CH 650 264 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 650 264 A5

(51) Int. Cl.[4]: C 07 H 13/06
A 61 K 31/715
// (A 61 K 31/715, 31:23)

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

# (12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 7049/82

(22) Anmeldungsdatum: 03.12.1982

(30) Priorität(en): 08.10.1982 GB 8228817

(24) Patent erteilt: 15.07.1985

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.07.1985

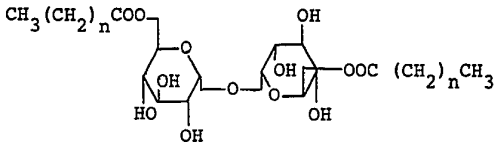
(73) Inhaber:
SS-Pharmaceutical Co., Ltd., Chuo-ku/Tokyo (JP)

(72) Erfinder:
Nishikawa, Yoshihiro, Kanazawa-shi/Ishikawa-ken (JP)
Yoshimoto, Kimihiro, Kanazawa-shi/Ishikawa-ken (JP)
Shibata, Akihiro, Narashino-shi/Chiba-ken (JP)
Kukita, Kenichi, Yachiyo-shi/Chiba-ken (JP)
Katori, Tatsuhiko, Kitasouma-gun/Ibaraki-ken (JP)

(74) Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

## (54) 6,6'-Diester von alpha, alpha-Trehalose mit einer mittelkettigen aliphatischen Säure und diesen enthaltendes pharmazeutisches Mittel.

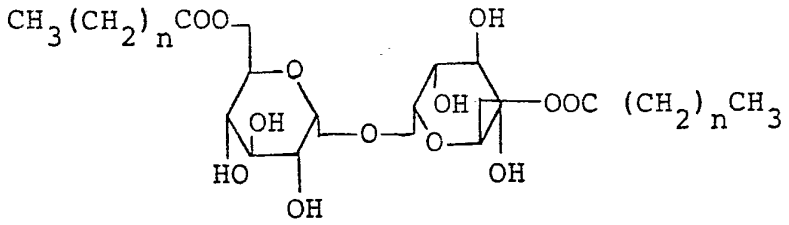
(57) Die Verbindungen der Formel I, worin n eine ganze Zahl von 1 - 10 bedeutet, haben eine ausgezeichnete Antitumoraktivität, antibiotische Eigenschaften und eine Wirkung auf die verzögerte Hypersensitivität. Die Verbindungen werden als Wirkstoffe in pharmazeutischen Präparaten verwendet.




(I)

PATENTANSPRÜCHE

1. 6,6′-Diester von α,α-Trehalose mit einer mittelkettigen aliphatischen Säure, dargestellt durch die folgende Formel I



(I)

worin n eine ganze Zahl von 6 bis 10 bedeutet.

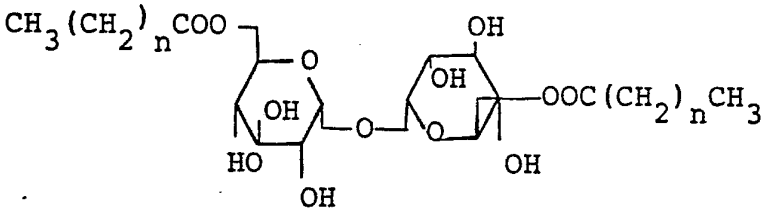
2. Pharmazeutisches Mittel, welches als aktiven Bestandteil den Diester der Formel I gemäss Anspruch 1 aufweist.

---

Diese Erfindung bezieht sich auf einen neuen 6,6′-Diester von α,α-Trehalose mit einer mittelkettigen aliphatischen Säure und pharmazeutischen Mitteln, welche diesen als aktiven Bestandteil enthalten.

α,α-Trehalose ist eine Verbindung, welche zu den sogenannten Disacchariden gehört, welche aus zwei Glucosemolekülen zusammengesetzt sind und sehr weit in der Natur verbreitet sind. Verschiedene Derivate dieser Verbindung wurden synthetisiert, wobei auch die pharmazeutische Aktivität davon geprüft wurde. Es wurde zum Beispiel geschildert, dass eine Mischung von verschiedenen Diestern, welche aliphatische Säuren an verschiedenen Positionen gebunden haben, eine Antitumor-Aktivität aufweist.

Bei der Synthese von verschiedenen 6,6′-aliphatischen Säurediestern von α,α-Trehalose und beim Studium ihrer pharmakologischen Wirkungen wurde herausgefunden, dass ein 6,6′-Diester von α,α-Trehalose mit einer mittelkettigen aliphatischen Säure, dargestellt durch die Formel I



(I)

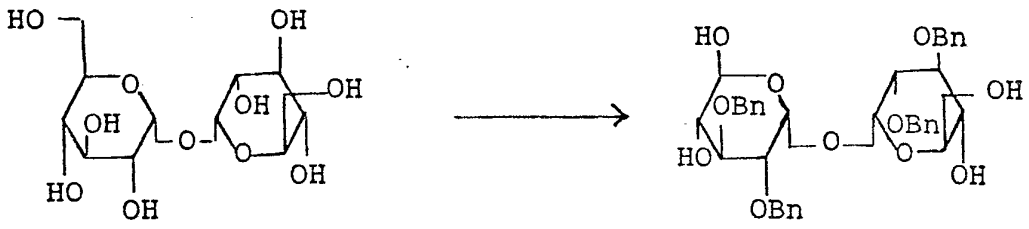
worin n eine ganze Zahl von 6 bis 10 bedeutet, eine ausgezeichnete Antitumor-Aktivität, antibiotische Aktivität und eine Wirkung auf die verzögerte Hypersensitivität hat, und nützlich für pharmazeutische Erzeugnisse ist.

Demnach ist ein Gegenstand dieser Erfindung, neue 6,6′-Diester von Trehalose mit mittelkettiger aliphatischer Säure gemäss der obenstehenden Formel I bereitzustellen. Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist, ein pharmazeutisches Mittel, welches als wirksamen Bestandteil einen 6,6′-Diester von α,α-Trehalose mit einer mittelkettigen aliphatischen Säure gemäss der obenstehenden Formel I enthält.

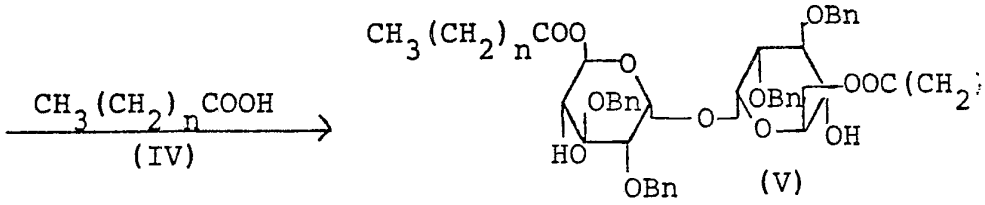
Der 6,6′-Diester von α,α-Trehalose mit einer mittelkettigen aliphatischen Carbonsäure der Formel I (im Folgenden vereinfacht als Verbindung der Formel I bezeichnet) gemäss dieser Erfindung kann zum Beispiel gemäss den folgenden Reaktionsschritten hergestellt werden:

Umwandlung einer α,α-Trehalose (II) in 2,3,2′,3′-Tetra-O-benzyl-α,α-trehalose (III)

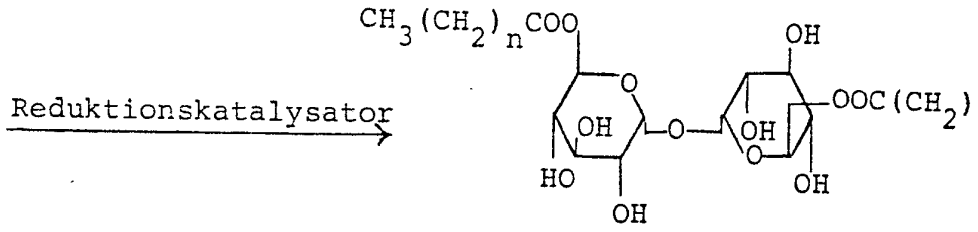
Reaktion mit der mittelkettigen aliphatischen Säure (IV) oder einem aktiven Derivat davon in das neue Zwischenprodukt2,3,2′,3′-Tetra-O-benzyl-α,α-trehalose-6,6′-(mittelkettige aliphatische Säure)-Diester (V) und Abspaltung der Benzylgruppe durch Reduktion unter Verwendung eines Reduktionskatalysators:



(II) (III)



(IV) (V)




(I)

worin Bn eine Benzylgruppe darstellt und n die gleiche Bedeutung wie oben aufweist.

Im obigen Verfahren wird 2,3,2',3'-Tetra-O-benzyl-α,α-Trehalose der Formel III durch Umsetzen der Trehalose der Formel II mit Benzaldehyd in üblicher Weise, wobei 4,6,4',6'-Di-O-benzyliden-α,α-Trehalose erhalten wird, Reaktion derselben mit Benzylchlorid zum 2,3,2',3'-Tetra-O-benzylderivat undschliesslich Umsetzung der Letzteren mit einer Säure hergestellt.

Die Umsetzung zwischen einer Verbindung der Formel III und der mittelkettigen aliphatischen Säure der Formel IV oder deren aktives Derivat wird unter den üblichen Bedingungen von Veresterungsreaktionen durchgeführt, indem die aliphatische Säure IV oder ihr aktives Derivat in einer Menge von vorzugsweise 1,8–2,4 mol pro mol der Verbindung der Formel III, in Gegenwart einer säurebindenden Verbindung, wie beispielsweise Pyridin oder Triethylamin, umgesetzt wird.

Die Reaktion wird vorzugsweise in Gegenwart oder in Abwesenheit eines Lösungsmittels zwischen 0 °C (unter Eiskühlung) bis 30 °C während 24 h durchgeführt.

Das Lösungsmittel, das dabei verwendet wird, umfasst beispielsweise die Gruppe Methylenchlorid, Chloroform, Benzol, Toluol, Ether, Tetrahydrofuran und Dioxan.

Die Reduktion zur Abspaltung der Benzylgruppen zur Herstellung der Verbindung V wird in Anwesenheit eines Katalysators, (vorzugsweise 0,5–10 mol pro mol der Komponente (V) ) in einem geeigneten Lösungsmittel durchgeführt.

Der Reduktionskatalysator umfasst zum Beispiel Palladiumschwarz, Palladiumkohlenstoff und Raney-Nickel. Das dabei verwendete Lösungsmittel umfasst zum Beispiel Alkohole wie Methanol, Ethanol und Isopropanol; halogenierte Verbindungen wie Chloroform und Methylenchlorid, und auch Mischungen von diesen Lösungsmitteln.

Die pharmakologischen Aktivitäten der erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I werden unten gezeigt.

(1) Zelltötende Aktivität von Trehalose-Diestern der Formel I:

(a) Leukämiezellen L-5178Y wurden verwendet und auf $10^5$ Zellen pro ml in RPMI 1640 Medium, das 10% Fetalserum vom Rind enthielt, konditioniert und Proben wurden zu diesem Medium in vorbestimmten Konzentrationen zugegeben. Nach einer Kultivationszeit von 48 h in einem Inkubator bei 37 °C unter 5% $CO_2$, wurde die Anzahl der lebenden Zellen unter einem Mikroskop gezählt und mit einer Kontrollgruppe verglichen, um die Multiplikationsfaktoren zu bestimmen. Sie wurden auf logarithmisches Papier aufgezeichnet und die Werte für $IC_{50}$ wurden auf Grund von dieser Kurve ermittelt. Die Konzentration für jede Probe war 25, 50, 100, 200 bzw. 400 g/ml. Die Resultate sind in der Tabelle 1 dargestellt.

*Tabelle 1*

| | Testverbindung (Angabe der Zahl n in Formel I) | $IC_{50}$ (µg/ml) |
|---|---|---|
| erfindungsgemässe Verbindungen | 6 | 350 |
| | 8 | 255 |
| | 10 | 93 |
| Vergleichsverbindungen | 14 | >400 |
| | 20 | >400 |

(b) Die zelltötende Aktivität des Trehalosediesters der Formel I wurde in gleicherweise wie unter (a) auf Leukämiezellen L-1210 geprüft.Die Resultate werden in der Tabelle 2 gezeigt.

*Tabelle 2*

| | Testverbindung (Angabe der Zahl n in Formel I) | $IC_{50}$ (µg/ml) |
|---|---|---|
| erfindungsgemässe Verbindungen | 6 | 350 |
| | 8 | 150 |
| | 10 | 210 |
| Vergleichsverbindungen | 14 | >1000 |
| | 20 | >1000 |

(2) Antikrebsaktivitäten des Trehalosediesters der Formel I:

Es wurden fünf Wochen alte männliche Std-ddy-Mäuse verwendet. Pro Gruppe wurden sechs solche Mäuse verwendet und Krebszellen von Sarcoma 180 wurden eingepflanzt, nämlich $5 \times 10^6$ Zellen in die peritoneale Höhle von jeder Maus. Nach 24 h wurde die Testsubstanz in 30%-igem Propylenglykol suspendiert und intraperitoneal verabreicht, in einer Menge von 150 mg/kg, einmal täglich während 5 Tagen. Sieben Tage nach der Transplantation der Krebszellen wurden Proben des abdominalen Ascites genommen, um das Ausmass des abdominalen Ascites und des Zellenverhältnisses zu bestimmen. Das Tumorwachstums-Verhältnis (T/C (%) ) wurde unter Verwendung des TPCV (total pack cell volume = gesamte Zellpackungsvolumen), welches das Produkt aus dem Betrag des abdominalen Ascites und des Zellverhältnisses gemäss untenstehender Formel ist und die Antikrebsaktivität der Testverbindung wurde beurteilt. Die Resultate sind in Tabelle 3 angegeben.

$$T/C\,(\%) = \frac{\text{TPCV für behandelte Gruppe}}{\text{TPCV für Kontrollgruppe}} \times 100$$

*Tabelle 3*

| | Testverbindung (Angabe der Zahl n in Formel I) | Tumorwachstums-verhältnis, T/C (%) |
|---|---|---|
| erfindungsgemässe Verbindungen | 6 | 9,1 |
| | 8 | 1,9 |
| | 10 | 6,2 |
| Vergleichs-Verbindungen | 14 | 37,7 |
| | 20 | 55,8 |
| Kontrollgruppe | | 100 |

Wie oben beschrieben, weist die erfindungsgemässe Verbindung der Formel I eine Antikrebsaktivität auf, die beträchtlich stärker ist als diejenige entsprechender Verbindungen mit 16–22 C-Atomen in den Carbonsäureresten.

(3) Antimikrobische Wirksamkeit:

Die minimale Hemmkonzentration (MIC) der erfindungsgemässen Verbindungen wurden gegen verschiedene Bakterien geprüft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 angeführt. Die Versuche wurden gemäss der MIC Messmethode, die durch die «Japan Society of Chemotherapy» bewilligt ist, durchgeführt, wobei als Kulturmedium das Mueller-Hinton Medium (Difco Laboratoires, USA) verwendet wurde. Die Testverbindungen wurden in 25% DMSO aufgelöst, wobei eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt wurde, und diese Lösung anschliessend zur vorbestimmten Konzentration mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt wurde. Resultate:

*Tabelle 4*

| Testverbindung; Angabe der Zahl n in Formel I | MIC (µg/ml) erfindungsgemäss | | Vergleichsprodukt | |
|---|---|---|---|---|
| Bakterienstamm | 6 | 8 | 14 | 20 |
| Bacillus subtilis ATCC 6633 | 50 | 12,5 | >100 | >100 |
| Staphylococcus aureus ATCC 6538P | 50 | 12,5 | >100 | >100 |
| Staphylococcus epidermides ATCC 12228 | 100 | >100 | >100 | >100 |
| Streptococcus faecalis var. gimogenes IFO 3939 | 50 | >100 | >100 | >100 |
| Sarcina lutea ATCC 9341 | 100 | >100 | >100 | >100 |

(4) Wirkung auf die verzögerte Hypersensitivität:

Es wurden verschiedene Gruppen von sechs Wochen alten weiblichen ICR Mäusen bereitgestellt, wobei jede Gruppe aus zehn Mäusen bestand. Jedem Tier wurden am Fussballen der rechten hinteren Pfote subcutan rote Blutkörper vom Schaf (SRBC) in einer Menge von $3 \times 10^9$ Körperchen pro ml und 0,05 ml pro Maus eingespritzt und unmittelbar danach wurde intraperitoneal die Testsubstanz eingespritzt* (0 Tag). Vier Tage später wurde jeder Maus die gleiche Menge SRBC (0,05 ml pro Maus) subcutan in den Fussballen der linken hinteren Pfote eingespritzt, und 24 h später wurde die Dicke des linken Fussballens mit einer Schublehre gemessen.

Andern Gruppen, welche physiologische Kochsalzlösung anstelle der Testsubstanzen verabreicht wurden, wurden zur Kontrolle verwendet und weitere andere Gruppen, welche nur der zweiten Injektion unterworfen wurden, dienten als Basisgruppen.

Das Anschwellungsverhältnis des Fussballen wurde durch folgende Gleichung erhalten:

$$\text{Anschwellungsverhältnis (\%)} = \frac{T-B}{C-B} \times 100$$

worin T, C und B die Dicke des Fussballens der linken hinteren Pfote der Testgruppe, der Kontrollgruppe bzw. der Basisgruppe darstellte.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Resultate:

*Tabelle 5*

| Testverbindung; Angabe der Zahl n in Formel (I) | | Dicke des Fussballens (mm) | Anschwellungsverhältnis, (%) |
|---|---|---|---|
| erfindungsgemässe Verbindungen | 6 | 3,71 | 126 |
| | 8 | 3,75 | 133 |
| | 10 | 3,82 | 138 |
| Vergleichsverbindungen | 14 | 3,61 | 109 |
| | 20 | 3,55 | 98 |
| Kontrolle | | 3,56 | 100 |

*Dosis: 100 mg/kg, Träger: normale Kochsalzlösung und 1 Tropfen Tween 80

Die erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I sind nahezu untoxisch und somit sichere Verbindungen, wie dies auch aus den folgenden Tatsachen hervorgeht. Ester von Sucrose mit aliphatischen Säuren sind den vorliegenden Verbindungen sehr ähnlich und als Lebensmittel additive zugelassen und als unschädliche Oberflächenmittel in Gebieten wie Nahrungsmittel, Medizin oder Kosmetik weit verbreitet.

Im weiteren können die erfindungsgemässen Verbindun-

gen je nach Anwendung in verschiedenen Typen von Präparaten formuliert werden. Es kommen dabei die orale und die nicht-orale Verabreichung in Frage; für die mündliche Verabreichung, zum Beispiel sind Tabletten, Kapseln, Pulver, Granulate oder Flüssigkeiten geeignet, während als nicht-orale Formulierungen solche wie Injektionslösungen für subcutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektionen sowie Transfusionslösungen und Suppositorien in Frage kommen.

Die oben erwähnten Präparate können nach an sich bekannten Methoden hergestellt werden. Somit können die Verbindungen der Formel I zu Tabletten, Kapseln, Pulvern oder Granulaten verarbeitet werden, wobei die Verbindungen gegebenenfalls in Kombination mit Excipienten wie Stärke, Lactose oder Mannit; Bindemittel wie Natriumcarboxymethylcellulose oder Hydroxypropylcellulose; Zerfallsmittel wie kristalline Cellulose oder Calciumcarboxymethylcellulose; Gleitmittel wie Kalk oder Magnesiumstearat; Fluiditätsverbesserer wie leichte wasserfreie Kieselsäure und ähnliches. Weiter können Flüssigkeiten und Injektionslösungen hergestellt werden, indem Verbindungen der Formel I in Pflanzenölen oder ähnlichem aufgelöst werden, um eine öllösliche Injektionslösung herzustellen, oder indem die Verbindung in üblicher Weise zur Bildung eines Sirups in Wasser aufgelöst wird. Schliesslich können Suppositorien hergestellt werden, indem die Verbindungen der Formel I in üblichen Substraten wie z.B. Kakaobutter, synthetischen Ölen oder Fetten, dispergiert werden und das ganze anschliessend gehärtet wird.

Trotzdem die Menge der Anwendung der erfindungsgemässen Verbindung der Formel I vom Ausmass der Krankheit abhängt, werden vorzugsweise für Erwachsene Dosen von 0,1 bis 2000 mg/kg für die orale Verabreichung und 0,05 bis 1000 mg/kg für die nicht-orale Verabreichung verwendet. Die Mittel können einmal oder portionenweise mehrmals täglich verabreicht werden.Diese Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

*Beispiel 1*

2,11 g 2,3,2',3'-Tetra-O-benzyl-α,α-trehalose wurden in 20 ml Pyridin und 20 ml Dichlormethan aufgelöst. Dazu wurde 1,26 g Decanoylchlorid tropfenweise unter Rühren bei 0 °C und Eiskühlung zugegeben. Nach 30 min wurde die Temperatur auf Zimmertemperatur angehoben und das Rühren wurde für eine weitere h fortgesetzt. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde in Eiswasser gegeben und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde unter reduziertem Druck destilliert. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie auf Silicagel gereinigt, wobei 2,79 g 2,3,2',3'-Tetra-O-benzyl-6,6'-di-O-decanoyl-α,α-trehalose als farbloses öliges Produkt erhalten wurde. (Ausbeute: 92%)

*Beispiel 2*

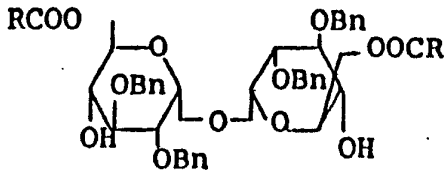
2,67 g 2,3,2',3'-Tetra-O-Benzyl-6,6'-di-O-decanoyl-α,α-trehalose, erhalten gemäss Beispiel 1, wurde in 40 ml Chloroform aufgelöst. Die Lösung wurde für 1 h der katalytischen Reduktion unterworfen.Als Katalysator wurde 1,00 g Palladium schwarz verwendet und der Wasserstoff wurde gasförmig in die Lösung eingeleitet.

Die so erhaltene Reaktionslösung wurde filtriert, um den Katalysator zu entfernen und die Filtrate wurden eingehend und unter reduziertem Druck zu einem Feststoff getrocknet. Der Rückstand wurde aus Isopropanol umkristallisiert, wobei 1,06 g 6,6'-Di-O-decanoyl-α,α-trehalose als farblose nadelförmige Kristalle erhalten wurden. (Ausbeute: 62%).

*Beispiel 3*

Die in Tabelle 6 angeführten Verbindungen wurden in gleicher Weise wie in Beispiel 1 erhalten. Die gemäss Beispiel 1 erhaltene Verbindung ist in dieser Tabelle ebenfalls enthalten.

*Tabelle 6*



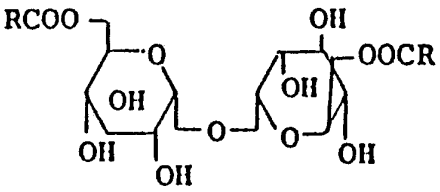

Bn ; Benzyl

| R | Smp ( °C) | $[\alpha]_D^{25}$ (c = 1,0 chloroform) | $IR_{max}^{KBr}$ $cm^{-1}$ | NMR (60 MHz, $CDCl_3$) δppm |
|---|---|---|---|---|
| $CH_3(CH_2)_6$ | Ölige Verbindung | +82.3 | 1735 | $0.86^t$ (6H), $1.26^m$ (20H), $2.26^t$ (4H, J = 7Hz), 3.2–$4.5^m$ (12H), $5.15^d$ (2H, J = 3.5Hz), $4.65^s$ (4H), $4.86^d$ (4H, 7.0–$7.5^m$ (20H) |
| $CH_3(CH_2)_8$ | Ölige Verbindung | +65.8 | 1740 | $0.88^t$ (6H), $1.25^m$ (28H), $2.30^t$ (4H, J = 7Hz), 3.2–$4.5^m$ (12H), $5.20^d$ (2H, J = 3.5Hz), $4.71^s$ (4H), $4.92^d$ (4H, 7.1–$7.6^m$ (20H) |
| $CH_3(CH_2)_{10}$ | Ölige Verbindung | +66.5 | 1740 | $0.88^t$ (6H), $1.21^m$ (36H), $2.23^t$ (4H, J = 7Hz), 3.2–$4.4^m$ (12H), $5.11^d$ (2H, J = 3.5Hz), $4.62^s$ (4H), $4.81^d$ (4H), 6.9–$7.3^m$ (20H) |

*Beispiel 4*

Die in der Tabelle 7 angeführten Verbindungen wurden in gleicher Weise wie in Beispiel 2 erhalten. Die Verbindungen gemäss Beispiel 2 sind in dieser Tabelle ebenfalls enthalten.

*Tabelle 7*




| R | Smp. (°C) | $[\alpha]_D^{20}$ (c = 1.0 (chloroform) | $IR\nu_{max}^{KBr}$ $cm^{-1}$ | NMR (60MHz, $CDCl_3$) δppm |
|---|---|---|---|---|
| $CH_3(CH_2)_6$ | 170–171 | +116.6 | 1735 | $0.90^t$ (6H), $1.12^m$ (20H), $2.28^t$ (4H, J = 7Hz), 3.8–$5.1^m$ (12H), $5.72^d$ (2H, J = 3.5Hz), $6.12^s$ (6H) |
| $CH_3(CH_2)_8$ | 157–163 | +108.8 | 1740 | $0.88^t$ (6H), $1.18^m$ (28H), $2.32^t$ (4H, J = 7Hz), 3.8–$5.2^m$ (12H), $5.78^d$ (2H, J = 3.5Hz), $6.08^s$ (6H) |
| $CH_3(CH_2)_{10}$ | 161–164 | +88.4 | 1730 | $0.88^t$ (6H), $1.22^m$ (36H), $2.30^t$ (4H, J = 7Hz), 3.8–$5.1^m$ (12H), $5.70^d$ (2H, J = 3.5Hz), $5.96^s$ (6H) |

*Beispiel 5*

Tabletten:

Eine Tablette, welche die unten angegebenen Bestandteile in der angegebenen Menge enthält, wurde in üblicher Weise hergestellt.

| | |
|---|---|
| Verbindung der Formel I (Decanoat) | 100 mg |
| D-Mannit | 150 mg |
| Kristalline Cellulose | 50 mg |
| Stärke | 28 mg |
| Calcium-carboxymethyl-cellulose | 16 mg |
| Talk | 4 mg |
| Magnesiumstearat | 2 mg |
| Total | 350 mg |

*Beispiel 6*

Kapseln:

Granulate, welche die unten angegebenen Bestandteile in der angegebenen Menge enthalten, wurden in üblicher Weise hergestellt und in Kapseln der Nr. 3 eingefüllt.

| | |
|---|---|
| Verbindung der Formel I (Caprylat) | 25 mg |
| Kristalline Cellulose | 17 mg |
| leichte wasserfreie Kieselsäure | 7 mg |
| Magnesiumstearat | 1 mg |
| Total | 50 mg |

*Beispiel 7*

Injektionslösung:

Eine Verpackungseinheit einer Injektionslösung wurde in üblicher Weise hergestellt. Dabei wurden die folgenden Bestandteile in den angegebenen Mengen verwendet.

| | |
|---|---|
| Verbindung der Formel I (Decanoat) | 25 mg |
| mit Olivenöl aufgefüllt auf | 1 ml |

*Beispiel 8*

Suppositorien:

Die unten angegebenen Bestandteile wurden in den angegebenen Mengen geschmolzen und gerührt. Die Schmelze wurde in üblicher Weise zu einem Stück eines Suppositoriums geformt und erstarren gelassen.

| | |
|---|---|
| Verbindung der Formel I (Laurat) | 100 mg |
| Kakaobutter | 1100 mg |
| gesamte Menge | 1200 mg |