



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11) **201 601**

Int.Cl.³ 3(51) C 07 H 17/06

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 07 H / 235 150 5	(22)	26.11.81	(44)	27.07.83
(61)	147 544				

(71)	siehe (73)
(72)	NAIR, VIJAY G.; BERNSTEIN, SEYMOUR; US;
(73)	AMERICAN CYANAMID CO; STAMFORD, US
(74)	PAB (PATENTANWALTSBUERO BERLIN) 1468358 1130 BERLIN FRANKFURTER ALLEE 286

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG NEUARTIGER RUTINNONA- UND -DECA(H)-SULFATSALZE

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren für die Herstellung von neuartigen Rutinpoly(H-)sulfaten der allgemeinen Formel, worin R Wasserstoff oder -SO₃A ist; jedes X -SO₃A ist; und A ein pharmazeutisch annehmbares Kation ist. Diese Rutinnona- und -deca(H-)sulfat-Natriumsalze besitzen in vitro eine unerwartet hohe Aktivität als Komplementinhibitoren. Formel

Verfahren zur Herstellung neuartiger Rutinnona- und -deca(H)-Sulfatsalze

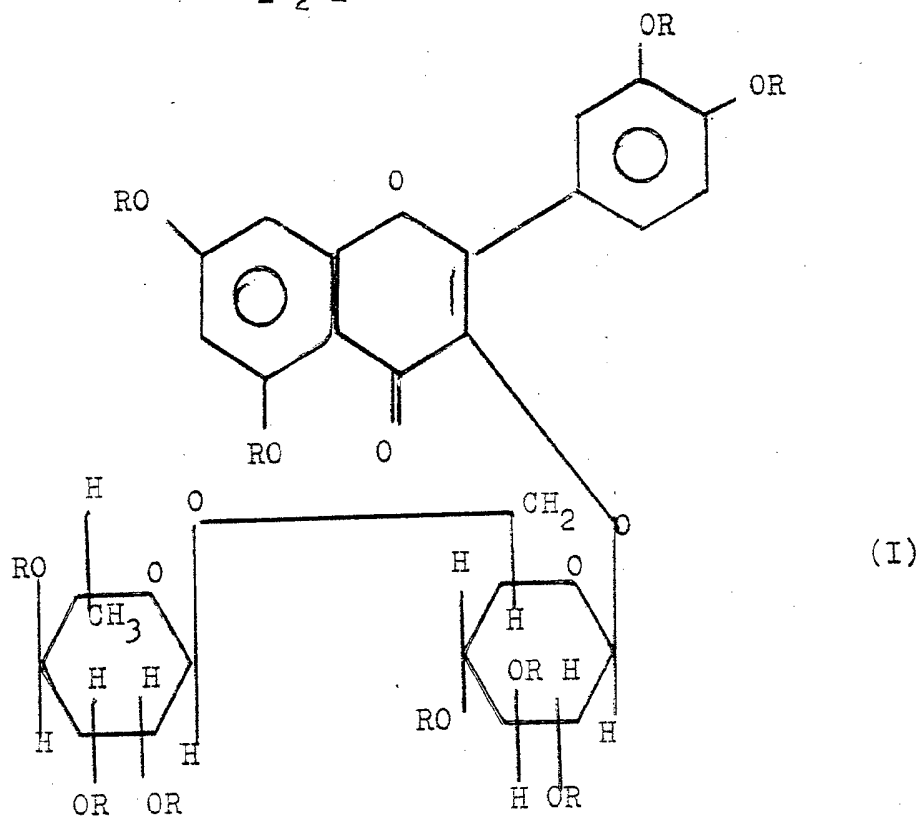
Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft neuartige Rutinpoly(H-)sulfatsalze, die eine sehr gute Wirksamkeit als Inhibitoren des Komplementsystems von Warmblütern besitzen.

Die Bezeichnung "Komplement" bezieht sich auf eine Komplexgruppen von Proteinen in Körperflüssigkeiten, die im Zusammenwirken mit Antikörpern oder anderen Faktoren eine wichtige Rolle als Überträgerstoffe immuner, allergischer, immunochemischer und/oder immunopathologischer Reaktionen spielen. Reaktionen, an denen ein Komplement beteiligt ist, laufen im Blutserum oder in anderen Körperflüssigkeiten ab und werden daher als humorale Reaktionen angesehen. Eine ausführliche Erläuterung des Komplementsystems ist in dem Hauptpatent 147544 zu finden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Im Hauptpatent ist dargelegt worden, daß Rutinpoly(H-)sulfatsalze der allgemeinen folgenden Formel (I) mit der Komplementreaktionssequenz in Wechselwirkung stehen und daher die Komplementaktivität in Körperflüssigkeiten inhibieren:



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

Es wird gleichfalls ein Verfahren zur Herstellung der im Rahmen der Formel (I) oben liegenden Rutinpoly(H-)sulfat-Alkalimetallsalze vorgestellt. In dem Verfahren wird Rutin oder so genanntes "wasserlösliches Rutin", bei dem es sich um ein Rutinsulfat-Natriumsalz handelt, das von E. Merck, Darmstadt, Westdeutschland, Katalognummer 500014, bezogen werden kann, in einem geeigneten Lösungsmittel mit einem Trialkylamin-Schwefeltrioxid-Komplex bei 50 bis 90 °C umgesetzt, und das resultierende Trialkylaminsulfatsalz isoliert und anschließend mit einem Alkalimetallacetat in wäßriger Lösung behandelt. Es gibt Beispiele für dieses Verfahren, bei denen Rutin oder wasserlösliches Rutin in Dimethylformamid mit einem Trimethylamin-Schwefeltrioxid-Komplex bei 65 bis 70 °C umgesetzt wird, das resultierende Trimethylaminsalz aus absolutem Ätha-

nol bei Raumtemperatur isoliert wird und anschließend mit wäßriger Natriumacetatlösung umgesetzt wird, um ein als "Rutinpoly(H-)sulfat-Natriumsalz" identifiziertes Produkt zu gewinnen, dessen Schwefelanalyse zwischen 15,3 und 16,5 % variiert. Durch Analyse konnte anschließend gezeigt werden, daß dieses Produkt etwa 85 % Rutinnona- und deca(H-)sulfatnatriumsalze in annähernd gleichen Mengen enthält, und die restlichen 15 % ein Gemisch von Hexa- bis Octa(H-)sulfatnatriumsalzen von Rutin sind. Von diesem Gemisch konnte auch nachgewiesen werden, daß es als Komplementinhibitor Aktivität besitzt, was im Gegensatz zu wasserlöslichem Rutin steht, bei dem durch die angewandten Tests keine Aktivität ermittelt werden konnte.

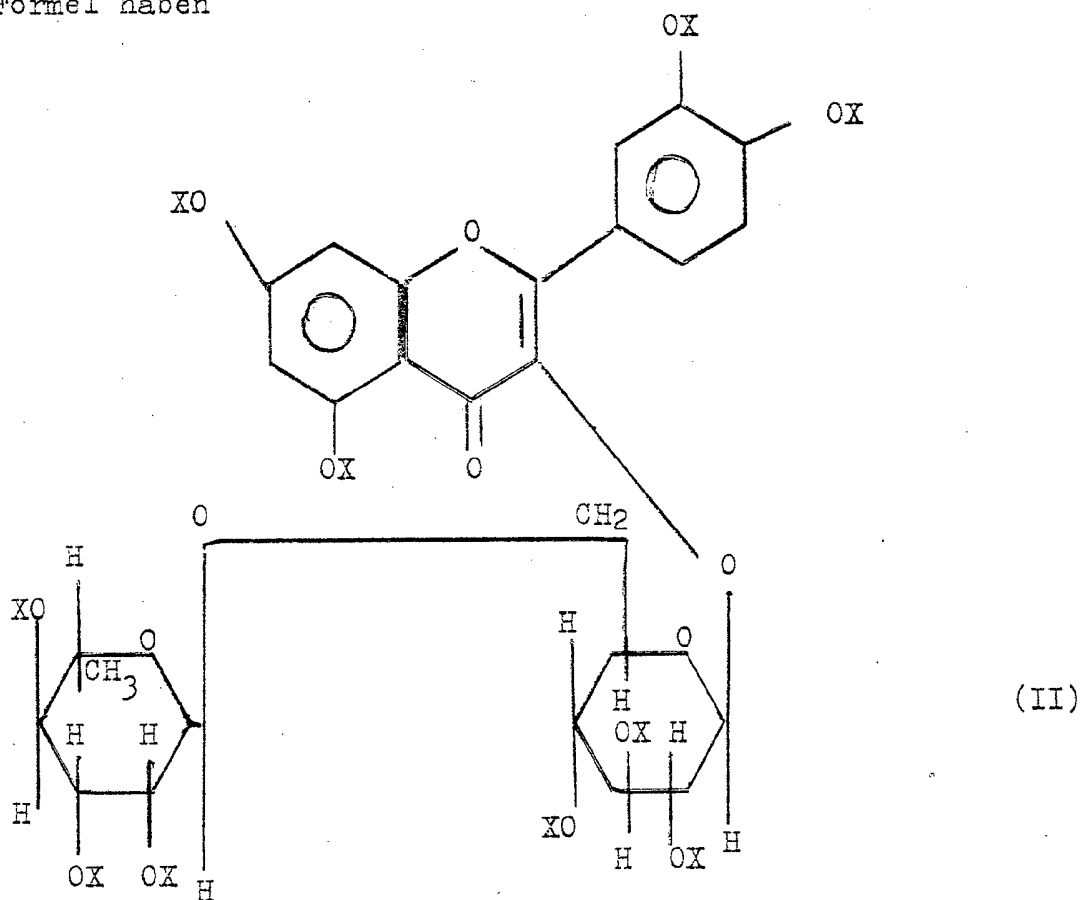
Darlegung des Wesens der Erfindung:

Es wurde jetzt gefunden, daß es durch Modifizierung des im Hauptpatent 1475⁴, supra, dargelegten Verfahrens für die Herstellung von Rutinpoly(H-)sulfatsalzen auf verschiedenen spezifischen Wegen möglich ist, Rutinnona(H-)sulfatsalze, die zumindest im wesentlichen frei von dem entsprechenden Deca(H-)salz sind, und gleichfalls Rutindeca(H-)sulfatsalze, die zumindest im wesentlichen frei von dem entsprechenden Nona-(H-)salz sind, herzustellen. Am überraschendsten war die Feststellung, daß die dabei gewonnenen im wesentlichen reinen Nona- und Decasalze eine wesentlich bessere Aktivität bei Komplement-Inhibitions-Tests als das Gemisch von Hexa- bis Decasalzen, die in den Beispielen des Hauptpatentes 1475⁴ hergestellt wurden, besitzen. Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, da bisher noch nicht bekannt war, daß zwei der fünf Komponenten der früher beschriebenen Mischungen einzeln für sich eine viel größere Aktivität als das aus allen fünf Komponenten bestehende Gemisch haben würden.

Mit der Bezeichnung "zumindest im wesentlichen frei" und ähnlichen hier benutzten Bezeichnungen soll ein Rutinnoma- (oder

-deca-)salz gemeint sein, das weniger als 10 Masse% des entsprechenden Deca- (oder Nona-)Salzes enthält. Tatsächlich ist es mit Hilfe der neuen erfindungsgemäßen Verfahren möglich, die Nona- und Decasalze mit einer Reinheit von 95 % oder besser zu gewinnen.

Bei den erfindungsgemäßen Rutindeca(H-)sulfatsalzen handelt es sich um neuartige Verbindungen, die die folgende allgemeine Formel haben



In der allgemeinen Formel (II) ist jedes X $-\text{SO}_3\text{A}$, worin A ein pharmazeutisch annehmbares Kation, vorzugsweise ein Alkalimetall, am besten Natrium, ist.

Die Rutindeca(H-)sulfatsalze können im wesentlichen frei von den entsprechenden Nonasalzen mit Hilfe eines Verfahrens herge-

stellt werden, das folgende Schritte umfaßt:

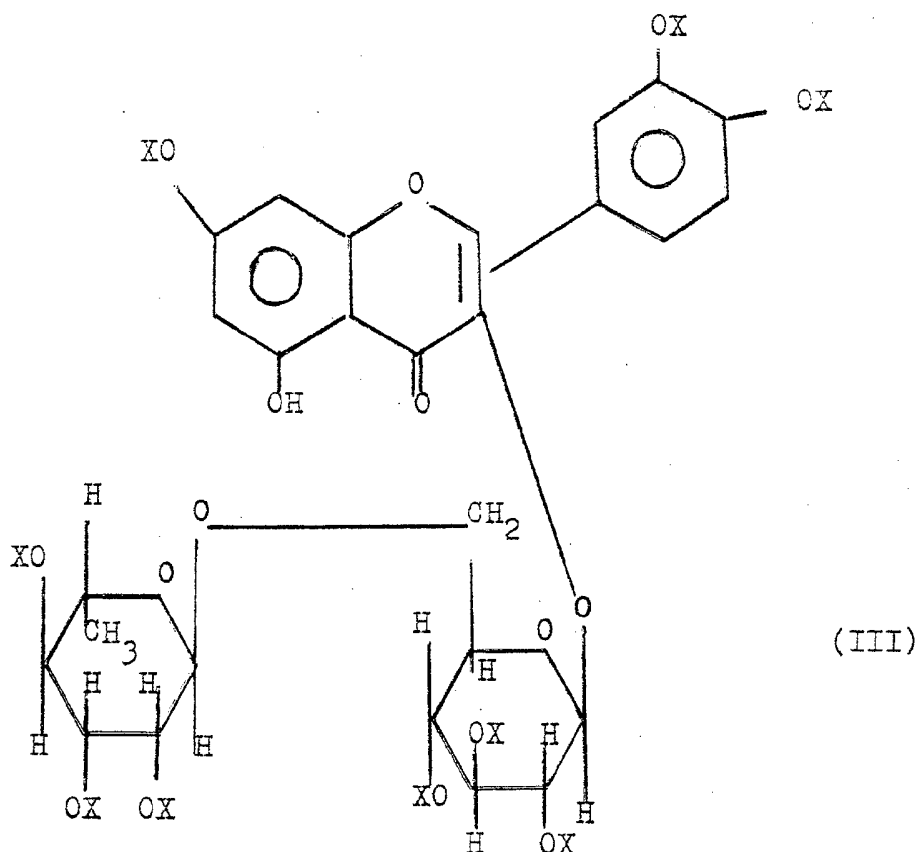
- (1) Umsetzung von Rutin oder einem Rutinpoly(H-)sulfat, das ein bis neun Sulfate aufweist, in einem geeigneten Lösungsmittel mit einem Triäthylamin-Schwefeltrioxid-Komplex bei 50 bis 90 °C;
- (2) Isolierung des resultierenden Triäthylaminsulfatsalzes von Aceton, das Amin enthält und unter Raumtemperatur gekühlt wird; und
- (3) Behandlung des isolierten Salzes von Schritt (2) mit einem pharmazeutisch annehmbaren Salzkation in wäßriger Lösung.

In diesem Verfahren ist die Verwendung eines Triäthylamin-Schwefeltrioxid-Komplexes als Sulfatierungsmittel für die Gewinnung des beabsichtigten reinen Deca-Salzes kritisch. Bisher konnte noch nicht ermittelt werden, warum das der Fall ist, aber in der Praxis wurde festgestellt, daß die Verwendung eines Trimethylamin-Schwefeltrioxid-Komplexes nach der Beschreibung im Hauptpatent 14754, supra, immer ein Gemisch der Hexa- bis Decasalze ergibt. Als Lösungsmittel für die Sulfatierungsreaktion kann beispielsweise Dimethylformamid verwendet werden, aber in Verbindung mit einem anderen Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde gefunden, daß N,N-Dimethylacetamid ein etwas reineres Produkt erzeugt, und daher wird es als das bevorzugte Lösungsmittel eingesetzt.

Ein weiterer kritischer Schritt in dem neuartigen Verfahren für die Herstellung von im wesentlichen reinen Rutindeca(H-)sulfatsalzen ist der Isoliervorgang. So wurde ermittelt, daß

das Triäthylaminsulfatsalz aus Aceton isoliert werden sollte, das bestimmte Mengen eines Amins, vorzugsweise eines tertiären Amins enthält, und zwar soviel, daß das Medium auf einem basischen pH-Wert, vorzugsweise auf einem pH-Wert von etwa 8 bis 9 gehalten wird, obwohl auch ein höherer pH-Wert akzeptiert werden kann. Dieses Amin ist vorzugsweise Triäthylamin. Diese Isolierung sollte bei niedrigen Temperaturen, am besten bei etwa 0 °C, erfolgen. Auch hierbei ist wieder nicht bekannt, warum diese Isolierungsverfahren kritisch sein sollten, aber aus der Erfahrung hat sich ergeben, daß sie für das erfindungsgemäße Verfahren erforderlich sind.

Die erfindungsgemäßen neuartigen Rutinnona-(H-)sulfatsalze können durch die folgende Formel (III) dargestellt werden:



In Formel (III) wurde jedes X bereits erläutert.

Die Rutinnona-(H-)sulfatsalze der Formel (III) können im wesentlichen frei von den entsprechenden Rutindeca(H-)sulfatsalzen mit Hilfe eines Verfahrens, das im wesentlichen die folgenden Schritte umfaßt, hergestellt werden:

(1) Umsetzung von Rutin oder einem Rutinpoly(H-)sulfat, das ein bis acht Sulfate aufweist, mit einem Triäthylamin-Schwefeltrioxid-Komplex in einem geeigneten Lösungsmittel bei 50 bis 90 °C;

(2) Isolierung des resultierenden Triäthylaminsulfatsalzes aus Aceton bei Umgebungstemperaturen; und

(3) Behandlung des isolierten Salzes von Schritt (2) mit einem pharmazeutisch annehmbaren Salzkation in wäßriger Lösung.

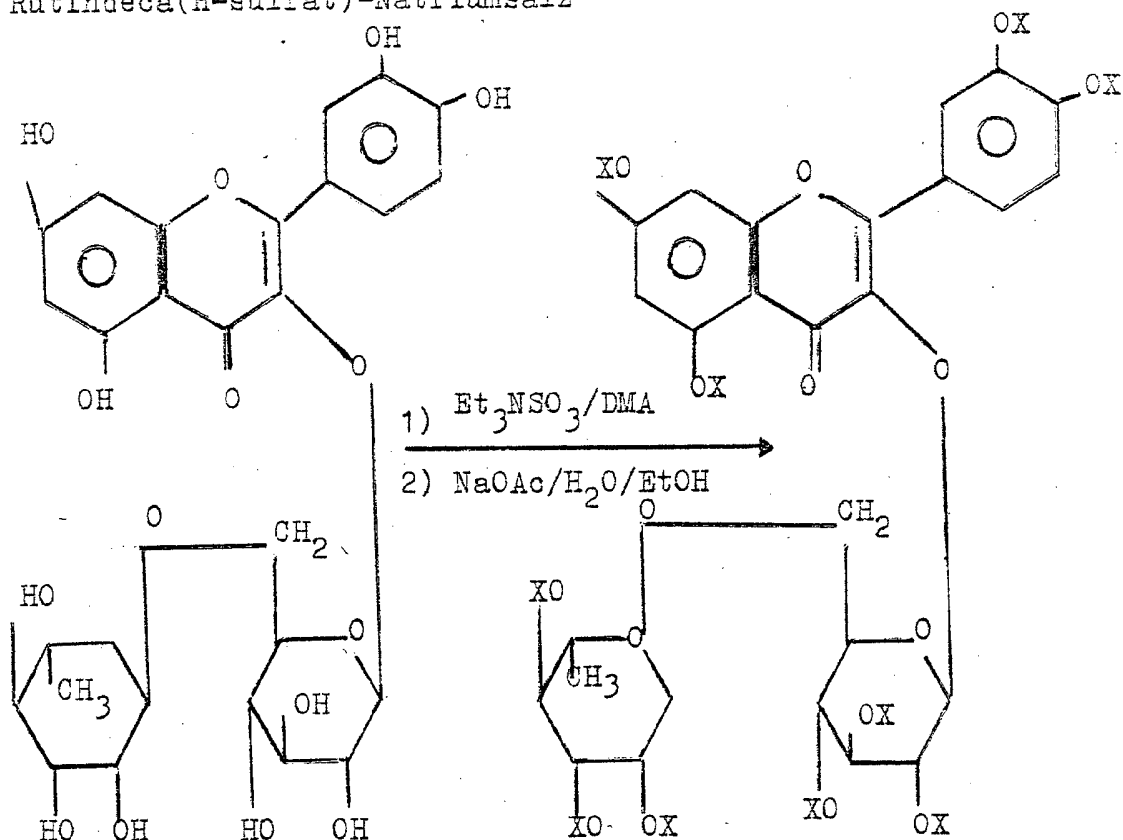
Dieses Verfahren für die Herstellung der im wesentlichen reinen Nonasalze unterscheidet sich von dem oben für die Herstellung von im wesentlichen reinen Decasalzen beschriebenen Verfahren hauptsächlich durch die angewandten Isolierungsvorgänge. So erfordert der Sulfatierungsschritt (1) auch wieder die Verwendung des Triäthylamin-Schwefeltrioxid-Komplexes als Sulfatierungsmittel, und auch N,N-Dimethylacetamid ist wieder das bevorzugte Lösungsmittelmedium für die Reaktion. Für den Isolierungsvorgang wird ebenfalls Aceton eingesetzt, aber im Gegensatz zu dem Verfahren für die Herstellung der Decasalze sollte das Aceton kein zugesetztes Amin enthalten. Außerdem ist es wichtig, die Isolierung möglichst bei Umgebungstemperaturen (etwa 20 bis 30 °C, am besten 25 °C) auszuführen.

In beiden erfindungsgemäßen Verfahren wird das aus der Acetonlösung isolierte Triäthylaminsulfatsalz anschließend mit einem pharmazeutisch annehmbaren Salzkation, das aus der Alkalimetalle, Erdalkalimetalle und Schwermetalle umfassenden Gruppe ausgewählt wurde, behandelt, um das entsprechende Rutinsulfatsalz zu gewinnen. Für diese Reaktion wird die Verwendung von Alkalimetallacetaten bevorzugt; besonders bevorzugt wird Natriumacetat.

Beispiele für die Herstellung der neuartigen erfindungsgemäßen Rutinpoly(H-)sulfatsalze werden anschließend zur Erläuterung gebracht.

Beispiel 1

Rutindecasulfat-Natriumsalz



$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$

M. Gew. 610,53

$\text{X} = \text{SO}_2\text{ONa}$

$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{O}_{46}\text{S}_{10}\text{Na}_{10}$

M. Gew. 1630,93

Triäthylaminschwefeltrioxid (70,2 g, 0,388 Mol) wird in N,N-Dimethylacetamid (245 ml) gelöst und Drierite (49 g) wird zugesetzt. Das Gemisch wird 20 Minuten lang auf 63 bis 65 °C erhitzt. Unter Schwenken wird dem Gemisch Rutin (5,95 g, 9,75 mMol) zugesetzt, und das Erwärmen auf 63 bis 65 °C wird 3 Stunden lang fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird danach rasch gekühlt und in Aceton (2,5 l), das Triäthylamin (15 ml) enthält, filtriert. Das abgetrennte Öl wird über Nacht bei etwa 0 °C zum Absetzen stehen gelassen. Die obenstehende Flüssigkeit wird abgegossen und das Öl mehrmals mit Aceton zur Entfernung von überschüssigem Triäthylaminschwefeltrioxid gewaschen.

Das ölige Produkt wird durch die Zugabe von Natriumacetatlösung (30 %ige, 40 ml) und destilliertem Wasser (50 ml) gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 20 Minuten lang stehen gelassen und anschließend filtriert. Das Filtrat wird unter kräftigem Rühren allmählich in Äthanol (2,3 l) gegeben. Das Rühren wird etwa 40 Minuten lang fortgesetzt. Das granulare Produkt wird filtriert, wiederholt mit Äthanol und danach mit Äther gewaschen und danach unter Vakuum bei Raumtemperatur 18 Stunden lang getrocknet. 14,5 g (91 %) gräuliches Pulver werden gewonnen.

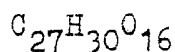
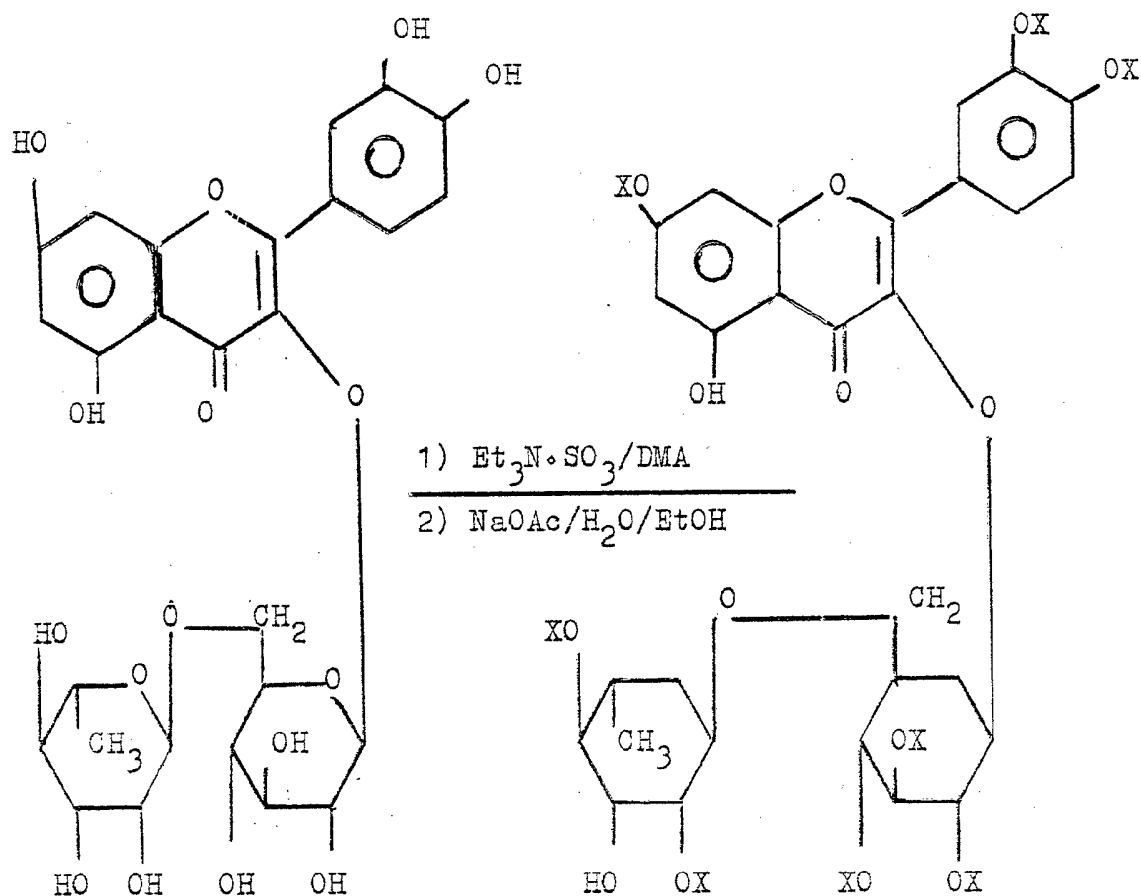
Berechnet für $C_{27}H_{20}O_{46}Na_{10}S_{10}$ (1630,93)

	C = 19,88,	H = 1,24,	S = 19,66,	Na = 14,10
gefunden	C = 18,98,	H = 2,05,	S = 18,25,	Na = 14,52
KF = 2,58 %				

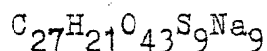
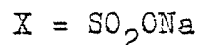
Durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie-Analyse wurde ermittelt, daß das Produkt 95 % \pm 1 % Rutindeca(H-)sulfat-Natriumsalz und nur 5 % \pm 1 % Rutinnona(H-)sulfat-Natriumsalz enthält.

Beispiel 2

Rutinnona(H-sulfat)-Natriumsalz



M. Gew. 610,53



M. Gew. 1528,61

Triäthylaminschwefeltrioxid (70,2 g, 0,388 Mol) wird in N,N-Dimethylacetamid (245 ml) gelöst und Drierite (49 g) wird zugesetzt. Das Gemisch wird 20 Minuten lang auf 63 bis 65 °C gehalten. Unter Schwenken wird Rutin (5,95 g, 9,75 mMol) zu dem Gemisch gegeben und das Erwärmen wird 3 Stunden lang bei 63 bis 65 °C fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird danach rasch abgekühlt und in Aceton (2,5 l) filtriert. Das abgetrennte Öl wird über Nacht bei Raumtemperatur zum Absetzen stehen gelassen. Die obenstehende Flüssigkeit wird abgossen und das

Öl mehrmals mit Aceton zur Entfernung von überschüssigem Tri-äthylaminschwefeltrioxid gewaschen.

Das ölige Produkt wird durch die Zugabe von Natriumacetatlösung (30 %ige, 40 ml) und destilliertem Wasser (50 ml) gelöst. Die Lösung läßt man bei Raumtemperatur 20 Minuten lang stehen, anschließend wird sie filtriert. Das Filtrat wird unter kräftigem Rühren allmählich in Äthanol (2,3 l) gegeben. Das Rühren wird etwa 40 Minuten lang fortgesetzt. Das granulare Produkt wird filtriert, wiederholt mit Äthanol und anschließend mit Äther gewaschen und danach unter Vakuum bei Raumtemperatur 18 Stunden lang getrocknet. 12,8 g (86 %) gelbes Pulver wurden gewonnen.

Berechnet für $C_{27}H_{21}O_{43}Na_9S_9$ (1528,61)

	C = 21,21,	H = 1,38,	S = 18,87,	Na = 13,58
gefunden	C = 19,87,	H = 2,61,	S = 17,33,	Na = 13,78
KF = 3,37 %.				

Nach der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie-Analyse enthält das Produkt 95 ± 1 % Rutinnona(H-)sulfat-Natriumsalz und nur 5 ± 1 % Rutindeca(H-)sulfat-Natriumsalz.

Die erfindungsgemäßen neuartigen Verbindungen zeigen eine erstaunlich hohe Komplement-Inhibitions-Aktivität, wie durch den Test Code 026 (C 1 Inhibitor) nachgewiesen wurde, bei dem die Fähigkeit von aktiviertem Komplement-Protein C1 gemessen wird, Human-Komplement-Protein C₂ in flüssiger Phase in Gegenwart von Komplement-Protein C4 bei entsprechenden Verdünnungen der Testverbindung zerstören zu können. Ein aktiver Inhibitor schützt C2 gegenüber C1 und C4. Die Ergebnisse dieses Tests mit den erfindungsgemäßen Verbindungen sind zusammen mit den

Ergebnissen des gleichen Tests mit einem Gemisch von nach Beispiel 2 des Hauptpatentes 14744, supra, hergestelltem Rutinnona(H-)sulfat-Natriumsalz und Rutindeca(H-)sulfat-Natriumsalz unten aufgeführt:

Verbindung	In vitro Aktivität <u>Test Code 026</u>
+Rutinpoly(H-)sulfat-Natriumsalz (Analyse S = 15,3 %)	+7
Rutindeca(H-)sulfat-Natriumsalz	+11
Rutinnona(H-)sulfat-Natriumsalz	+10
+Vergleichstest mit dem Gemisch	

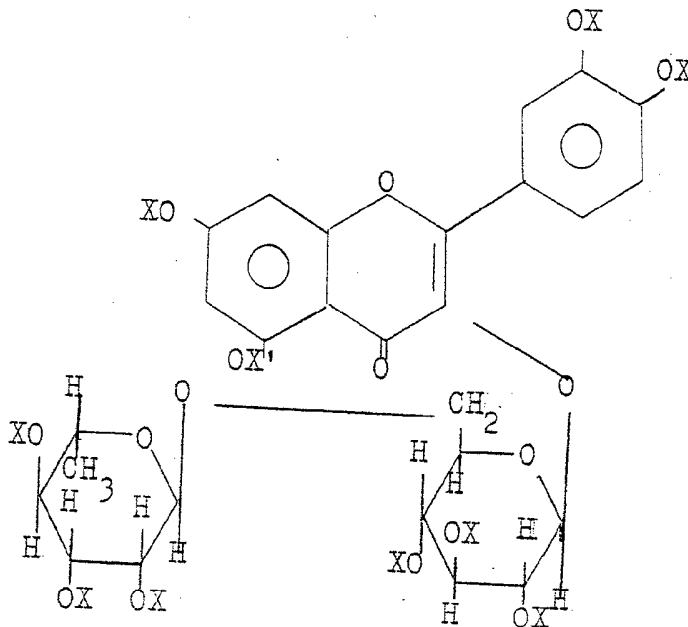
Bei diesem Test wird die Aktivität in Reagensgläsern mit Hilfe einer Serien-Verdünnungsbestimmung gemessen. Je höher die Reagensglasnummer, um so stärker ist die Aktivität. Die Serienverdünnungen erfolgten zweifach, so daß das erfindungsgemäße Rutindeca(H-)sulfat-Natriumsalz in dem oben erläuterten Test eine um das 16-fache stärkere Aktivität als das Gemisch von Hexa- bis Decasalzen aufwies, die nach Beispiel 2 des Hauptpatentes 14744 hergestellt worden waren, während die Aktivität des erfindungsgemäßen Rutinnona(H-)sulfatsalzes das 8-fache des genannten Gemischs beträgt. Diese Ergebnisse sind sehr überraschend und wichtig und konnten keinesfalls aus der Beschreibung des Hauptpatentes vorausgesagt werden.

Die Verabreichungsmethoden der erfindungsgemäßen Verbindungen und die Zubereitung passender Dosierungen und Formulierungen werden in dem Hauptpatent 147544 erläutert.

Es ist selbstverständlich, daß die erfindungsgemäßen Rutinsulfatsalze in verschiedenen Graden mit Wasser und Äthanol sulfatisiert werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel:



worin jedes $X - SO_3A$ ist, X' ein aus der $-SO_3A$ und H umfassenden Gruppe ausgewähltes Glied ist und A ein pharmazeutisch annehmbares Salzkation ist, nach Patent 147544, gekennzeichnet dadurch, daß das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- (a) Umsetzung von Rutin oder einem Rutinpoly(H-)sulfat mit einem Triäthylamin-Schwefeltrioxid-Komplex in einem geeigneten Lösungsmittel bei 50 bis 80 °C;
- (b) Isolierung des resultierenden Triäthylaminsulfatsalzes von einem geeigneten Lösungsmittel bei einer geeigneten Temperatur; und
- (c) Behandlung des isolierten Salzes mit einem geeigneten Kation in wäßriger Lösung.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß, wenn X' in dem Endprodukt $-SO_3A$ ist, das Rutinpoly(H-)sulfat in Schritt (a) 1 bis 9 Sulfate aufweist; und in Schritt (b) das Triäthylaminsulfatsalz aus Amin enthaltendem Aceton bei 0 bis 15 °C isoliert wird.

3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Amid Schritt (b) vorzugsweise Triäthylamin ist und die Temperatur in Schritt (b) vorzugsweise etwa 0 °C beträgt.

4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß, wenn X' in dem Endprodukt Wasserstoff ist, das Rutinpoly(H-)sulfat in Schritt (a) 1 bis 8 Sulfate aufweist; und in Schritt (b) das Triäthylaminsulfatsalz bei Umgebungstemperatur von Aceton isoliert wird.

5. Verfahren nach Punkt 2 oder 4, gekennzeichnet dadurch, daß das Lösungsmittel in Schritt (a) vorzugsweise N,N-Dimethylacetamid ist und das pharmazeutisch annehmbare Salzkation von Schritt (c) vorzugsweise Natrium ist.