



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

② PATENTSCHRIFT A5

⑪

643 550

②1 Gesuchsnummer: 2592/80

③3 Inhaber:
National Foundation for Cancer Research,
Bethesda/MD (US)

②2 Anmeldungsdatum: 02.04.1980

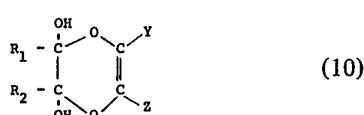
②2 Erfinder:
Gabor Fodor, Morgantown/VA (US)
Albert Szent-Györgyi, Woods Hole/MA (US)

②4 Patent erteilt: 15.06.1984

⑦4 Vertreter:
Ritscher & Seifert, Zürich

54) Cyclische Doppelhemiacetale von Endiolverbindungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und Arzneimittel.

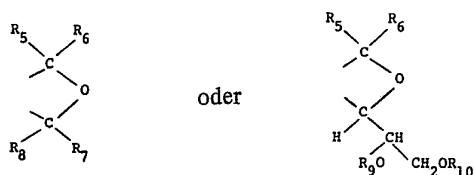
57) Verbindungen der Formel (10)



in der
 $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H, Alkyl, Cycloalkyl, Aryl, Arylalkyl}$ und
 $\text{Y, Z} = \text{H, Alkyl, Aryl oder zusammen jeweils einen}$
 $\text{zweiwertigen Rest der Formeln}$

Die Verbindungen (10) zeigen zytostatische, hypotensive und analgetische Wirkungen und sind, z.B. in Form entsprechender Zubereitungen, zur Behandlung von Krebs bei Tieren und Menschen brauchbar.

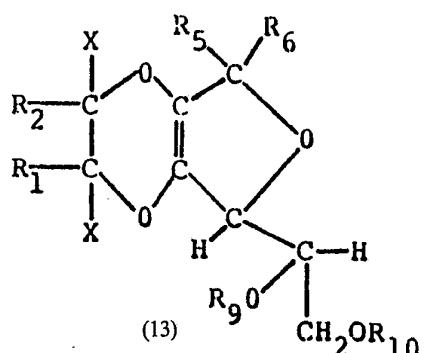
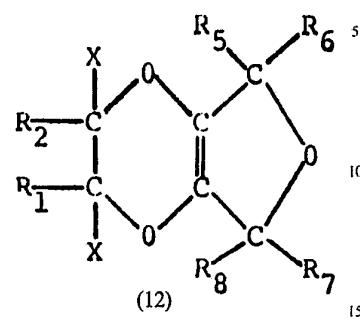
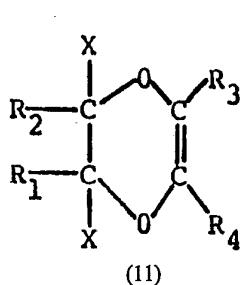
Die neuen Verbindungen sind erhältlich durch Vermischen eines Dialdehyds, α -Ketoaldehyds oder Diketons, wie Methylglyoxal oder ähnlichen Verbindungen, vorzugsweise in bestimmten Mengen, mit einem Endiol, wie L-Ascorbinsäure, oder einer in Endiol umwandelbaren Verbindung, wie einem Acyloin, vorzugsweise unter Stickstoffatmosphäre in Gegenwart eines die Reaktion nicht störenden Lösungsmittels.



bedeuten, worin R_5 bis R_{10} = H, Alkyl oder Aryl sind und R_5 zusammen mit R_6 auch die Oxygruppe =O darstellen kann.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verbindungen der Formeln (11), (12) oder (13):



in welchen R_1 und R_2 Wasserstoffatome oder Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl- oder Arylalkylgruppen sind, R_3 bis R_{10} Wasserstoffatome oder Alkyl- oder Arylgruppen sind, wobei R_5 und R_6 auch gemeinsam = O darstellen und X Hydroxyl ist.

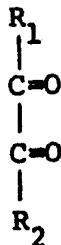
2. Verbindung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Formel (11).

3. Verbindung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Formel (12).

4. Verbindung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Formel (13).

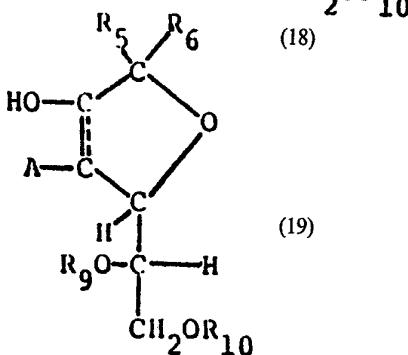
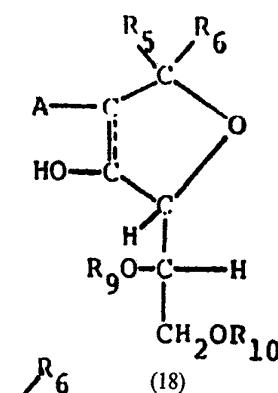
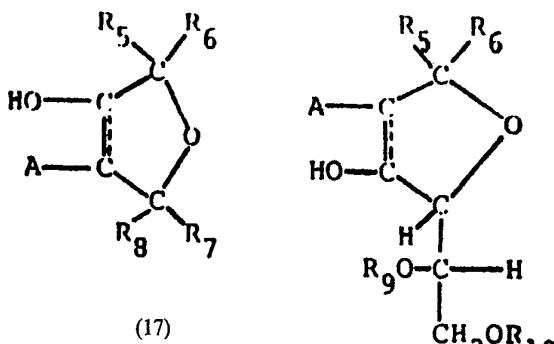
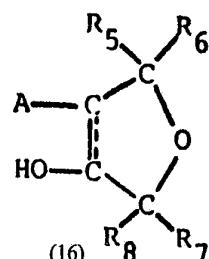
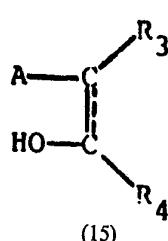
5. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formeln (11), (12) oder (13) nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Vermischen

a) eines entsprechenden Dialdehyds, α -Ketoaldehyds oder Diketons der Formel (14):



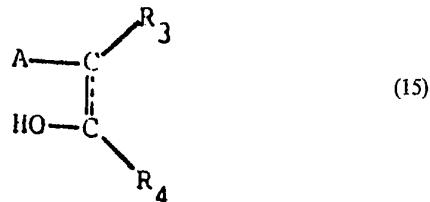
in der R_1 und R_2 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, mit

b) einer Endiol- oder Acyloinverbindung der Formeln (15) bis (19):



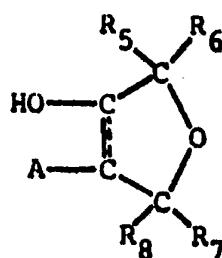
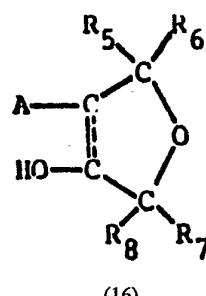
in welchen R_3 bis R_{10} die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, A = OH oder = O ist, und --- eine Doppelbindung bedeutet, wenn A = OH ist, und eine Einfachbindung darstellt, wenn A = O ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Endiol- oder Acyloinverbindung eine solche der Formel:



verwendet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Endiol- oder Acyloinverbindung eine solche der Formeln:



verwendet wird.

8. Pharmazeutisches Mittel, insbesondere zur Verwendung als Zytostatikum, Analgetikum oder Hypotensivum, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine Verbindung der Formeln (11), (12) oder (13) nach Anspruch 1 enthält.

9. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es jeweils 1 Gew.-Teil der Verbindung gelöst in 0,1 bis 100 Gew.-Teilen Wasser oder einer physiologisch verträglichen Lösung enthält.

10. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es jeweils 1 Gew.-Teil der Verbindung gelöst in 0,1 bis 100 Gew.-Teilen einer etwa 0,9 gew.-%igen Kochsalzlösung enthält.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verbindungen der in Anspruch 1 angegebenen Formeln 11, 12 oder 13, ein Verfahren zur Herstellung der neuen Verbindungen sowie pharmazeutische Mittel, insbesondere zur Verwendung als zytostatische, blutdrucksenkende und analgetische Mittel, welche die neuen Verbindungen enthalten.

Allgemein können die neuen Verbindungen nach dem in Anspruch 5 definierten Verfahren erhalten und in entsprechend gereinigter und steriler Form, z.B. als Lösungen, an Säger verabreicht werden, die Krebszellen beherbergen. Nach der Verabreichung wird das Krebsgewebe vom Ödemdruck entlastet und die weitere Tumorentwicklung unterbunden. Durch die Verabreichung kommt es allgemein zu einer Schmerzlinderung und zu einer Abnahme des Blutdruckes.

Seit vielen Jahren sucht man nach einer wirksamen Behandlung für alle Formen von Krebs. Trotz des grossen Interesses und zahlreicher wichtiger Entdeckungen ist der wesentliche Durchbruch in bezug auf Heilung oder Behandlung von Krebs bisher nicht gelungen.

Nach der von A. Szent-Györgyi stammenden bioelektronischen Theorie der Proteinwechselwirkungen (siehe Szent-Györgyi, A., „Electronic Biology and Cancer“, M. Dekker, New York, 1976) kann Methylglyoxal bei der Steuerung bzw. Unterbindung der Zellteilung wegen seiner Eigenschaften als starker Elektronenakzeptor eine wichtige Rolle spielen. Diese Verbindung tritt aufgrund ihrer aldehydischen Carbonylgruppe durch Angriff auf die primären Aminogruppen der Proteine in Wechselwirkung mit Proteinen. Unabhängig davon, ob diese Theorie tatsächlich zutrifft, kann eine derartige Regulierung der Zellteilung durch Methylglyoxal für die Entwicklung wirksamer chemotherapeutischer Mittel vorteilhaft sein. Methylglyoxal und die damit verwandten Verbindungen sind jedoch ³⁰ in vivo außerordentlich labil, und zwar wegen der Wirkung eines Glyoxalase-Enzymsystems, das diese in Gegenwart von reduziertem Glutathion in D-Milchsäure umwandelt. Dementsprechend würde wegen der Wirkung von Glyoxalase jeder *in vivo*-Test für die Wirkungen von Methylglyoxal auf die Zellteilung negative Ergebnisse liefern.

Nach Szent-Györgyi kann die bioelektronische Theorie den Krebs als eine Störung der Elektronenkonfiguration von Proteinen in Krebszellen (siehe Szent-Györgyi, „The Living State and Cancer“, im Druck) erklären; er geht dabei von der Annahme aus, dass Methylglyoxal und verwandte Verbindungen die richtige Proteinkonfiguration wiederherstellen und bewirken, dass die Krebszellen aus dem abnormalen Wucherzustand in den normalen Ruhezustand zurückkehren.

Die Verwendung eines von Methylglyoxalabgeleiteten Mittels zur Behandlung verschiedener Krebsformen wurde von Freireich *et al.* (siehe „Cancer Chemotherapy Reports“, Band 16, Seiten 183-186, 1962) untersucht. Diese Autoren berichten über klinische Untersuchungen mit Methylglyoxalbis(guanylhydrazone) bei Patienten mit akuter myelozytischer Leukämie und beobachteten bei dreizehn Patienten eine vollständige Remissionsfrequenz von 69%, wobei kein Zweifel in bezug auf die Antitumorwirkung dieser Verbindung gelassen wird; insbesondere deuten die Autoren darauf hin, dass alle damals gängigen Therapiemethoden nur eine 13%ig vollständige Remission erzielen konnten.

Ferner finden sich in der US-PS Nr. 2893912 Angaben, die zeigen, dass bestimmte cyclische Glyoxalverbindungen, z.B. Cyclohexylglyoxal, Benzylglyoxal usw., eine antivirale Aktivität haben. Angesichts von Hinweisen darauf, dass einige Formen von Krebs mit dem Auftreten von viralen Chromosomen in Krebszellen zusammenhängen, kann man spekulieren, dass diese Verbindungen möglicherweise zur Vorbeugung, Behandlung und Heilung von viralen Erkrankungen einschließlich einiger Formen von Krebs anwendbar sind.

In der US-PS Nr. 2927054 ist die Kondensation bestimmter Zuckerstoffe, z.B. Glucose, Mannose, Fructose usw., mit einem Aldehyd oder Keton zur Bildung cyclischer Acetale der Zuckerstoffe beschrieben. Der Mechanismus beruht offenbar auf der Eliminierung

von Wasser durch Vereinigung des Sauerstoffs der Carbonylgruppe des Aldehyds oder Ketons mit Wasserstoff aus jeder der beiden Hydroxylgruppen des Zuckers. Diese Kondensationsreaktion erfolgt beim Erwärmen der Mischung zum Siedepunkt des Aldehyds in Gegenwart eines sauren Acetylierungskatalysators, wobei die Bedingungen die offenkettige Form des Zuckers begünstigen. Die beiden benachbarten Kohlenstoffatome des cyclischen Acetalrings sind benachbarte Kohlenstoffe der aliphatischen Kette des Zuckermoleküls. Einige cyclische Acetalringe dieser Art können an demselben Zuckermolekül gebildet werden, und zwar unter Bildung von Poly(cycloacetalen).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung sind neue Verbindungen bzw. Zubereitungen, die zytostatische, blutdrucksenkende und analgetische Wirkungen zeigen, und Mittel, die zur Behandlung von Krebs und von überhöhtem Blutdruck sowie zur Schmerzbekämpfung wirksam sind. Aufgabe der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von neuen Verbindungen, die sich als bzw. für Antitumormittel, als Mittel zur Verminderung des Blutdrucks und als Analgetika eignen.

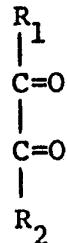
²⁰ In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 das Kohlenstoffkernresonanzspektrum (CMR) der Produkte der Umsetzung von L-Ascorbinsäure mit Methylglyoxal,

Fig. 2 das CMR-Spektrum der Produkte der Umsetzung von L-Ascorbinsäure mit Phenylglyoxalhydrat, und

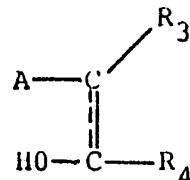
Fig. 3 das CMR-Spektrum der Produkte der Umsetzung von L-Ascorbinsäure mit Glyoxal.

Die neuen Verbindungen gemäß der Erfindung sind erhältlich durch Vermischen der erforderlichen Mengen eines Dialdehyds, α -Ketoaldehyds oder Diketons der Formel:



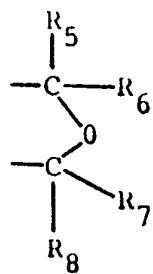
14

⁴⁰ in der R_1 und R_2 Wasserstoff, Alkyl, Cycloalkyl, Aryl oder Arylketyl sind, mit einer Acyloin- oder Endiolverbindung der Formel:

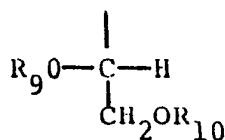


15

⁴⁵ in der $A - OH$ oder $= O$ sein kann, und $=$ eine Doppelbindung bedeuten kann, wenn $A - OH$ ist, und eine Einfachbindung bedeutet, wenn $A = O$ ist, und worin R_3 und R_4 Wasserstoff, Alkyl oder Aryl sind, oder worin R_3 und R_4 der Endiolreaktionskomponente gemeinsam die Gruppe:

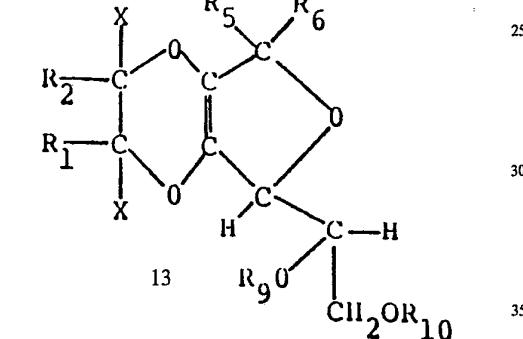
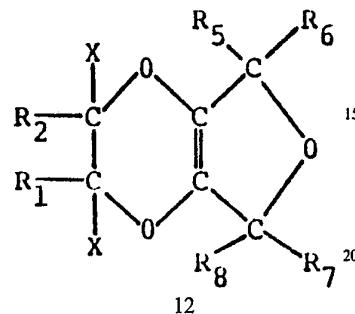
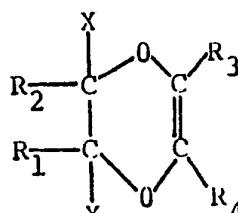


⁵⁵ darstellen, in der R_5 bis R_8 Wasserstoff, Alkyl oder Aryl sind, wobei R_5 und R_6 gemeinsam $= O$ darstellen können; R_8 kann die Gruppe:



darstellen, in der R_9 und R_{10} Wasserstoff, Alkyl oder Aryl sind; zur Umsetzung lässt man die Mischung vorzugsweise unter Stickstoffatmosphäre bei etwa Raumtemperatur in wässrigem Medium mit einem wasserlöslichen Cosolvens reagieren.

Die so erhältlichen neuen cyclischen Doppelhemiacetale entsprechen den Formeln:



wobei R_1 und R_2 Wasserstoff, Alkyl, Cycloalkyl, Aryl oder Arylalkyl sind, X Hydroxyl ist, und R_3 bis R_{10} Wasserstoff, Alkyl oder Aryl sind, wobei R_5 und R_6 auch gemeinsam = O darstellen.

Wenn als Reaktionskomponenten im vorliegenden Verfahren entweder Methylglyoxal, Glyoxal oder Phenylglyoxal und L-Ascorbinsäure verwendet werden, zeigt sich die Umsetzung meist durch eine Abnahme des Jodreduktionsvermögens der L-Ascorbinsäure von 15,0 bzw. 25% des jeweiligen Ausgangswertes. Die gereinigten Reaktionsprodukte können z.B. durch Eindampfen unter vermin- dertem Druck und folgendem Waschen mit einem Lösungsmittel oder mit Lösungsmitteln, durch Säulenchromatografie und gegebenenfalls Gefriertrocknung isoliert werden.

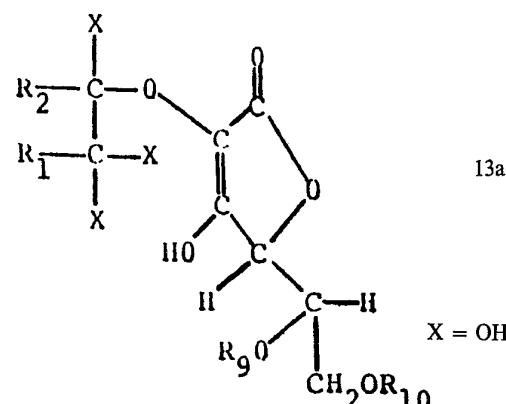
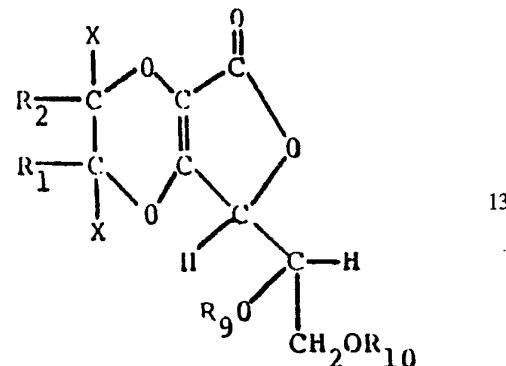
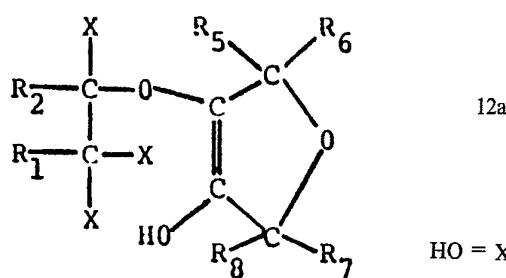
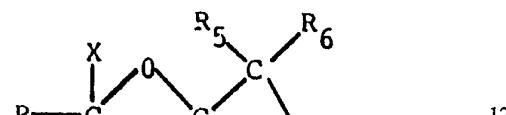
Methylglyoxal, Glyoxal und Phenylglyoxalhydrat können in technisch erhältlicher oder in gereinigter Form für das vorliegende Verfahren verwendet werden.

Die Kohlenstoffmagnetresonanzspektren (CMR) im Carbonyl- bereich zeigen eine Anzahl von unterschiedlichen Lactoncarbonyl- absorptionen (siehe Fig. 1, 2 und 3).

Was die chemischen Eigenschaften der neuen Verbindungen 11, 12, 13 betrifft, zeigen die Ergebnisse der gaschromatografisch bzw. massenspektroskopischen Analyse der Reaktionsprodukte cyclische Doppelhemiacetale von Methylglyoxal, Glyoxal und Phenylglyoxalhydrat sowie L-Ascorbinsäure mit Silylierungsmitteln, wie N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid, in allen Fällen eine Spaltung in Tetra-O-bistrimethylsilylascorbaten. Dies deutet klar darauf hin, dass a) die Reaktion reversibel ist, b) keine strukturelle Veränderung der L-Ascorbinsäure auftritt, und c) das Trimethylsilylierungsmit- tel als Einschlussmittel für die L-Ascorbinsäure dient. Ferner wird mit Semicarbazid das Pyruvinaldehydsemicarbazone gebildet und führt die oxidative Spaltung mit Natriumperiodat von mit Natriumbicarbonat gepufferten Proben zu einem Verbrauch von

2 Eq an Periodat, was zwei vizinalen Diolgruppierungen pro Molekül entspricht.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die enolischen Hydroxylgruppen (in den Positionen 2 und 3) der umgesetzten L-Ascorbinsäure mit dem Aldehydcarbonyl von Methylglyoxal, Glyoxal und Phenylglyoxalhydrat sowie deren Ketoncarbonylgruppen eine Reihe von cyclischen Doppelhemiacetalen liefert, die in geringem Ausmass in tautomerem Gleichgewicht mit dem offenkettigen Hemiacetal 12a, 13a in Lösung stehen können.



Ausführliche typische Analysedaten für die Methylglyoxal-, Glyoxal- und Phenylglyoxalhydrat-Verbindungen sind in den Beispielen angegeben. Diese Befunde stimmen mit denen einer physikalischen Mischung aus L-Ascorbinsäure und Methylglyoxal nicht überein, weil eine solche Mischung mindestens 3 mol Natriumperiodat verbrauchen müsste. Es ist zu bemerken, dass die L-Ascorbinsäure selbst 2,21 Eq an Natriumperiodat verbraucht, während Methylglyoxal 1,29 mol hiervon verbraucht.

Eine Überoxidation durch das Periodat könnte für den Verbrauch von mehr als 2 bzw. 1 Eq an Natriumperiodat verantwortlich sein, wie dies für L-Ascorbinsäure bzw. Methylglyoxal zu erwarten wäre.

Beispiel 1:

Ein 2-l-Einhalsrundkolben, der mit Aluminiumfolie bedeckt war, wurde mit 68 g (0,386 mol) L-Ascorbinsäure beschickt. Hierzu wurden in der Folge 1 l Tetrahydrofuran (analytisch rein, Firma Mallinckrodt; durch Rühren mit neutralem Aluminiumoxid und Absaugfiltration von Peroxiden befreit), 340 ml (mit Stickstoff gespültes) destilliertes Wasser und 268 g Methylglyoxal in Form einer 40%igen wässrigen Lösung (Firma Aldrich, Nr. 17, 733-4) zugegeben. Der Kolben wurde verschlossen und bei Raumtemperatur (23°C) 4 d geführt.

Aliquate Anteile von jeweils 0,1 ml wurden genommen, mit jeweils 1 ml Wasser verdünnt und mit 0,1 ml Jodlösung in Tetrahydrofuran (THF) titriert. Wenn die Jodreduktion die Asymptote erreicht (0,26 mol), wird die Umsetzung als vollständig angesehen.

Das Lösungsmittel der Reaktionsmischung wurde in einem Drehverdampfer bei 15-20 mm Druck (Wasserbad, Temperatur $\geq 35^\circ\text{C}$) unter Verwendung einer Vakuumpumpe mit einem Vakuum $\geq 0,4$ mm abgedampft und das Produkt schliesslich bei 200 μ der Gefrieretrocknung unterzogen. Der erhaltene gelbe Syrup wurde 3 d bei 10 μ getrocknet. Der entstandene gelbe Schaum wurde mit einer Lösung von 400 ml wasserfreiem Ethylacetat (getrocknet über P_2O_5 bei Raumtemperatur während 12 h und destilliert bei atmosphärischem Druck unter Ausschluss von Feuchtigkeit) und 1 l wasserfreiem Benzol (getrocknet über Natrium bei Raumtemperatur während 12 h und destilliert bei atmosphärischem Druck unter Ausschluss von Feuchtigkeit) behandelt und auf -15°C abgekühlt. Nach 2 d wurde die Lösung vom Feststoff abgegossen. Das erhaltenen feste Material wurde 3 d bei 15 μ gefriergetrocknet. Der so gewonnene weisse voluminöse Feststoff wurde gegebenenfalls weiter gereinigt (wenn zur Entfernung von L-Ascorbinsäure erforderlich) und zwar durch Auflösung in 800 ml einer 1:1-Mischung aus wasserfreiem Ethylacetat (wie oben) und wasserfreiem Cyclohexan (über Natrium bei Raumtemperatur während 12 h getrocknet und bei atmosphärischem Druck unter Ausschluss von Feuchtigkeit destilliert), Kühlen während 24 h auf 0°C , Absaugen des Feststoffes, Eindampfen des Filtrats während 15-20 min (Wasserbad, 35°C) und Gefrieretrocknung während 24 h.

In jedem der beiden Fälle wurde die gegebenenfalls mit 5-10% L-Ascorbinsäure verunreinigte bzw. die von L-Ascorbinsäure freie komplexierte Verbindung von Methylglyoxal und Ascorbinsäure von matrixgebundenen Lösungsmitteln durch Kühlen auf die Temperatur von Trockeneis oder flüssigem Stickstoff und Gefrieretrocknung (15 μ) sechsmal während 3 d befreit.

Bezogen auf L-Ascorbinsäure betrug die Ausbeute an der mit 5-10% Ascorbinsäure verunreinigten Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung 95-100 g, Fp. 58-62°C. Die Ausbeute an der von L-Ascorbinsäure freien Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung betrug 80-85 g (90-96%), Fp. 52-54°C.

Beispiel 2:

15,2 g (0,10 mol) Phenylglyoxalmonohydrat wurden zu einer Lösung von 17,6 g (0,10 mol) L-Ascorbinsäure in einer Mischung von 500 ml sauerstofffreiem destilliertem Wasser und 500 ml Tetrahydrofuran (wie in Beispiel 1) unter Stickstoffatmosphäre gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Stickstoff im Dunkeln 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Ausweislich der Titration aliquoter Anteile wie in Beispiel 1 wurden in der Reaktion 75% der anfänglich vorliegenden L-Ascorbinsäure verbraucht und die Umsetzung bei diesem Punkt als vollständig angesehen. Die Umsetzung wurde dann durch Entfernung des Wassers in einer Gefrieretrocknungsanlage abgebrochen und der 30 g wiegende Rückstand einer weiteren Reinigung an einer mit Cellulose gefüllten Kolonne unterzogen.

Beispiel 3:

Eine Lösung von 11,6 g (0,1 mol) des Endiol- γ -lactons von Dihydroxyacetoessigsäure ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$), Fp. 153°C (hergestellt nach Micheel und Jung, „Chem. Ber.“, 66b (1933), 129), wurde unter 5 Stickstoff in eine Mischung aus 10 ml Tetrahydrofuran und 56 ml Wasser gelöst. Dann wurden 36 ml einer 40%igen wässrigen Methylglyoxalösung (0,2 mol) zugegeben und die Umsetzung durch Jodtitration von abgezogenen Proben verfolgt. Nach praktischer Vervollständigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung des 10 Hemiacetalhemiketals des Endiolactons (5,6-Bisnorascorbinsäure) in einer Gefrieretrocknungsanlage 3 d bei 15 μ eingedampft und an einer mit Cellulose gefüllten Säule gereinigt. Die Ausbeute betrug nach der Chromatografie 18 g (61%).

Die Umsetzungen der Beispiele 1 bis 3 wurden in wässrigen 15 Medien in Gegenwart eines der Reaktion nicht störenden Cosolvens (THF) durchgeführt. Die Anwesenheit eines Cosolvens ist aber für das Ablaufen der Reaktion nicht unbedingt erforderlich. Die erfundungsgemäss Hemiacetalverbindungen mit 6gliedrigem Ring werden in wässrigen Medien zusammen mit Acetalverbindungen 20 mit 5gliedrigem Ring gebildet. Es wird angenommen, dass das Cosolvens die Umsetzung in Richtung auf die Bildung des Hemiacetals gegenüber der Acetalverbindung begünstigt, aber das Mass, in welchem das Cosolvens das Gleichgewicht verändert, ist zur Zeit noch nicht ausreichend geklärt.

Analysen:

100 mg der Verbindungen der Beispiele 2 und 3 wurden mit 2 ml N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (Firma Pierce) bei Raumtemperatur 4-7 d lang behandelt und das Reagens unter Hochvakuum entfernt. Das zurückbleibende Material wurde 24 h bei 10-15 μ getrocknet. Für die Durchführung der gaschromatografischen 30 bzw. massenspektrographischen Analyse wurde zur Bildung einer Lösung ausreichender Konzentration ein geeignetes wasserfreies organisches Lösungsmittel, wie Benzol, verwendet.

Periodatoxidation von Acetalen und cyclischen Doppelhemiacetalen von L-Ascorbinsäure:

Die Verbindungen waren wie folgt behandelt: Zunächst wurden 40 die Stoffe bis zur Gewichtskonstanz in einer Gefrieretrocknungsanlage getrocknet. Alle Oxidationen und Titrationen wurden unter Stickstoff durchgeführt. Aliquate Anteile von 500 ml einer 0,020N Lösung der Verbindungen wurden mit annähernd 10,0 ml einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung (ergibt einen pH-Wert von 7,20) versetzt und dann mit genau 20,0 ml Natriumarsenitlösung (0,085N) 45 behandelt. Dann wurde eine Natriumperiodatlösung (0,040N, 5,00 ml) und nachfolgend annähernd 1,50 ml einer 20%igen Kaliumjodidlösung zugegeben. Der pH-Wert betrug dann immer noch 7,20. Die Oxidation wurde 15 min unter Stickstoff und gedämpftem Licht sich selbst überlassen und dann das überschüssige Natriumarsenit mit 0,070N Jodlösung behandelt, bis die Lösung gerade gelb wurde (oder bei Verwendung von Stärke als Indikator bis zum Auftreten der ersten bleibenden Blaufärbung). Zur Korrektur des Volumens des verwendeten Jods wurde eine Nullprobe gemacht. Im Gegensatz zu den Vollacetalen mit 5gliedrigem Ring, die etwa 1 mol 55 Natriumperiodat verbrauchen, verbrauchen die Doppelhemiacetale gemäss der vorliegenden Erfahrung mehr als 2 mol.

(Tabelle nächste Seite oben.)

Bestimmung von Formiat und Acetat bei der Oxidation von Ascorbinsäure-Methylglyoxal-Verbindung:

Die Periodatoxidation gemäss obigen Angaben wurde unter 10maliger Vergrösserung des Bezugswertes mit einer Reaktionsdauer von 15 min durchgeführt und die Umsetzung durch Zusatz 65 von überschüssigem Natriumborhydrid abgebrochen. Die Reaktionsmischung wurde dann mit verdünnter Schwefelsäure (2N) auf pH 6 angesäuert. Nach Vakuumdestillation und Abfangen der Säuren wurde das Destillat mit Natriumcarbonat basisch gestellt

| Verbindung | verwendet (mol) | gefunden (mol) | verwendete Anzahl Periodat- Äquivalente |
|---|--------------------|-------------------|--|
| Methylglyoxal | 0,065 | 0,084 | 1,29 |
| L-Ascorbinsäure (1 Eq Methylglyoxal zugegeben) | 0,059 | 0,131 | 2,21 |
| L-Ascorbinsäure | 0,140 | 0,323 | 2,21 |
| L-Ascorbinsäure-Methylglyoxal-Verbindung | 0,074 | 0,178 | 2,38 |
| L-Ascorbinsäure-Glyoxal-Verbindung | 0,200 | 0,408 | 2,04 |
| L-Ascorbinsäure-Crotonaldehyd-Verbindung | 0,195 | 0,267 | 1,36 |
| L-Ascorbinsäure-Maleinaldehyd-Verbindung | 0,153 | 0,190 | 1,24 |
| Mannit | 0,039 | 0,226 | 1,15 |

und das Wasser in einer Gefriertrocknungsanlage vollständig entfernt. Dann wurde das Protonenmagnetresonanzspektrum des gefriergetrockneten Materials aufgenommen; es wurden Resonanzen bei 1,90 ppm und 8,41 ppm (im Verhältnis zu DDS als Innenstandard) festgestellt, die dem Acetat (CH_3) bzw. Formiat (CH) zugeschrieben werden. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Alkalihydrolyse des Enolacetatformats sowie der Reduktion von Periodat und Iodat einerseits und dem entstehenden Formaldehyd und C_5 -Aldehyd andererseits.

Ein kleiner Teil der gefriergetrockneten basischen Lösung wurde in möglichst wenig Wasser gelöst und mit Salzsäure neutralisiert. Dann wurde 2-Benzyl-2-thiopseudooharnstoffhydrochlorid zugegeben und das S-Benzylthiuroniumacetat bzw. -formiat durch Ausfällen und Wiederauftauern gefällt.

Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (hergestellt wie in Beispiel 1):

Analysedaten:

$[\alpha]_{D}^{25} = 11,0^\circ$ (C, 1,82), bestimmt als 20 mg Probe in 0,1 mol H_2O und 1 ml THF.

UV-Absorption mit Perkin Elmer, Modell 141, Zelle mit 2 mm Weglänge:

UV (Ethylacetat): δ 246 (log $\epsilon = 2,99$); 250 (2,92); 255 (2,76); 257 (2,76); 265-280 (2,64); 308 (2,34).

Analyse mit Jasco, Modell ORD/UV-5:

IR (Film): 3450, 1775, 1645 cm^{-1}

NMR-Spektrum mit Perkin Elmer 137:

(CD_3COCD_3 , TMS) δ 2,45; 2,59 (5 CH_3 , 4,52-4,66 (CH_2O , CHO , $\text{C}_2-\text{CH}-\text{O}$), verdunkelt durch OH : 3,00-6,00, 5,25-5,28 (O_2CH)).

CMR-Spektrum mit Variant CFT 20:

(CD_3COCD_3 , TMS): δ 18,00, 19,50, 19,89, 20,28, 22,35 (5 CH_3); 170,31, 171,14, 171,98, 172,10, 173,45 ($\text{OCOC} = \text{C}$).

Mikroanalyse (Galbraith Laboratories, USA) berechnet für:

$\text{C}_{9}\text{H}_{12}\text{O}_8$: C 43,55 H 4,84 O 51,61%

Gefunden: C 43,87 H 6,14(!) O 51,25%

Molekulargewicht (osmometrisch) (Galbraith) berechnet: 248, gefunden (Ethylacetat): 250.

Schmelzpunkt: = Fp. 58-62° (Ascorbinsäure vorhanden), 52,54° (frei von Ascorbinsäure).

Glyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (hergestellt wie in Beispiel 2; 0,1 mol Glyoxal):

Analysedaten:

$[\alpha]_{D}^{25} = 8,2$ (C, 1,82), bestimmt als 20 mg Probe in 0,1 ml H_2O und 1 ml THF.

UV-Analyse mit Perkin Elmer Modell 141, Zelle mit 2 mm Weglänge:

UV (Ethylacetat): δ 246 (log $\epsilon = 3,95$); 275 (2,64); 285 (2,34).

Analyse mit Jasco Modell ORD/UV-5:

IR (Film): 3500-3200, 2950, 2880, 1775, 1690, 1645 cm^{-1} .

NMR-Spektrum mit Cary 14: (CD_3COCD_3 , TMS): δ 4,54, 4,59 (CH_2O , CHO , $\text{C}_2-\text{CH}-\text{O}$), 4,63, 4,94, 5,24 (O_2CH).

CMR-Spektrum mit Variant CFT 20: (CD_3COCD_3 , TMS): δ

55,0-99,0 (CH , CH_2), 173-174 ($\text{O}_2\text{C} = \text{O}$).

Mikroanalyse (Galbraith Laboratories, USA) berechnet für:

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_6$: C 41,03 H 4,30 O 54,67%

Gefunden: C 41,28 H 4,53 O 54,70%

Schmelzpunkt = Fp. 62-66°.

Phenylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (hergestellt wie in Beispiel 2):

Analysedaten:

$[\alpha]_{D}^{25} = 11,8$ (C, 1,82), bestimmt als 20 mg Probe in 0,1 ml H_2O und 1 ml THF.

UV-Analyse mit Perkin Elmer, Modell 141, Zelle mit 2mm Weglänge:

UV (Ethylacetat): δ 248 (log $\epsilon = 3,04$).

Analyse mit Jasco, Modell ORD/UV-5:

IR (Film): 3450, 3000, 2900, 1790, 1700 cm^{-1} .

NMR-Spektrum mit Cary 14: (CD_3COCD_3 , TMS): δ 55,0-99,0 (CH , CH_2); 140-150 (C_6H_5); 171-175 ($\text{O}_2\text{C} = \text{O}$).

CMR-Spektrum mit Variant CFT 20:

Mikroanalyse (Galbraith Laboratories, USA) berechnet für:

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_7$: C 57,14 H 4,80 O 38,06%

Gefunden: C 57,30 H 4,93 O 37,90%

40 Schmelzpunkt: Fp. 70-72°.

Toxizität:

Gereinigte Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung wurde an Mäusen durch einmalige intraperitoneale (i.p.) Injektion getestet und ergab LD₅₀-Werte von über 5 g/kg.

Tierversuche:

Bei Versuchen mit Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung wurden Ratten mit 25% Urethan i.p. anästhesiert und die Halsvene sowie die Karotisarterie angezapft. Die zu testenden Verbindungen wurden intravenös (i.v.) verabreicht und der Blutdruck mit einem Messwertwandler gemessen, der an der Karotiskanüle befestigt war. Es wurde gefunden, dass die Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung einen Abfall sowohl des systolischen als auch des diastolischen

Druckes innerhalb von 10 min nach Beginn der Infusion von 500 mg/kg während einer Dauer von 15 min erzeugte. Pulsierende Injektionen der Verbindung ergaben einen vorübergehenden Abfall des Blutdruckes mit nachfolgendem Reflexanstieg, Bradykardie und langsamen nachfolgendem Absinken des Druckes unter die Vergleichswerte. Diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung in relativ hohen Dosen hypotensive Wirkungen hat.

60 Wirkungen auf Leber- und Nierenfunktion:

Ratten wurden i.p. mit der Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (500 mg/kg) gegen ein äquivalentes Volumen an physiologischer Kochsalzlösung (0,85 Gew.-/Vol.-%) zur Untersuchung auf signifikante Schäden an Leber und Nieren behandelt. Es wurden

keine auf Leberschäden hinweisende Veränderungen festgestellt, und zwar ausweislich der Messung von Serumlactatdehydrogenase, Sorbitdehydrogenase und Glutamatoxaloacetattransaminase. Diese Voruntersuchungen lassen den Schluss zu, dass Leberschädigung bei den hier verwendeten Dosierungen kein wesentliches Merkmal der Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung ist. Die Verbindung erzeugte ein etwas stärker saures Urin als bei den Vergleichsversuchen.

Wirkungen auf Schmerzrezeptoren:

Meerschweinchen wurden am Ileus koaxial sechsmal pro Minute stimuliert und die Wirkungen von Methylglyoxal, Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung und L-Ascorbinsäure auf die Zuckungswertshöhe sowie auf die Kontraktionen gemessen und mit den bekannten Werten von Morphin verglichen.

Morphin ergibt bei 8,5 mmol eine 50%ige Verminderung der Zuckungswertshöhe; der entsprechende ED₅₀-Wert für Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung betrug 9-20 mmol, der entsprechende Wert für Methylglyoxal 8 mmol und für L-Ascorbinsäure 32 mmol. Eine weitere Erhöhung der Konzentrationen lieferte keine weitere Inhibierung der Zuckungswertshöhe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Effizienzverhältnis von Morphin zu Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung etwa 10⁶ beträgt.

Wirkung auf Entzündung:

In einer Testreihe wurden Ratten i.v. mit Trypanblau behandelt und dann die durch intradermale Injektion von Serotonin (0,05 µg) oder Histamin (1 µg) erzeugte erhöhte Kapillarpermeabilität gemessen.

Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (200 mg/kg) bzw. L-Ascorbinsäure (100 mg/kg) wurden i.p. 30 min vor dem Test auf Kapillarpermeabilität injiziert und die Fleckdiffusion 20-30 min nach Verabreichung von Serotonin oder Histamin beobachtet. Bei diesem

System konnte mit Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung oder L-Ascorbinsäure keine Wirksamkeit festgestellt werden.

In einer anderen Versuchsreihe wurden Rattenpfotenödeme durch intradermale Carrageen-Injektion (0,1 ml einer 1%igen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung) erzeugt. Die Volumen der Rattenpfoten wurden mit einem Differentialvolummeter (U. Basile, Mailand, Italien) gemessen; Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (200 mg/kg), L-Ascorbinsäure (199 mg/kg) bzw. Indomethacin (3 mg/kg) wurden i.p. injiziert (Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung und L-Ascorbinsäure) oder per os verabreicht (Indomethacin), und zwar 60 min vor der Verabreichung von Carrageen. Sowohl die Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung als auch die L-Ascorbinsäure wirkten bei diesem Versuch etwas entzündungshemmend, waren aber weniger aktiv als Indomethacin (Wirksamkeitsverhältnis annähernd 200).

Tumoruntersuchungen:

Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (500 mg/kg, einmal täglich, i.p.) inhibiert Ehrlich-Karzinom und Sarcoma-180 sowohl in festen (annähernd 36%) und aszitischen (annähernd 96%) Formen. Methylglyoxal-Ascorbinsäure-Verbindung (250 mg/kg, zweimal täglich, i.p.) inhibiert die aszitischen Formen (annähernd 90%), aber nicht die festen Formen dieser Tumoren.

Der Aktionsmodus der erfindungsgemäßen Verbindungen in bezug auf zytostatische, hypotensive und schmerzvermindernde Wirkungen ist noch unklar. Die empirische Beobachtung, dass die Zellen nicht mehr wuchern, wenn sie diesen Verbindungen ausgesetzt sind, ist jedoch ausreichend, um die Verwendung dieser Verbindungen für die Behandlung von schwerwiegende, bisher nicht behandelbaren und häufig tödlichen Krankheiten, wie Krebs, zu rechtfertigen. Nach Klärung des Aktionsmodus dieser Mittel bzw. Verbindungen und der Bestimmung ihrer Anwendungssicherheit könnten sie sich außerdem als wirksame Mittel zur Verminderung von Hypertonie und Schmerz eignen.

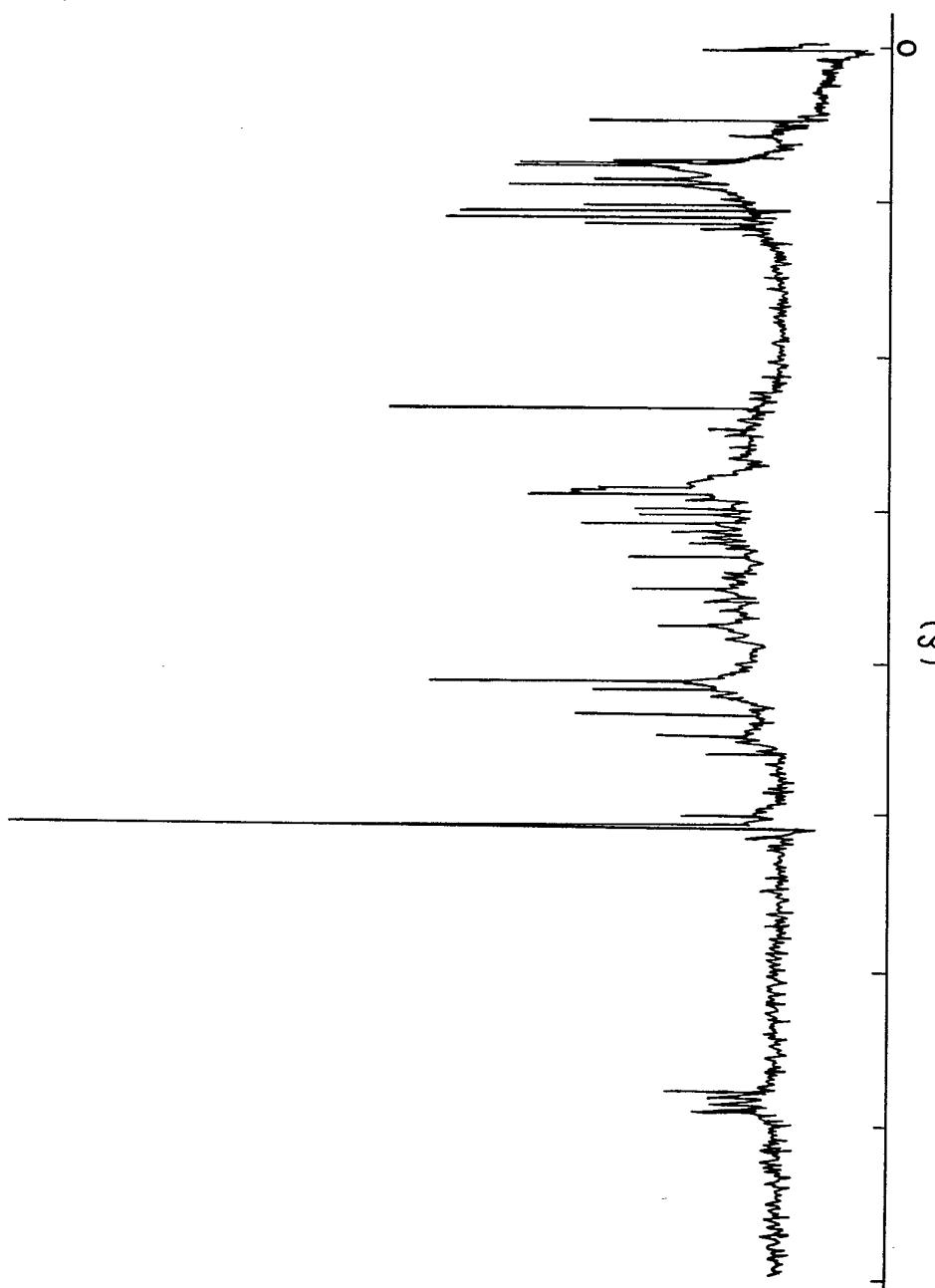


Fig. 1

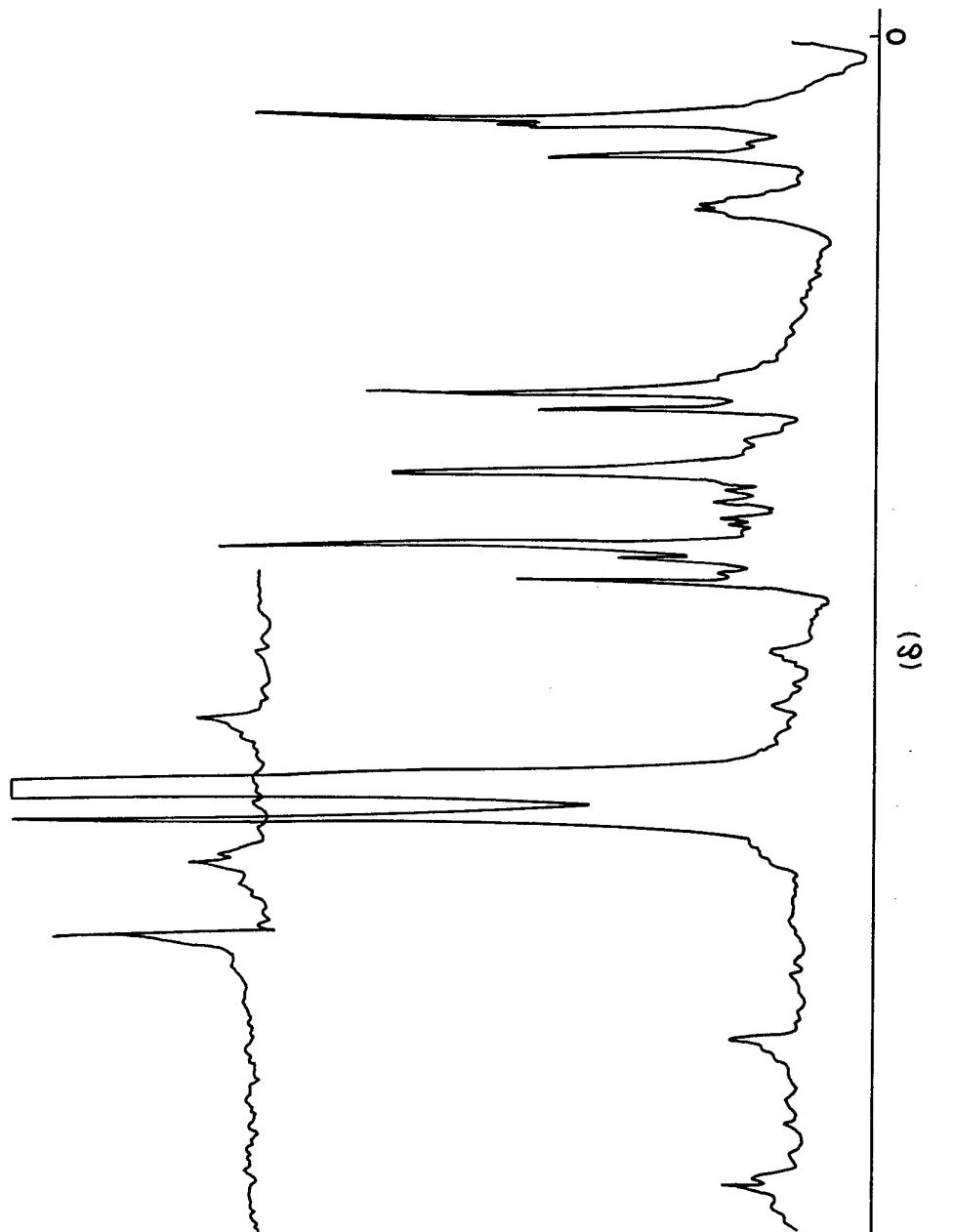
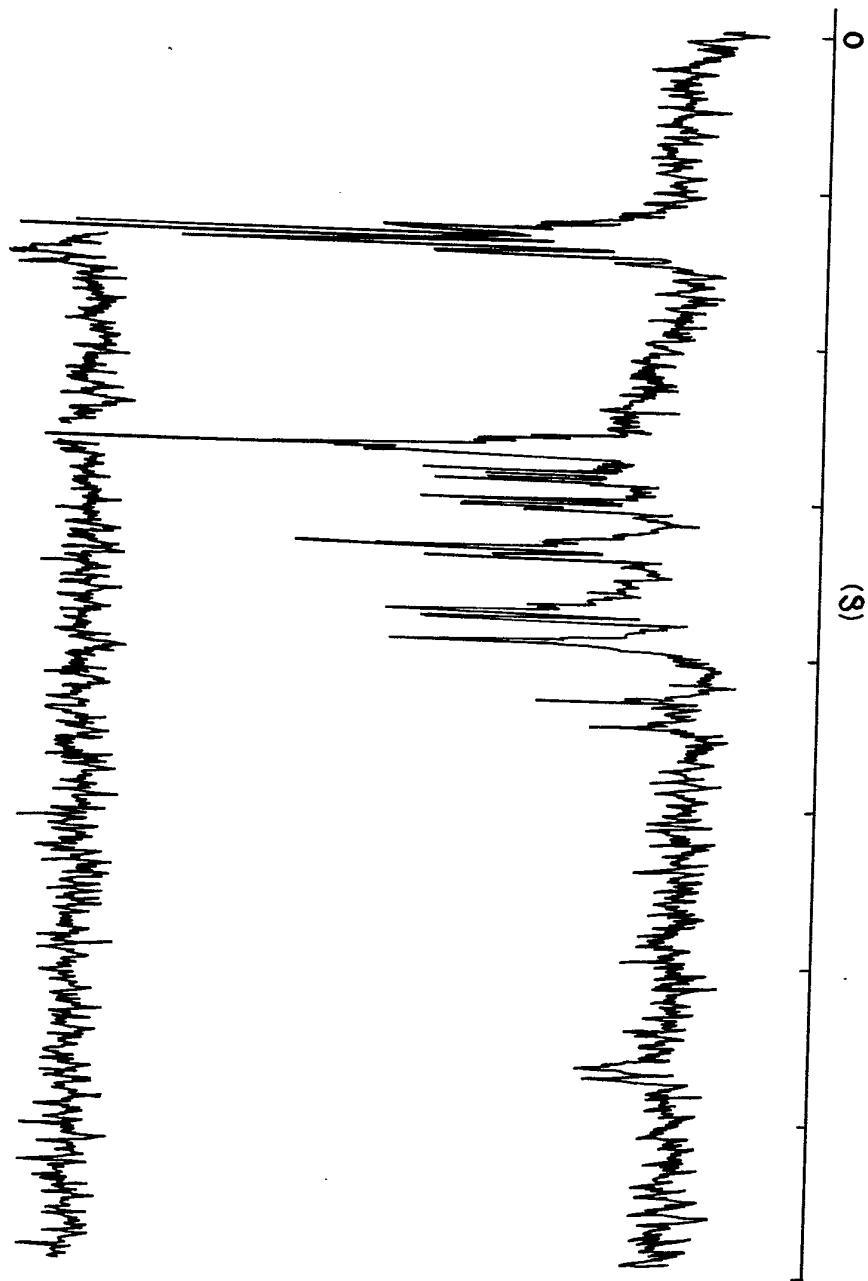


Fig.2

**Fig. 3**