriffseinheit ist nicht-spezifisch; sie zerstört Eindringlinge nur, weil sie in ihrer Nachbarschaft erzeugt wurde. Um Schäden an den eigenen Zellen des Wirtes weitgehend zu reduzieren, muß ihre Aktivität rechtzeitig begrenzt werden. Die Begrenzung erfolgt zum Teil durch den spontanen Zerfall von aktiviertem Komplement und zum Teil durch Interferenz durch Inhibitoren und zerstörende Enzyme. Die Steuerung von Komplement ist jedoch nicht vollkommen und es gibt Zeiten, zu denen Schäden an den Zellen des Wirtes auftreten. Immunität ist daher ein zweiseitiges Schwert.

Die Aktivierung des Komplementsystems beschleunigt auch die Blutgerinnung. Diese Wirkung entsteht aufgrund der komplement-vermittelten Freisetzung eines Gerinnungsfaktors von Blutplättchen. Die biologisch-aktiven Komplementfragmente und -komplexe können in Reaktionen verwickelt werden, die die Zellen des Wirtes zerstören, und diese pathogenen Reaktionen können zur Entstehung von Immun-Komplex-Erkrankungen führen. Beispielsweise schädigt in einigen Fällen von Nephritis Komplement die Basalmembran der Niere, was zu einem Übergang von Eiweiß aus dem Blut in den Urin führen kann. Die Krankheit disseminierter Lupus erythematosus ge-

hört zu dieser Kategorie; ihre Symptome umfassen Nephritis, viszerale Läsionen und Hautausschläge. Die Behandlung von Diphtherie oder Tetanus durch die Injektion großer Mengen Antitoxin führt manchmal zu Serumallergie, einer Immun-Komplex-Krankheit. Rheumatische Arthritis ist auch auf Immun-Komplexe zurückzuführen. Wie disseminierter Lupus erythematosus ist es eine autoimmune Erkrankung, bei der die Krankheitssymptome durch pathologische Effekte des Immunsystems im Gewebe des Patienten hervorgerufen werden. Zusammenfassend ist zu sagen, daß das Komplementsystem bei Entzündung, Koagulation, Fibrinolyse, Antikörper-Antigen-Reaktionen und anderen Stoffwechselprozessen erwiesenermaßen eine Rolle spielt.

In Gegenwart von Antikörper-Antigen-Komplexen sind die Komplementproteine bei einer Reihe von Reaktionen beteiligt, die zu irreversiblen Membranschäden führen können, wenn sie in der Nähe biologischer Membranen stattfinden. Obwohl Komplement einen Teil des Abwehrmechanismus des Körpers gegen Infektionen darstellt, so führt es auch zu Entzündung und Gewebeschädigung beim immunopathologischen Prozeß. Die Beschaffenheit einiger Komplementärproteine, Vermutungen hinsichtlich der Art und Weise der Komplementbindung an biologische Membranen und die Art, in der Komplement zur Membranschädigung führt, werden in Annual Review in Biochemistry, 38, 389 (1969); Journal of Immunology, 119, 1 - 8, 1195, 1358 - 1364, 1482 (1977) beschrieben.

Es wurde eine Vielzahl von Substanzen vorgestellt, die das Komplementsystem inhibieren sollen, z.B. als Komplement-inhibitoren. Zum Beispiel wird von den Verbindungen 3,3'-ureylenbis[6-(2-amino-8-hydroxy-6-sulfo-1-naphthylazo)benzolsulfonsäure]tetranatriumsalz (Chlorazol, stark rosa), Heparin und einem sulfatierten Dextran berichtet, daß sie eine antikomplementäre Wirkung haben, British Journal of

Experimental Pathology, 33, 327 - 339 (1952). In der deutschen Patentschrift Nr. 2.254.893 oder dem südafrikanischen Patent Nr. 727.923 werden verschiedene 1-(Diphenylmethyl)-4-(3-phenylallyl)piperazine, die als Komplementinhibitoren wirksam sind, offenbart. Andere chemische Verbindungen, die Komplementinhibitions-Wirksamkeit besitzen, werden z.B. beschrieben in: Journal of Medicinal Chemistry, 12, 415 - 419; 902 - 905; 1049 - 1052; 1053 - 1056 (1969); Canadian Journal of Biochemistry, 47, 547 - 552 (1969); The Journal of Immunology, 104, 279 - 288 (1970); The Journal of Immunology, 106, 241 - 245 (1971); The Journal of Immunology, 111, 1061 - 1066 (1973); Biochim. Biophys. Acta, 317, 539 - 548 (1973); Life Sciences, 13, 351- 362 (1973); Journal of Immunology, 113, 584 (1974); Immunology, 26, 819 - 829 (1974); Journal of Medicinal Chemistry, 17, 1160 - 1167 (1974); Biochim. Biophys. Res. Comm., 67, 225 - 263 (1975); Ann. N. Y. Acad. Sci., 256, 441 - 450 (1975); Journal of Medicinal Chemistry, 19, 634 - 639, 1079 (1976); Journal of Immunology, 118, 466 (1977); Arch. Int. Pharmacodyn., 226, 281 - 285 (1977); Biochem. Pharmacol. 26, 325 - 329 (1977); Journal Pharm. Sci., 66, 1367 - 1377 (1977); Chem. Pharm. Bull., 25, 1202 - 1208 (1977); Biochim. Biophys. Acta, 484, 417 - 422 (1977) and Journal Clin. Microbiology, 5, 278 - 284 (1977).

Es wurde berichtet, daß die bekannten Komplementinhibitoren, ϵ -Aminocaprinsäure und Tranexaminsäure, mit Erfolg für die Behandlung angeborener angioneurotischer Ödeme verwendet wurden, eines Krankheitszustandes, der von einer angeborenen mangelhaften oder fehlenden Funktion des Serum-inhibitors der aktivierten ersten Komponente des Komplements (C1-Inhibitor) herrührt; The New England Journal of Medicine, 286, 808 - 812 (1972), 287, 452 - 454 (1972); Ann. Intern. Med., 84, 580 - 593 (1976); J. Allergy and Clin. Immunology, 60, 38 - 40 (1977).

Veröffentlichungen über die biologische Anwendung von Sura-
min-Verbindungen mit dem Ziel, das Komplementsystem - auch
bei Menschen - zu inhibieren, wie durch in vivo und in vitro
Prüfungen des Blutserums bei Warmblütern nachgewiesen wurde,
sind folgende:

B. Stuber und K. Lang, Arch. Exptl. Path. Pharmacol., 154,
41 - 49 (1930) [C. A. 25, 3067 (1931)]

F. Klopstock, Zeitschrift für Immunitätsforschung und experi-
mentelle Therapie, 75, 348 - 354 (1932)

H. J. Schmid, Schweiz. Med. Woch., 96, 1267 - 1269 (1966)

K. Lauenstein, Bayer-Symposium I, 25 - 30 (1969)

J. S. C. Fong und R. A. Good, Clin. Exp. Immunol., 10,
127 - 138 (1972)

V. Eisen und C. Loveday, Br. J. Pharmac., 49, 678 - 687
(1973)

D. Brackertz und F. Kueppers, Allergol. Et Iet Immunopath.,
11, 163 - 168 (1974)

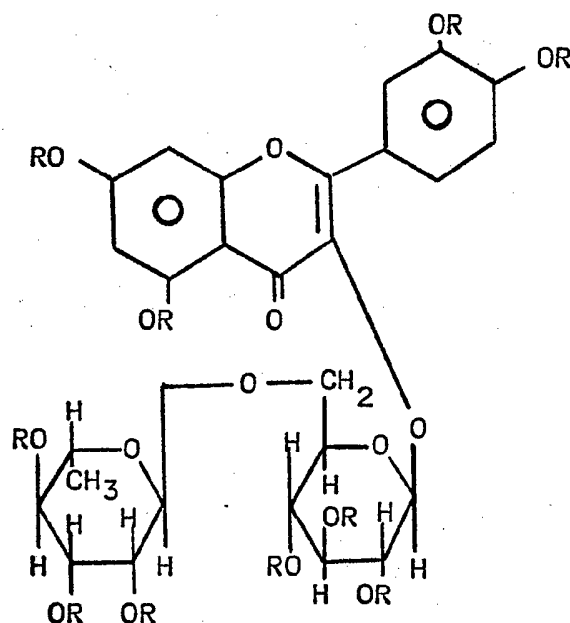
E. Raeppe, H-U. Hill und M. Loos, Immunochemistry, 13 (3),
251 - 255 (1976)

Es wurde auch berichtet, daß das Medikament Pentosanpolysul-
foester bei Menschenserum eine antikomplementäre Wirkung so-
wohl in vivo als auch in vitro hat, wie durch die Verringe-
rung der gesamten hämolytischen Komplementaktivität nachge-
wiesen wurde; Pathologie Biologie, 25, 33 - 36, 25 (2),
105 - 108, 25 (3), 179 - 184 (1977).

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Es wurde jetzt entdeckt, daß Rutinpoly(H-)sulfatsalze die
Komplementreaktionsfolge beeinflussen, indem sie die Komple-
mentaktivität in Körperflüssigkeiten inhibieren.

Die Erfindung betrifft vor allem die Herstellung aller pharmazeutisch annehmbaren Salze von Rutinpoly(H-)sulfat mit Komplementinhibitionsaktivität der allgemeinen Formel:



worin jedes R aus der Wasserstoff und $-SO_3A$ umfassenden Gruppe ausgewählt ist; A ein pharmazeutisch annehmbares Salzka-tion ist; unter der Voraussetzung, daß mindestens sechs der R-Gruppen $-SO_3A$ sind.

Die erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze finden Anwen-dung als Komplementinhibitoren in Körperflüssigkeiten und können als solche zur Besserung oder Verhinderung derjenigen pathologischen Reaktionen, die die Komplementfunktion brau-chen, und für die therapeutische Behandlung von Warmblütern, die immunologische Krankheiten wie rheumatische Arthritis, systemische Lupuserythemato-se, bestimmte Arten von Glomerulo-nephritis, bestimmte Arten von auto-allergischer hämolyti-scher Anämie, bestimmte Arten von Blutplättchenstörungen und

bestimmte Arten von Gefäßentzündung haben, verwendet werden. Rutinpoly(H-)sulfatsalze können auch zur therapeutischen Behandlung von Warmblütern verwendet werden, die an nicht-immunologischen Krankheiten leiden, z.B. an krampfartiger nächtlicher Hämoglobinurie, angeborenen angioneurotischen Ödemen (z.B. als Suramin-Natrium usw.) und entzündlichen Zuständen, die durch die Wirkung bakterieller oder lysosomaler Enzyme an den entsprechenden Komplementkomponenten hervorgerufen wurden, wie beispielsweise Entzündung nach Koronarokklusion. Sie können auch für die Behandlung von Transplantatabstoßung und als Blutkultur und als Transportmedien Verwendung finden.

Die erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze können unter Anwendung oder Anpassung bekannter Verfahren hergestellt werden, beispielsweise durch die in Chemical Reviews, 62: 549 - 589 (1962) und US-PS Nr. 3.271.388; 2.923.704; 2.686.779 und 2.697.093 oder wie unten beschrieben gewonnen werden. Es ist klar, daß die vorliegenden Sulfatsalze in verschiedenen Graden mit Wasser und Äthanol solvatisiert werden.

Sulfatierungsvorgang

Ein Gemisch von Rutin und Trialkylamin-Schwefeltrioxid-Komplex in trockenem Dimethylformamid wird 20 bis 24 Stunden lang in einem Bereich von 50 bis 90 °C gehalten. Die Lösung wird auf Raumtemperatur gekühlt und in absolutes Äthanol unter Rühren gegossen. Das Lösungsmittel wird von dem abgetrennten Produkt dekantiert, das weiter durch Auslaugen mit absolutem Äthanol und anschließend mit wasserfreiem Äther gereinigt wird. Es wird dann unter Vakuum getrocknet.

Salze von Alkali- und Erdalkalimetallen

Das Trialkylammoniumsalz von Rutinpoly(H-)sulfat wird in Wasser gelöst und mit einer 30 %igen wäßrigen Lösung von Natriumacetat oder Calciumacetat umgesetzt. Die Zugabe von wasserfreiem Äthylalkohol soll die vollständige Ausfällung des Produktes bewirken, das weiter mit wasserfreiem Äthanol gereinigt wird. Der Präzipitationsschritt wird wiederholt und durch die Reinigung mit wasserfreiem Äthanol und wasserfreiem Diäthyläther wird das vorgesehene Produkt gewonnen, das getrocknet wird.

Ausführungsbeispiele:

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung und Formulierung repräsentativer erfindungsgemäßer Sulfatsalze ausführlich beschrieben.

Beispiel 1:

Rutinpoly(H-)sulfat-Trimethylaminsalz

Eine 3,34-g-Portion Trimethylamin-Schwefeltrioxid-Komplex wird mit warmem Dimethylformamid zur Gewinnung einer klaren Lösung gerührt. Eine 1,22-g-Portion Rutin wird zugesetzt und das Rühren wird 20 Stunden lang bei 65 bis 70 °C fortgesetzt. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und unter Rühren in wasserfreies Äthanol gegossen. Der sich absetzende schwach gelbe Gummi wird durch Dekantieren gesammelt, wiederholt mit wasserfreiem Äthanol und anschließend mit Äther trituriert und unter Vakuum getrocknet, wodurch 3,5 g des vorgesehenen Produktes in Form von solvatisiertem schwach braunem Gummi gewonnen werden (Analyse: Gefunden S = 13,1 %). Bei einer anderen Herstellung ergab die Produktanalyse für S = 13,5 %.

Beispiel 2:

Rutinpoly(H-)sulfat-Natriumsalz

Eine 3,0-g-Portion Rutinpoly(H-)sulfat-Trimethylaminsalz wird in Wasser gelöst. Eine 10-ml-Portion 30 %iger wäßriger Natriumacetatlösung wird unter Schwenken zugesetzt, und das Gemisch wird 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine 100-ml-Portion wasserfreies Äthanol wird zugesetzt, und der entstandene Halbfeststoff wird durch Dekantieren abgetrennt. Durch Triturieren mit wasserfreiem Äthanol wird ein gelber körniger Feststoff gewonnen, der durch Filtration gesammelt, mit wasserfreiem Äthanol und anschließend mit Äther gewaschen und danach getrocknet wird und 1,8 g des vorgesehenen Produktes in Form von solvatisiertem hellgelbem Pulver ergibt (Analyse: Gefunden S = 15,3 %). Bei einer anderen Herstellungsart ergab die Analyse für S = 16,8 %.

Beispiel 3:

Rutinpoly(H-)sulfat-Trimethylsalz, hergestellt aus im Handel erhältlichem "Rutin, wasserlöslich".

Eine 3,34-g-Portion Trimethylamin-Schwefeltrioxid-Komplex wird in 20 ml Dimethylformamid unter Erwärmen des Gemischs auf 65 bis 70 °C hergestellt. Eine 1,22-g-Portion "Rutin, wasserlöslich" (E. Merck, Darmstadt, Westdeutschland) wird zugesetzt, und das Gemisch wird 24 Stunden lang bei 65 °C gerührt. Die klare schwach gelbe Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, und 125 ml wasserfreies Äthanol werden unter Rühren zugegeben. Der entstandene schwach braune Gummi wird durch Dekantieren abgetrennt, mit wasserfreiem Äthanol trituriert und unter Vakuum getrocknet, wodurch 3,1 g des vorgesehenen Produktes in Form eines solvatisierten schwach braunen Gummis gewonnen wurden (Analyse: Gefunden S = 13,9 %).

Beispiel 4:

Rutinpoly(H-)sulfat-Natriumsalz (Ausgangsquelle handelsübliches "Rutin, wasserlöslich")

Eine 2,9-g-Portion des in Beispiel 3 hergestellten Poly(H-)sulfat-Trimethylaminsalzes wird in 5 ml Wasser gelöst, und 10 ml 30 %ige wäßrige Natriumacetatlösung werden zugesetzt. Das Gemisch wird filtriert, 20 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend werden 125 ml wasserfreies Athanol unter Rühren zugesetzt. Der entstandene Halbfeststoff wird gesammelt und mit Athanol trituriert. Der entstandene Feststoff wird durch Filtration gesammelt, wiederholt mit Athanol und anschließend mit Äther gewaschen und danach unter Vakuum getrocknet, so daß 2,0 g des vorgesehenen Produktes in Form eines solvatisierten hellgelben Pulvers gewonnen werden (Analyse: Gefunden S = 16,5 %).

Beispiel 5:

Herstellung von gepreßten Tabletten

<u>Bestandteil</u>	<u>mg/Tablette</u>
Aktive Verbindung	0,5 bis 500
Zweibasisches Calciumphosphat, N.F.	qs (ausreichende Menge)
Stärke, USP	40
Modifizierte Stärke	10
Magnesiumstearat, USP	1 bis 5

Beispiel 6:

Herstellung von gepreßten Tabletten - Langzeitwirkung

<u>Bestandteil</u>	<u>mg/Tablette</u>
Aktive Verbindung in Form von Aluminiumlack ⁺ , mikronisiert	0,5 bis 500 (als Säureäquivalent)
Zweibasisches Calciumphosphat, N.F.	qs
Alginsäure	20
Stärke, USP	35
Magnesiumstearat, USP	1 bis 10

⁺Komplementinhibitor plus Aluminiumsulfat ergibt Aluminiumkomplementinhibitor. Komplementinhibitor-Gehalt in Aluminiumlack liegt zwischen 5 und 30 %.

Beispiel 7:

Herstellung von hartschaligen Kapseln

<u>Bestandteil</u>	<u>mg/Kapsel</u>
Aktive Verbindung	0,5 bis 500
Lactose, sprühgetrocknet	qs
Magnesiumstearat	1 bis 10

Beispiel 8:

Herstellung von Flüssigkeit zum Einnehmen (Sirup)

<u>Bestandteil</u>	<u>% Masse/Vol.</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Flüssiger Zucker	75,0
Methylparaben, USP	0,18
Propylparaben, USP	0,02
Geschmacksstoff	qs
Gereinigtes Wasser qs ad	100,0

Beispiel 9:

Herstellung von Flüssigkeit zum Einnehmen (Elixier)

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse %/Vol.</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Alkohol, USP	12,5
Glycerin, USP	45,0
Sirup, USP	20,0
Geschmacksstoff	qs
Gereinigtes Wasser qs ad	100,0

Beispiel 10:

Herstellung einer Suspension zum Einnehmen (Sirup)

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse %/Vol.</u>
Aktive Verbindung in Form von Aluminiumlack, mikronisiert	0,05 bis 5 (Säureäquivalente)
Polysorbat 80, USP	0,1
Magnesiumaluminiumsilikat kolloidal	0,3
Geschmacksstoff	qs
Methylparaben, USP	0,18
Propylparaben, USP	0,02
Flüssiger Zucker	75,0
Gereinigtes Wasser qs ad	100,0

Beispiel 11:

Herstellung von injizierbarer Lösung

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse %/Vol.</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Benzylalkohol, N.F.	0,9
Wasser zur Injektion	100,0

Beispiel 12:

Herstellung von injizierbarem Öl

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % / Vol.</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Benzylalkohol	1,5
Sesamöl qs ad	100,0

Beispiel 13:

Herstellung von intraartikulärem Produkt

<u>Bestandteil</u>	<u>Menge</u>
Aktive Verbindung	2 bis 20 mg
NaCl (physiologische Kochsalzlösung)	0,9 %
Benzylalkohol	0,9 %
Natriumcarboxymethylcellulose	1 bis 5 %
pH-Wert auf 5,0 bis 7,5 eingestellt	
Wasser zur Injektion qs ad	100 %

Beispiel 14:

Herstellung injizierbarer Depotsuspension

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % / Vol.</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5 (Säureäquivalent)
Polysorbat 80, USP	0,2
Polyäthylenglycol 4000, USP	3,0
Natriumchlorid, USP	0,8
Benzylalkohol, N.F.	0,9
HCl bis zu einem pH-Wert von 6 bis 8	qs
Wasser zur Injektion qs ad	100,0

Beispiel 15:

Herstellung von Zahnpaste

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % /Masse</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Zinkoxid	15
Polyäthylenglycol 4000, USP	50
Destilliertes Wasser qs	100

Beispiel 16:

Herstellung von Zahnsalbe

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % /Masse</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Petrolatum, weiß, USP qs	100

Beispiel 17:

Herstellung von Zahncreme

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % /Masse</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Mineralöl	50
Bienenwachs	15
Sorbitan-Monostearat	2
Polyoxyäthylen 20 Sorbitan-Monostearat	3
Methylparaben, USP	0,18
Propylparaben, USP	0,02
Destilliertes Wasser qs	100

Beispiel 18:

Herstellung von Creme zur äußeren Anwendung

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % /Masse</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Natriumlaurylsulfat	1
Propylenglycol	12
Stearylalkohol	25
Petrolatum, weiß, USP	25
Methylparaben, USP	0,18
Propylparaben, USP	0,02
gereinigtes Wasser, qs	100

Beispiel 19:

Herstellung von Salbe zur äußeren Anwendung

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % /Masse</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Cholesterol	3
Stearylalkohol	3
Weißes Wachs	8
Petrolatum, weiß, USP qs	100

Beispiel 20:

Herstellung von Straylotion (kein Aerosol)

<u>Bestandteil</u>	<u>Masse % /Masse</u>
Aktive Verbindung	0,05 bis 5
Isopropylmyristat	20
Alkohol (denaturiert) qs	100

Beispiel 21:

Herstellung von Wangentabletten

<u>Bestandteil</u>	<u>g/Tablette</u>
Wirkstoff	0,00325
6 x Zucker	0,29060
Acacia	0,01453
Lösliche Stärke	0,01453
F.D. & C. Gelb Nr. 6 Farbstoff	0,00049
Magnesiumstearat	<u>0,00160</u> 0,32500

Diese fertige Tablette wird etwa 325 mg wiegen und kann zu Wangentabletten in flacher oder jeder anderen beliebigen für bukkale Verabreichung zweckmäßigen Form gepreßt werden.

Beispiel 22:

Herstellung von Pastillen

<u>Bestandteil</u>	<u>g/Pastille</u>
Wirkstoff	0,0140
Kompact-Zucker (Sucrest Co.)	0,7138
6 x Zucker	0,4802
Sorbit (USP, kristallin)	0,1038
Geschmacksstoff	0,0840
Magnesiumstearat	0,0021
Farbstoff	qs
Stearinsäure	<u>0,0021</u> 1,4000

Die Bestandteile werden zu 5/8 Zoll großen flachen Pastillenformen gepreßt. Es können auch andere Formen in Frage kommen.

Die erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze können innerlich verabreicht werden, zum Beispiel oral oder parenteral, z.B. intraartikulär an Warmblüter, um Komplement in der Körperflüssigkeit des Tieres zu inhibieren, wobei eine solche Inhibition für die Besserung oder Verhinderung von solchen Reaktionen, die von der Komplementfunktion abhängig sind, wie entzündlichen Prozessen und Zellmembranschäden, die durch Antigen-Antikörper-Komplexe hervorgerufen wurden, nützlich ist. Es können verschiedene Mengen je nach der Verabreichungsart, des zu behandelnden Zustandes und der betreffenden verwendeten Verbindung angewendet werden. Beispielsweise können für intravenöse oder subkutane Anwendung etwa 5 bis etwa 50 mg/kg/Tag verwendet werden, oder alle sechs Stunden bei schneller ausgeschiedenen Salzen sind möglich (??). Bei intraartikulärer Verabreichung können für große Gelenke wie das Knie etwa 2 bis etwa 20 mg/Gelenk pro Woche angewendet werden, wobei für kleinere Gelenke entsprechend geringere Dosen in Frage kommen. Der Dosisbereich muß so eingestellt werden, daß eine optimale therapeutische Reaktion bei dem behandelten Warmblüter erzielt wird. Im allgemeinen kann die Menge der verabreichten Verbindung sehr unterschiedlich sein, so daß von etwa 5 mg/kg bis etwa 100 mg/kg Körpergewicht des Tieres pro Tag verabreicht werden. Die normale tägliche Dosis für einen normalen Patienten von 70 kg kann zwischen etwa 350 mg und etwa 3,5 g liegen. Einheitsdosen der Säure oder des Salzes können von etwa 0,5 mg bis etwa 500 mg enthalten.

Während im allgemeinen die Natriumsalze der erfindungsgemäßen Säuren für die parenterale Anwendung geeignet sind, können auch andere Salze hergestellt werden, z.B. können

die primärer Amine, z.B. Äthylamin; sekundärer Amine, z.B. Diäthylamin oder Diäthanolamin; tertiärer Amine, z.B. Pyridin oder Triäthylamin oder 2-Dimethylaminomethyl-dibenzofuran; aliphatischer Diamine, z.B. Decamethyldiamin; und aromatischer Diamine, hergestellt werden. Einige davon sind in Wasser löslich, andere sind in Kochsalzlösungen löslich und noch andere sind unlöslich und können für Herstellungszwecke von Suspensionen für die Injektion verwendet werden. Des Weiteren können ebenso wie das Natriumsalz die Salze der Alkalimetalle, z.B. von Kalium und Lithium; von Ammoniak und der Erdalkalimetalle z.B. Calcium oder Magnesium verwendet werden. Es ist daher einleuchtend, daß diese Salze im allgemeinen Derivate von salzbildenden Kationen umfassen.

Die erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze können auch äußerlich in Form von Salben, Cremes, Lotionen und dergleichen, die sich für die Behandlung von komplement-abhängigen dermatologischen Störungen eignen, angewendet werden.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze in Form von Zahnpasten, -salben, Wangentabletten und anderen Zusammensetzungen, die sich für die periodontische Verabreichung zur Behandlung von Periodontitis und verwandter Krankheiten der Mundhöhle eignen, verwendet werden.

Für therapeutische Zwecke können die erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze in Form herkömmlicher pharmazeutischer Zusammensetzungen verabreicht werden. Derartige Zusammensetzungen können so formuliert werden, daß sie sich zur oralen oder parenteralen Verabreichung eignen. Der Wirkstoff kann vermischt mit einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermittel vorhanden sein, wobei der Träger die unterschiedlichsten Formen je nach der für die Verabreichung z.B. oral oder parenteral vorgesehenen Präparatart haben kann. Die Sulfatsalze

können in Zusammensetzungen wie Tabletten verwendet werden. Hierbei wird der Hauptwirkstoff mit herkömmlichen, zur Tablettenherstellung verwendeten Bestandteilen, wie Maisstärke, Lactose, Saccharose, Sorbit, Talk, Stearinsäure, Magnesiumstearat, Dicalciumphosphat, Gummiarten, oder ähnlichen Stoffen als nicht-toxischen pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungs- oder Trägermitteln vermischt. Die Tabletten oder Pillen der neuen Zusammensetzungen können laminiert sein oder anderweitig zusammengesetzt sein, um eine Dosisform zu schaffen, die den Vorteil einer verlängerten oder verzögerten Wirkung oder einer bestimmten aufeinanderfolgenden Wirkung des eingeschlossenen Medikaments aufweist. Zum Beispiel kann die Tablette oder Pille aus einer inneren Dosierungs- und einer äußeren Dosierungskomponente bestehen, wobei letztere in Form einer Umhüllung über der ersteren vorhanden ist. Die beiden Komponenten können durch eine enterische Schicht voneinander getrennt sein, die die Aufgabe hat, der Auflösung im Magen zu widerstehen und ermöglicht, daß die innere Komponente unversehrt in den Zwölffingerdarm gelangt oder daß ihre Freisetzung verzögert wird. Für derartige enterische Schichten oder Überzüge können die verschiedensten Stoffe verwendet werden, und zu solchen Stoffen zählen eine Reihe polymerer Säuren oder Gemische polymerer Säuren mit Stoffen wie Schellack, Schellack und Cetylalkohol, Celluloseacetat und dergleichen. Ein besonders vorteilhafter enterischer Überzug besteht aus einem Styrolmaleinsäurecopolymer in Verbindung mit bekannten Stoffen, die zu den enterischen Eigenschaften des Überzuges beitragen. Die Tablette oder Pille kann durch die Verwendung eines entsprechenden nicht-toxischen Farbstoffes gefärbt werden, um dadurch ein gefälliges Aussehen zu erzielen.

Die flüssigen Formen, in denen die neuartigen erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zur Verabreichung eingearbeitet werden können, umfassen geeignete schmackhafte Emulsionen mit Speiseölen wie Baumwollsaamenöl, Sesamöl, Kokosnußöl, Erdnuß-

öl und dergleichen sowie Elixiere und ähnliche pharmazeutische Vehikel. Für die parenterale Anwendung können sterile Suspensionen oder Lösungen hergestellt werden. Für Injektionszwecke sind auch isotonische Präparate, die geeignete Konservierungsmittel enthalten, empfehlenswert.

Der hier benutzte Ausdruck Dosierungsform bezieht sich auf physikalisch getrennte Einheiten, die als unitäre Dosierung für Warmblüter geeignet sind, wobei jede Einheit eine bestimmte Menge Wirkstoff enthält, die so berechnet ist, daß sie den erwünschten therapeutischen Effekt in Verbindung mit dem erforderlichen pharmazeutischen Verdünnungs- oder Trägermittel oder Vehikel herbeiführt. Die Spezifikation für die erfindungsgemäßen neuartigen Dosierungsformen wird durch Charakteristika des Wirkstoffes und den beabsichtigten speziellen therapeutischen Effekt oder die Begrenzungen, die bei der Mischungsherstellung eines derartigen Wirkstoffes für die therapeutische Anwendung bei Warmblütern gemäß der Offenbarung in dieser Patentschrift zu beachten sind, bestimmt. Beispiele für geeignete orale Dosierungsformen gemäß der Erfindung sind Tabletten, Kapseln, Pillen, Puderkissen, Granulate, Oblaten, Oblatenkapseln, Teelöffelmengen, Tropfglassmengen, Ampullen, Violen, einzelne Vielfache der oben genannten und andere Formen nach der hier erfolgten Beschreibung.

Die Komplement-Inhibitionswirksamkeit der erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze wurde anhand eines oder mehrerer der folgenden identifizierten Tests demonstriert: (i) Test Code 026 (C1-Inhibitor). - Bei diesem Test wird die Fähigkeit von aktiviertem menschlichem C1 menschliches C2 in der flüssigen Phase in Gegenwart von C4 und entsprechender Verdünnungen der Testverbindung zu zerstören, gemessen. Ein aktiver Inhibitor schützt C2 gegenüber C1 und C4; (ii) Test Code 035 (C3-C9-Inhibitor) - Bei diesem Test wird die Fähigkeit der Spätkomponenten von menschlichem Komplement (C3-C9)

EAC 142 in Gegenwart entsprechender Verdünnungen der Testverbindung zu lysieren, bestimmt; (iii) Test Code 036 (C-Shunt-Inhibitor) - Bei diesem Test werden fragil gemachte menschliche Erythrocyten in autologem Serum über den Shunt-Weg unter Aktivierung durch Kobragift in Gegenwart von entsprechenden Verdünnungen der Testverbindung lysiert. Eine Inhibition des Shunt-Weges führt zum Verschwinden von Lysis; (iv) Forssman Vasculitis-Test - Hierbei wird die allgemein bekannte komplementabhängige Lesion, Forssman-Vasculitis bei Meerschweinchen durch intradermale Injektion von Kaninchen-Anti-Forssman-Antiserum erzeugt. Die Lesion wird in bezug auf Durchmesser, Ödem und Blutung gemessen, und das Ausmaß, bis zu dem ein kombinierter Index dieser durch vorherige intraperitoneale Injektion der Testverbindung in einer Menge von 200 mg/kg inhibiert wurde, wird notiert, wenn nichts anderes angegeben wurde; (v) Forssman-Schock-Test - Ein lethaler Schock wird bei Meerschweinchen durch eine intravenöse Injektion von Anti-Forssman-Antiserum hervorgerufen, und die durchschnittliche normale Todeszeit behandelter Meerschweinchen wird mit der gleichzeitiger Kontrollen verglichen; (vi) Komplement-Niveau-Reduktionstest - Bei diesem Test werden die oben behandelten Meerschweinchen oder andere zur Serumgewinnung zur Ader gelassen und das Komplementniveau wird in unverdünntem Serum durch die Kapillarröhrchenmethode nach der US-PS Nr. 3.876.376 bestimmt und mit unbehandelten Kontrollmeerschweinchen verglichen; und (vii) Cap 50 Test - Hierbei werden entsprechende Mengen der Testverbindung zu einer Menge Meerschweinchenserum in vitro gegeben, worauf die oben genannte Kapillarröhrchenanalyse mit unverdünntem Serum durchgeführt wird. Die Konzentration der Verbindung mit 50 % Inhibition wird notiert, (viii) Intraperitonealer Meerschweinchen-Test (GPIP) - Etwa 300 Gramm wiegende Meerschweinchen werden intraperitoneal (i.p.) mit 200 mg/kg in Salzlösung gelöst und auf einen pH-Wert von 7 bis 8 eingestellter Testverbindung behandelt. Blutproben von etwa 0,4 ml, durch orbitale Sinuspunktion 30 Minuten und 1 Stunde nach den Injektionen entnommen, werden direkt in Zentrifugenröhrchen gesammelt; Blutproben von 5 ml, durch Dekapitation 2 Stun-

den nach der Injektion gewonnen, werden direkt in diSPO-Bechergläsern aufgefangen. Die Proben läßt man zum Gerinnen stehen, sie werden zentrifugiert, und die gewonnenen Seren werden hinsichtlich der Komplementaktivität unter Anwendung der Kapillarröhrchen-Komplement-Analyse beurteilt. Durch Vergleich mit gleichzeitigen Kontrollproben wird die prozentuale Inhibition berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammen mit Ergebnissen von Test Code 026, 035, 036, Cap 50, %-Inhibition und Forssman-Schock aufgeführt. Tabelle I zeigt, daß das erfindungsgemäße Hauptsulfatsalz ganz wesentliche *in vitro* und *in vivo* Komplement-Inhibitions-Aktivität bei Warmblütern besitzt.

Tabelle I

Biologische Aktivitäten

Verbindung	In-vitro-Aktivität			In-vivo-Aktivität (Meerschweinchen intraperitoneal % Inhibition Zeit (Minuten))			Forsman- Schock (Minuten)	
	026 ⁺	035 ⁺	036 ⁺	Cap	50 ⁺	30		60
Rutin	N	N	N					
Rutin, wasserlöslich (E. Merck) (Analyse S = 5,45 %)	N	N	N					
Rutinpoly(H-)sulfat-Tri- methylaminsalz (Analyse S = 13,1 %)	+2 ⁺⁺	N	N					
Rutinpoly(H-)sulfat-Natrium- salz (Analyse S = 15,3 %)	+7	N	N			69	-79	-89
								17.2 (Control 3.3)

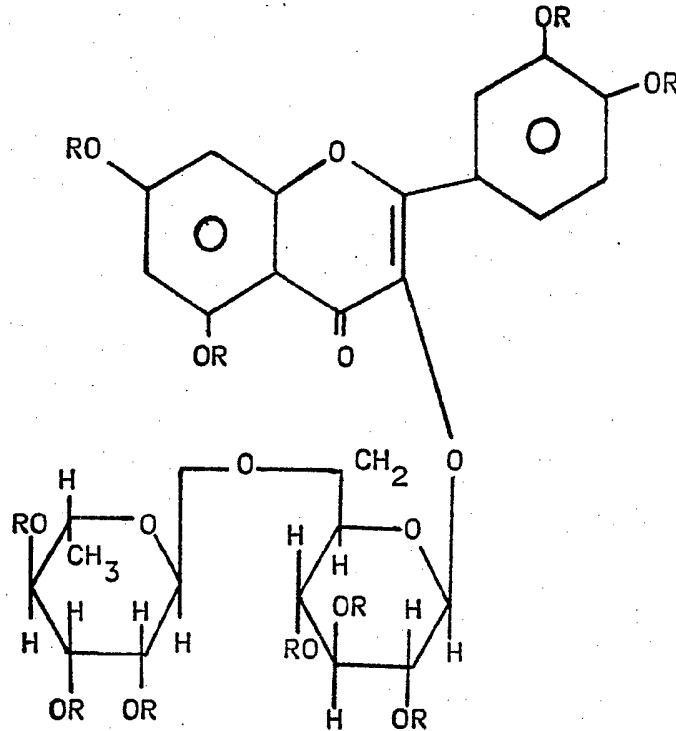
+ Code-Bezeichnung für die hier erläuterten Tests

+⁺⁺ Aktivität in Röhrchen (?? wells ?), eine Reihenverdünnungsanalyse. Eine höhere Well-
zahl bedeutet stärkere Aktivität. Die Reihenverdünnungen erfolgten doppelt.

N = inaktiv

Erfindungsanspruch

1. Verfahren für die Herstellung eines Rutinpoly(H-)sulfates der Formel:



worin jedes R aus der Wasserstoff und $-SO_3A$ umfassenden Gruppe ausgewählt ist; A ein pharmazeutisch annehmbares Salzkation ist; unter der Voraussetzung, daß mindestens sechs der R-Gruppen $-SO_3A$ sind; gekennzeichnet dadurch, daß Rutin in einem geeigneten Lösungsmittel mit einem Trialkylamin-Schwefeltrioxid-Komplex bei 50 bis 90 °C umgesetzt wird, das Trialkylaminsalz isoliert und anschließend mit einem Alkalimetallacetat in wäßriger Lösung behandelt wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das geeignete Lösungsmittel Dimethylformamid ist; der Trialkylamin-Schwefeltrioxid-Komplex Trimethylaminschwefeltrioxid ist und das Alkalimetallacetat Natriumacetat ist.