



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8001603**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Nieuwe verbindingen met therapeutische werkzaamheid, alsmede werkwijze voor het bereiden daarvan, en farmaceutische samenstellingen.**
- ⑤1 Int.Cl³: C07D319/12, C07D493/04, A61K31/335, A61K31/365.
- ⑦1 Aanvrager: National Foundation for Cancer Research te Bethesda, Maryland, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.J.G. Lips c.s.
Haagsch Octrooibureau
Breitnerlaan 146
2596 HG 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8001603.
- ②2 Ingediend 18 maart 1980.
- ③2 Voorrang vanaf 6 april 1979.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 27692 .
- ②3 - -
- ⑥1 - -
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 8 oktober 1980.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Nieuwe verbindingen met therapeutische werkzaamheid, alsmede werkwijze voor het bereiden daarvan, en farmaceutische samenstellingen.

De uitvinding heeft algemeen betrekking op nieuwe chemische verbindingen en samenstellingen, een werkwijze voor het bereiden, en de toepassing van deze verbindingen en samenstellingen als cytostatische, hypotensieve en
5 analgesische middelen of voor therapieën, die al deze drie eigenschappen omvatten.

In het kort worden de samenstellingen bereid door het mengen van een gespecificeerd deel van een dialdehyde, α -keto-aldehyde, of diketon met één deel van een enediol
10 of acyloïneverbinding, waarbij men het mengsel in staat stelt om te reageren gedurende een geprolongeerde tijd bij kamertemperatuur. Na zuivering en sterilisatie wordt de samenstelling toegediend aan dieren, die kankercellen dragen. Na toediening is de druk van het kankerweefsel
15 verlicht en verdere tumorontwikkeling stopgezet. Patiënten ondervinden verder een algemeen verlies aan pijn en een bloeddrukverlaging.

Gedurende vele jaren hebben wetenschapsmensen gezocht naar een doelmatige behandeling voor alle soorten
20 kanker. Ondanks een grote belangstelling en veel belangrijke ontdekkingen heeft er nog steeds geen grote doorbraak plaatsgevonden bij de genezing of behandeling van kanker.

Volgens A. Szent-Gyorgyi's bio-elektronische theorie van proteïne-interacties (Szent-Gyorgyi, A.
25 "Electronic Biology and Cancer", M. Dekker, New York, 1976) kan methylglyoxaal een belangrijke rol spelen bij het controleren van celdeling door zijn eigenschappen als krachtige elektronenacceptor. Het geeft een wisselwerking met proteïnen door middel van zijn aldehydische carbonyl
30 door de primaire aminegroepen van proteïnen aan te tasten. Onafhankelijk van het feit of deze theorie in facto juist is, kan een dergelijke regulering van celdeling door methylglyoxaal nuttig zijn bij de ontwikkeling van effectieve chemotherapeutische middelen.

35 Evenwel zijn methylglyoxaal en daarmee verwante

verbindingen uitzonderlijk labiel in vivo als gevolg van de werking van een glyoxalase-enzymstelsel, dat het convertiert tot D-melkzuur in aanwezigheid van gereduceerd glutathion. Daarom zou elke in vivo test van methylglyoxaal voor zijn inwerking op celdeling negatief uitvallen wegens de werking van glyoxalase.

Szent-Gyorgyi breidt zijn bio-elektronische theorie uit om kanker te verklaren als een verstoring van de elektronische configuratie van proteïnen in kankercellen. 10 (Szent-Gyorgyi, "The Living State and Cancer", in press). In het kort geeft hij de speculatie, dat methylglyoxaal en verwante verbindingen de juiste proteïneconfiguratie herinstellen en er voor zorgen, dat kankercellen van de abnormale proliferatietoestand terugkeren naar de normale 15 "rustconditie".

Het gebruik van een samenstelling, afgeleid van methylglyoxaal voor de behandeling van verschillende kankers is onderzocht door Freireich, e.a. (Cancer Chemotherapy Reports, vol. 16, blz. 183-186, 1962). Zij 20 reporteren klinische studies van methylglyoxaal-bis(guanylhydrazon) in patiënten met acute myelocytische leukemia en observeren een volledige remissiefrequentie van 69 % in 13 patiënten, waardoor er geen twijfel wordt overgelaten voor wat betreft de anti-tumorwerkzaamheid, in het bijzonder, 25 zoals zij uiteenzetten, wanneer in herinnering wordt gebracht, dat alle gangbare therapieën slechts 13 % volledige remissies geven.

Verder geven in het Amerikaanse octrooischrift 2.893.912 Musser en Underwood data om aan te tonen dat 30 bepaalde cyclische glyoxaalverbindingen, bijv. cyclohexylglyoxaal, benzylglyoxaal, enz., een antivirale werkzaamheid hebben. In verband met het actuele bewijs, dat sommige kankervormen gecorreleerd zijn aan het optreden van virale chromosomen in kankercellen, kan men verwachten, dat deze 35 verbindingen een werking hebben bij de preventie, genezing en behandeling van virale ziektes, waaronder sommige vormen van kanker.

Het Amerikaanse octrooischrift 2.927.054 beschrijft de condensatie van bepaalde suikers, bijv. glucose, mannose, 40 fructose, enz., met een aldehyde of keton tot cyclische

acetalen van de suiker. Dit mechanisme omvat blijkbaar de eliminatie van water door de vereniging van het zuurstof van de carbonylgroep van het aldehyde of keton en de waterstof van elk van twee hydroxylgroepen van de suiker.

5 Deze condensatiereactie wordt bevorderd bij verhitting van het mengsel tot het kookpunt van het aldehyde in aanwezigheid van een zure acetalisatiekatalysator, condities, die de open kettingvorm van de suiker begunstigen. De twee aangrenzende koolstofatomen van de cyclische acetal-
10 ring zijn aangrenzende koolstoffen van de alifatische keten van het suikermolecuul. Verschillende van dergelijke cyclische acetalringen kunnen worden gevormd aan hetzelfde suikermolecuul, waardoor poly(cyclische) acetalen worden gevormd.

15 Het is nu het doel van de uitvinding om nieuwe verbindingen te verschaffen met cytostatische, hypotensieve en analgetische werkzaamheid.

Een ander doel van de uitvinding is het verschaffen van samenstelling, die effectief zijn bij de behandeling
20 van kanker en hoge bloeddruk en bij de verlichting van pijn, en methodes voor het toedienen van dergelijke samenstellingen.

Een verder doel van de uitvinding is het verschaffen van samenstellingen met de bovengenoemde werkingen, alsook
25 andere toepassingen als anti-tumormiddelen bij dieren en mensen.

Nog een ander doel is het verschaffen van een werkwijze voor het bereiden van de nieuwe verbindingen.

Nog een ander doel is het uitvoeren van de
30 reactie van de dialdehyden, α -keto-aldehyden, of diketonen en acyloïne of enediolverbindingen volgens de uitvinding in waterige media in aanwezigheid van een niet interfererend co-oplosmiddel.

Andere doeleinden, voordelen en aspecten van de
35 uitvinding zullen thans nader worden toegelicht aan de hand van de volgende gedetailleerde beschrijving, daarbij onder verwijzing naar de tekening, waarin:

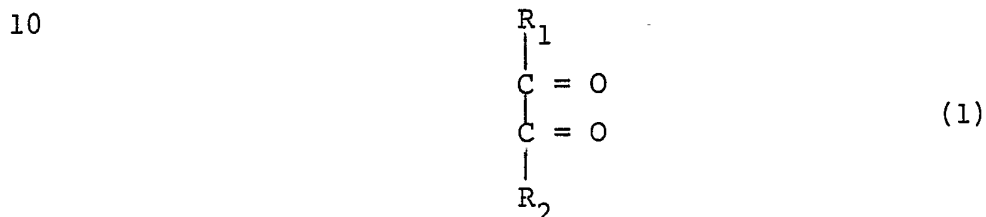
fig. 1 een magnetisch resonantiespectrum van koolstof (CMR) toont van de produkten van de reactie tussen
40 L-ascorbinezuur en methylglyoxaal,

800 16 03

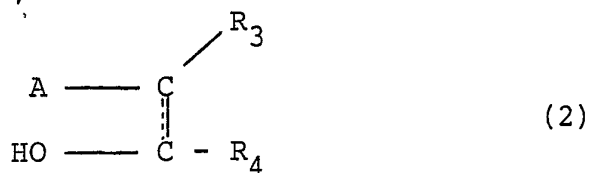
fig. 2 een CMR geeft van de produkten van de reactie tussen L-ascobinezuur en fenylglyoxaalhydraat, en

fig. 3 een CMR geeft van de produkten van de reactie tussen L-ascorbinezuur en glyoxaal.

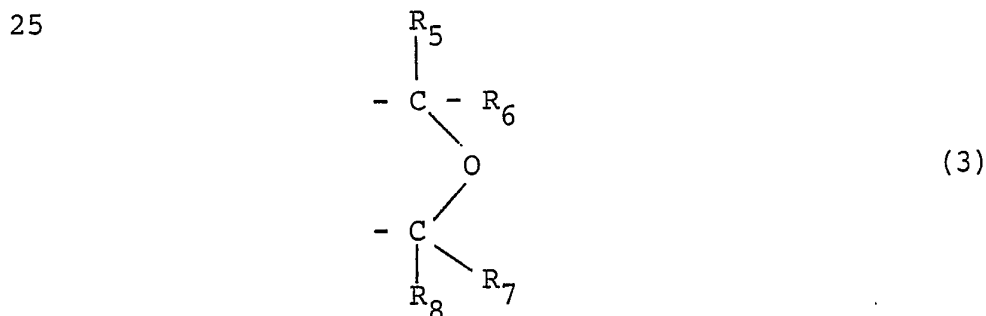
De nieuwe verbindingen volgens de uitvinding worden bereid door het mengen van de vereiste hoeveelheden van een dialdehyde, α -keto-aldehyde of diketon volgens formule 1



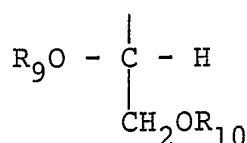
, waarin R_1 en R_2 waterstof, alkyl, cycloalkyl, aryl, of arylalkyl zijn, en een acyloïne of enediolverbinding volgens formule 2,



, waarin A, -OH of =O kan zijn, waarbij --- een dubbele binding voorstelt, wanneer A -OH is en een enkele binding, wanneer A =O is, waarin R_3 en R_4 waterstof, alkyl, of aryl, of waarin R_3 en R_4 van het enediolreactiemiddel samen een groep vormen volgens formule 3



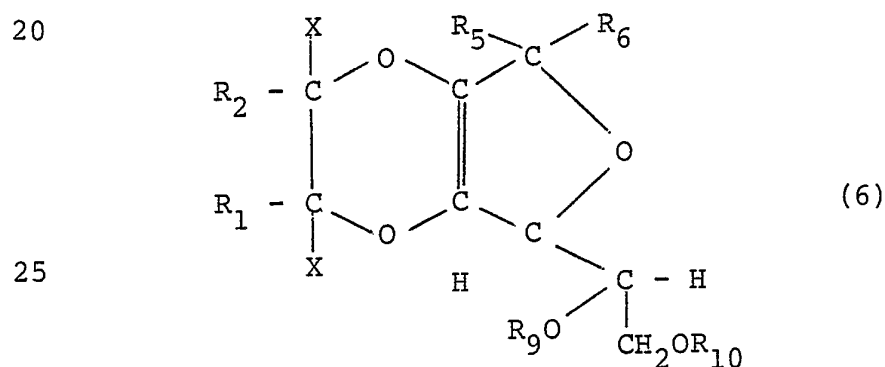
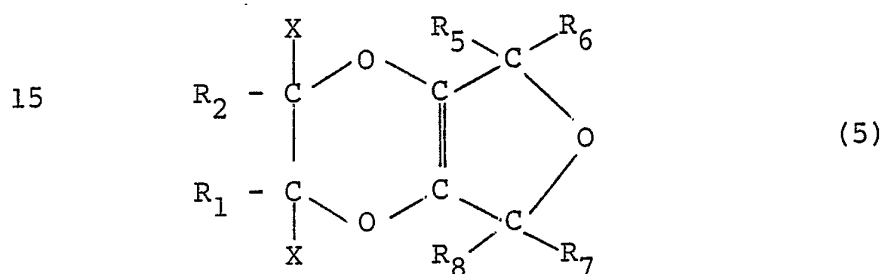
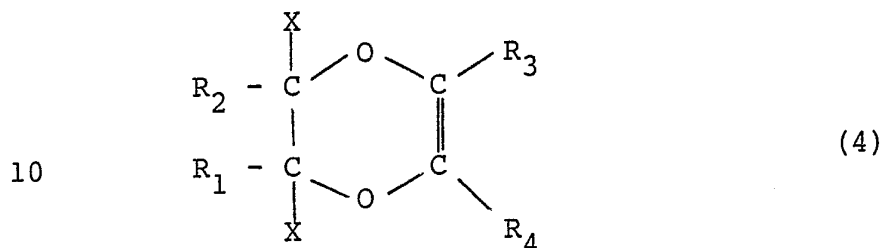
, waarin R_5 t/m R_8 waterstof, alkyl, of aryl, R_5 en R_6 samen =O kunnen vormen, waarin R_8



kan zijn, en waarin R_9 en R_{10} waterstof, alkyl, of aryl

zijn, en deze verbindingen te laten reageren onder een stikstofatmosfeer bij ongeveer kamertemperatuur in waterige media met een wateroplosbaar co-oplosmiddel.

De nieuwe cyclische dubbele hemi-acetalen, voort-
5 gebracht door het boven beschreven proces, omvatten verbindingen volgens formules 4, 5 en 6



, waarin R₁ en R₂ waterstof, alkyl, cycloalkyl, aryl, of arylalkyl zijn, waarin X hydroxy is, waarin R₅ en R₆
30 samen =O kunnen vormen, en waarin R₃ t/m R₁₀ waterstof, alkyl of aryl zijn.

De nieuwe cyclische hemi-acetalen volgens de uitvinding omvatten verder gevallen, waarbij R₃ en R₄ samen een groep vormen volgens formule 3, waarin R₅, R₆,
35 R₇ en R₈ waterstof, alkyl of aryl, en waarin R₅ en R₆ samen =O kunnen vormen.

Additionele produkten van de uitvinding omvatten gevallen, waarin R_5 en R_6 samen =O kunnen vormen, en waarin R_8 zoals genoemd



is, waarin R_9 en R_{10} waterstof, alkyl of aryl zijn.

De uitvinding verschilt van de uitvinding van de samenhangende Amerikaanse octrooiaanvraag Serial No. 917.327 met betrekking tot de nieuwe verbindingen en de methode om deze te maken. Meer in het bijzonder bevatten de verbindingen volgens de uitvinding cyclische hemiacetaalringen met zes leden, terwijl de volledige acetaalverbindingen volgens Serial No. 917.327 vijf-ledige ringen hebben. Verder omvat de werkwijze voor het maken van de verbindingen volgens de uitvinding de reactie in waterige media in aanwezigheid van een niet-interfererend co-oplosmiddel, zoals tetrahydrofuran, dioxaan, of iets dergelijks. In de werkwijze voor het bereiden van de verbindingen volgens Serial No. 917.327 zijn geen co-oplosmiddelen aanwezig in de waterige media van de reactie.

In het geval, waarin de reagemiddelen of methylglyoxaal, glyoxaal, of fenylglyoxaalhydraat en L-ascorbinezuur zijn, wordt de reactie aangegeven door een afname in het reducerende karakter van het L-ascorbinezuur ten opzichte van jodium tot resp. 15, 0 en 25 % van de oorspronkelijke waarde. De gezuiverde reactieprodukten worden verkregen door verdamping in vacuum, gevolgd door wassen met een oplosmiddel of oplosmiddelen, kolomchromatografie, en vriesdrogen.

30 Methylglyoxaal, glyoxaal en fenylglyoxaalhydraat kunnen in de handel worden verkregen, of al naar nodig is gezuiverd.

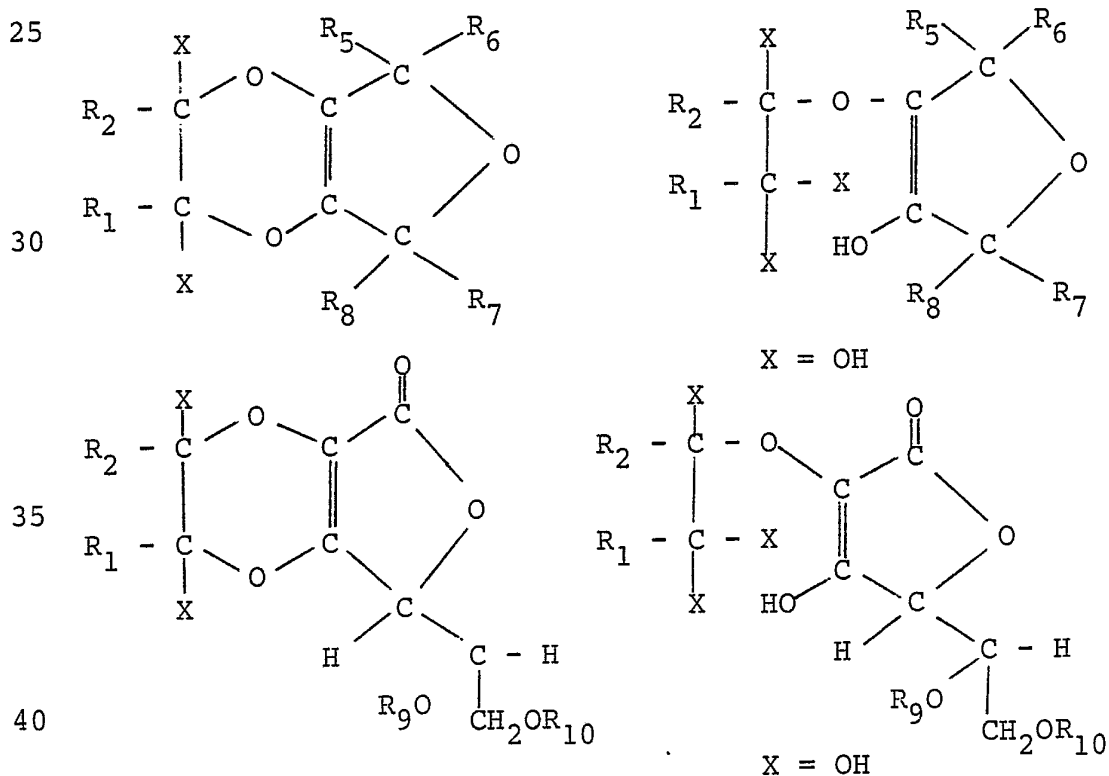
Magnetische koolstofresonantie (CMR) spectra in het carbonylgebied geven een aantal verschillende lacton-carbonylabsorpties (fig. 1, 2 en 3).

Voor wat betreft de chemische eigenschappen van de bovengenoemde verbindingen gaven gaschromatografische massaspectraalanalyse van de reactie van de cyclische

dubbel hemi-acetalen van methylglyoxaal, glyoxaal, en
 fenylglyoxaalhydraat en L-ascorbinezuur met silylerende
 middelen, zoals N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoracetamide,
 een splijten aan tot tetra-O-bis-trimethylsilylascorbaat
 5 in alle gevallen (Fales, Fodor en Butterick, niet gepubli-
 ceerde resultaten). Dit geeft duidelijk aan:

- a) de omkeerbaarheid van de reactie,
- b) dat er geen structurele verandering optreedt
 in het L-ascorbinezuur, en
- 10 c) dat het trimethylsilyleringsmiddel werkzaam
 was als vangmiddel voor L-ascorbinezuur. Verder gaf semi-
 carbazide pyro-druivezuur-aldehyde-semicarbazon, en
 aan de andere kant resulteerde oxydatieve splijting met
 natriumperjodaat van natriumbicarbonaat-gebufferde monsters
 15 in verbruik van twee equivalenten perjodaat, corresponderende
 met twee naburige diolgroeperingen per molecuul.

Van deze gegevens kan men afleiden, dat de
 enolische hydroxylen (aan de posities 2 en 3) van L-
 ascorbinezuur reageren met het aldehydecarbonyl van methyl-
 20 glyoxaal, glyoxaal, en fenylglyoxaalhydraat, alsook met
 hun ketoncarbonylgroepen teneinde een reeks cyclisch dubbele
 hemi-acetalen te geven, die in een kleine mate in tautomeer
 evenwicht kunnen zijn met de open keten-hemi-acetaal in
 oplossing.



Gedetailleerde representatieve analytische data voor de methylglyoxaal, glyoxaal, en fenylglyoxaalhydraat-verbindingen worden aangetroffen in de onderstaande voorbeelden VI, VII en VIII. Deze resultaten zijn inconsistent met een fysisch mengsel van L-ascorbinezuur en methylglyoxaal, hetgeen zou vereisen, dat ten minste drie mol NaIO_4 zou worden geconsumeerd. Er zij opgemerkt, dat L-ascorbinezuur zelf 2,21 equivalent NaIO_4 gebruikt, terwijl methylglyoxaal 1,29 mol gebruikt.

Over-oxydatie tot een beperkte mate door perjodaat kan het verbruik verklaren van meer dan 2 of 1 equivalent NaIO_4 , zoals men zou verwachten voor resp. L-ascorbinezuur en methylglyoxaal.

VOORBEELD I

In een eenhals-tweeliterfles met ronde bodem, bekleed met aluminiumfoelie, werd 68 g (0,386 mol) L-ascorbinezuur aangebracht. Hieraan voegde men een liter tetrahydrofuran (analytische graad, Mallinckrodt), * 340 ml (stikstof gezuiverd) gedestilleerd water en 268 g methylglyoxaal 40 %'s waterige oplossing (Aldrich, ~~#~~ 17, 733-4), achtereenvolgens toe. De fles werd afgesloten en bij omgevingstemperatuur (23°C) gedurende 4 dagen geroerd.

Daarna nam men 0,1 ml monsters, die werden verdund met 1 ml H_2O en getitreerd met 0,1 M oplossing jodium in tetrahydrofuran (THF). Toen de jodiumreactie de asymptoot (0,26 ml) bereikte, werd de reactie als voltooid beschouwd.

Het oplosmiddel van het reactiemengsel werd verdampt op een rotatieverdamer bij 15 mm-20 mm (waterbad $\geq 35^\circ\text{C}$), een vacuumpomp $\geq 0,4$ mm, en ten slotte een vriesdroger bij 200 μ . De resulterende gele stroop werd gevriesdroogd gedurende 3 dagen bij 10 μ . Het verkregen gele schuim werd behandeld met een oplossing van 400 ml anhydrisch ethylacetaat ** en 1 liter anhydrisch benzeen *** en gekoeld tot -15°C . Na 2 dagen werd de oplossing gedecanteerd van de vaste stof. Het vaste materiaal werd gevriesdroogd bij 15 μ gedurende 3 dagen. Het resulterende witte opgezwollen vaste materiaal werd verder gezuiverd (indien noodzakelijk, teneinde het L-ascorbinezuur te verwijderen) door oplossen in 800 ml anhydrisch ethylacetaat **/anhydrisch

8001603

cyclohexaan *** (1:1), koelen tot 0°C gedurende 1 dag, afzuigfiltratie van het vaste materiaal, verdamping van het filtraat gedurende 15-20 min. (waterbad 35°C) en vriesdrogen gedurende 1 dag.

- 5 In elk van de twee gevallen, de 5-10 % L-ascorbinezuurverontreinigde preparatie of de L-ascorbinezuur-vrije methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding, werden gecomplexeerde en matrix-gebonden oplosmiddelen verwijderd door koelen bij droog-ijstemperatuur of vloeibare stikstoftemperatuur
10 en vriesdrogen (15/u) zes keer over 3 dagen.

Gebaseerd op L-ascorbinezuur bedroeg de opbrengst van (5-10 % ascorbinezuur) - methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding 95-100 g, smeltpunt 58-62°C. De opbrengst van de L-ascorbinezuurvrije methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding
15 ding bedroeg 80-85 g (90-96 %), smeltpunt 52-54°C.

表

Gestript van peroxydes door portiegewijs roeren met neutraal aluminiumoxyde en zuigfiltratie.

表表

- 20 Gedroogd over P₂O₅ bij omgevingstemperatuur gedurende 12 uur en gedestilleerd bij atmosferische druk beschermd van vocht.

表表表

Gedroogd over natrium bij omgevingstemperatuur gedurende 12 uur en gedestilleerd bij atmosferische druk beschermd van vocht.

VOORBEELD II

- 25 15,2 Gram (0,10 mol) fenylglyoxaalmonohydraat werd toegevoegd aan een oplossing van 17,6 g (0,10 mol) L-ascorbinezuur, opgelost in een mengsel van 500 ml zuurstofvrij gedestilleerd water en 500 ml tetrahydrofuran (zie voorbeeld I) in een stikstofatmosfeer. Het reactie-
30 mengsel werd geroerd onder stikstof in het donker gedurende 4 dagen bij omgevingstemperatuur. Toen een monster werd getitreerd, zoals in voorbeeld I, had de reactie 75 % verbruikt van het oorspronkelijk aanwezige L-ascorbinezuur

en werd deze als volledig beschouwd. De reactie werd beëindigd door verwijdering van water op een vriesdroger en het residu, dat 30 g woog, werd onderworpen aan een verdere zuivering op een cellulosekolom.

5 VOORBEELD III

Een oplossing van 11,6 g (0,1 mol) van het enediol γ -lacton van dihydroxyaceto-azijnzuur ($C_4H_4O_4$), smeltpunt $153^\circ C$, bereid volgens Micheel en Jung (Chem. Ber., 66B, 129 (1933)), werd opgelost in een mengsel van 100 ml tetrahydrofuran en 56 ml water onder stikstof. Vervolgens werd 36 ml toegevoegd van een 40 %'s waterige oplossing van methylglyoxaal (0,2 mol) en vond de reactie plaats onder jodiumtitratie van weggenomen monsters. Nadat de reactie vrijwel was voltooid, werd het reactiemengsel van de hemi-acetaal hemi-ketal van het enediollacton (5,6-bis-norascorbinezuur) verdampt op een vriesdroger bij $15^\circ C$ gedurende 3 dagen en onderworpen aan zuivering door doorleiding over een cellulosekolom. De opbrengst bedroeg 18 g (61 %) na chromatografie.

20 De reacties van de voorbeelden I t/m III werden uitgevoerd in waterige media in aanwezigheid van een niet interfererend co-oplosmiddel (THF), maar de aanwezigheid van een co-oplosmiddel is niet noodzakelijk voor het doen plaatsvinden van de reactie. De zesledige ring-hemi-acetaalverbindingen volgens de uitvindingen worden voortgebracht in waterige media samen met de vijfledige ring-acetaalverbindingen volgens eerdergenoemde samenhangende aanvraag Serial No. 917.321. Er wordt aangenomen, dat het co-oplosmiddel de reactie zodanig richt, dat de produktie van het hemi-acetaal boven de acetaalverbinding wordt bevoorkeurd, maar de mate, waarin het co-oplosmiddel de evenwichtsniveau's verandert, is momenteel niet bekend.

VOORBEELD IV

100 Mg van de verbindingen van de voorbeelden II-III werden behandeld met 2 ml N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamide (Pierce) bij omgevingstemperatuur gedurende 4-7 dagen, en het reagens werd verwijderd onder hoog-vacuum. Het overblijvende materiaal werd gedroogd bij $10-15^\circ C$ gedurende 24 uur. Een geschikt anhydrysch

8001603

organisch oplosmiddel, bijv. benzeen, werd ingevoerd voor het vormen van een oplossing van voldoende concentratie voor gaschromatografie-analyse voorafgaand aan gaschromatografie-massaspectraalanalyse.

5 VOORBEELD V

Perjodaatoxydatie van acetalen en cyclische dubbele hemi-acetalen van L-ascorbinezuur.

De verbindingen werden als volgt behandeld. Eerst werden de verbindingen gedroogd tot een uniform gewicht op een vriesdroger. Alle oxydaties en titraties werden
10 uitgevoerd onder stikstof. Afgemeten monsters van 500 ml van een 0,020 N oplossing van de verbindingen werden behandeld met ongeveer 10,0 ml van een verzadigde natriumbicarbonaatoplossing (leidende tot een pH = 7,20) en
15 behandeld met exact 20,0 ml natriumarsenietoplossing (0,085 N). Een oplossing van natriumperiodaat (0,040 N), 5,0 ml, werd vervolgens toegevoegd, gevolgd door ongeveer 1,50 ml 20 %'s kaliumjodide-oplossing. De pH bedroeg nog steeds 7,20. Onder stikstof in gedempt licht werd de
20 oxydatie gedurende 15 min. op zichzelf gelaten, waarna de overmaat natriumarseniet werd behandeld met 0,070 N jodiumoplossing tot aan net geel (of in het geval, dat stijfsel als indicator werd gebruikt, de eerste persistente blauwe kleur optrad). Een blanco werd
25 gebruikt voor het corrigeren voor het volume van verbruikt jodium.

In tegenstelling met de vijfledige ring bevattende volledige acetalen, beschreven in genoemd Amerikaans octrooischrift Serial No. 917.327, welke ongeveer 1 mol
30 natriumperiodaat verbruiken, verbruikten de dubbele hemi-acetalen volgens de uitvinding meer dan 2 mol.

	Verbinding	gebruikt (mol)	gevonden (mol)	equivalent van gebruikt perjodaat
	methyglyglyoxaal	0,065	0,084	1,29
5	L-ascorbinezuur (1 eq. methyl- glyoxaal toege- voegd)	0,059	0,131	2,21
	L-ascorbinezuur	0,140	0,323	2,21
10	L-ascorbinezuur- methyglyglyoxaal- verbinding	0,074	0,178	2,38
	L-ascorbinezuur- glyoxaal- verbinding	0,200	0,408	2,04
15	L-ascorbinezuur- crotonaldehyde- verbinding	0,195	0,267	1,36
20	L-ascorbinezuur- maleïne-aldehyde- verbinding	0,153	0,190	1,24
	mannitol	0,039	0,226	1,15

VOORBEELD VI

Bepaling van formaat en acetaat bij oxydatie van de ascorbinezuur-methyglyglyoxaalverbinding.

25 De bovenbeschreven perjodaatoxydatie werd uitge-
voerd op tien maal deze schaal met een reactietijd van
15 min., en er werd overmaat natriumboriumhydride toegevoegd
voor het blussen van de reactie. De reactie werd aange-
zuurd tot een pH 6 met verdund zwavelzuur (2N). Na
30 vacuumdestillatie en afvangen van de zuren werd het
destillaat op basisch niveau ingesteld met natriumcarbonaat
en werd het water volledig verwijderd op een vriesdroger.
Een magnetisch protonresonantiespectrum van het gevries-
droogde materiaal werd vervolgens genomen en er werden
35 resonanties geobserveerd bij 1,90 ppm en 8,41 ppm, die
zijn toe te schrijven aan resp. acetaat (CH_3) en formaat
(CH) (ten opzichte van DDS als inwendige standaard).
Dit resultaat is consistent met alkalihydrolyse van het
enolacetaat-formaat en de reductie van perjodaat en
40 jodaat enerzijds, en van het resulterende formaldehyde

800 16 03

en C₅-aldehyde anderzijds.

Een klein gedeelte van het gevriesdroogde basisch gemaakte materiaal werd opgelost in een minimum hoeveelheid water en geneutraliseerd met zoutzuur.

- 5 Er werd 2-benzyl-2-thiopseudoureumhydrochloride toegevoegd en resp. het S-benzylthiuroniumacetaat en formaat geprecipiteerd bij vriezen en ontdooien.

VOORBEELD VII

Methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding (geprepareerd

- 10 volgens voorbeeld I).

Analytische gegevens

$$[\alpha]_D^{22} = 11,0^\circ \text{ (C, 1,82)}$$

-- 20 mg monster in 0,1 ml H₂O en 1 ml THF.

PERKIN ELMER MODEL 141 - 2 mm weglengte cel.

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

JASCO MODEL ORD/UV-5

IR (film): 3450, 1775, 1645 cm⁻¹

- 20 PERKIN ELMER 137

NMR (CD₃COCD₃, TMS) δ 2,45-2,59 (5 CH₃'s),
4,52-4,66 (CH₂O, CH₂O, C₂-CH-O)
verduisterd door OH's: 3,00-6,00,
5,25-5,28 (O₂CH's)

- 25 VARIAN CFT 20

CMR (CD₃COCD₃, TMS): (18,00, 19,50, 19,89, 20,28,
22,35 (5 CH₃'s); 170,31, 171,14,
171,98, 172,10, 173,45 (OCOC=C)

VARIAN CFT 20

- 30 MICROANALYSE (GALBRAITH LABORATORIES, TENN. USA) Analyse
Berekend voor C₉H₁₂O₈: C, 43,55; H, 4,84; O, 51,61.
Gevonden: C, 43,87; H, 6,14(!); O, 51,25.

8001603

OSMOMETRISCH MOLECUULGEWICHT (GALBRAITH) Berekend
molecuulgewicht 248. Gevonden (ethylacetaat) 250.
Smeltpunt: 58-62^o (ascorbinezuur aanwezig) 52-54^o,
(ascorbinezuurvrij).

5 VOORBEELD VIII

Glyoxaal-ascorbinezuurverbinding (bereid volgens voorbeeld
II, 0,1 mol glyoxaal).

Analytische Gegevens

$$[\alpha]_D^{22} = 8,2 \text{ (C, 1,82)}$$

10 -- 20 mg monster in 0,1 ml H₂O en 1 ml THF

PERKIN ELMER MODEL 141-2 mm weglengte cel

UV (ethylacetaat): 246 (log ϵ = 3,95); 275 (2,64);
285 (2,34).

JASCO MODEL ORD/UV-5

15 IR (film): 3500-3200, 2950, 2880, 1775, 1690, 1645 cm⁻¹

CARY 14

NMR (CD₃COCD₃, TMS): δ 4,54, 4,59 en (CH₂O, CHO, C₂-CH-O),
4,63, 4,94, 5,24 (O₂CH)

VARIAN CFT 20

20 CMR (CD₃COCD₃, TMS): δ 55,0-99,0 (CH, CH₂), 173-174 (OC=O)

VARIAN CFT 20

MICROANALYSE (GALBRAITH LABORATORIES, TENN. USA) Analyse

Berekend voor C₈H₁₀O₈: C, 41,03; H, 4,30; O, 54,67.
Gevonden: C, 41,28; H, 4,53; O, 54,70.

25 Smeltpunt: 62-66^o.

VOORBEELD IX

Fenylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding (bereid volgens voorbeeld II).

Analytische Gegevens

5 $[\alpha]_D^{22} = 11,8$ (C, 1,82)

-- 20 mg monster in 0,1 ml H₂O and 1 ml THF

PERKIN ELMER MODEL 141-2 mm weglengte cel

UV (ethylacetaat): Log = 3,04)

JASCO MODEL ORD/UV-5

10 IR (film: 3450, 3000, 2900, 1790, 1700 cm⁻¹

CARY 14

NMR (CD₃COCD₃, TMS): δ55,0-99,0 (CH, CH₂); 140-150
C₆H₅); 171-175 (OC=O)

VARIAN CFT 20

15 MICROANALYSE (GALBRAITH LABORATORIES, TENN. USA) Analyse

Berekend voor C₁₄H₁₄O₇: C, 57,14; H, 4,80; O, 38,06.

Gevonden: C, 57,30; H, 4,93; O, 37,90.

Smeltpunt: 70-72°.

VOORBEELD X

20 Gezuiverde methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding werd beproefd op muizen door enkelvoudige intraperitoneale (i.p.) injectie en gaf een LD₅₀ in overmaat van 5 g/kg.

VOORBEELD XI

25 In de experimenten met methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding werden ratten geanesthetiseerd met 25 %'s urethaan i.p. en de halsader en halsslagader werden gecannuleerd. De verbinding werd intraveneus (i.v.) inge-
30 geven en de bloeddruk werd gemeten met een transductor, bevestigd aan de halsslagadercannula. De resultaten lieten zien, dat de methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding een daling in zowel systolische als diastolische bloeddruk

8001603

gaf binnen 10 min. vanaf beginnende infusie van 500 mg/kg gedurende een 15 min. infusieperiode. Pulsinjectie van de verbinding gaf een voorbijgaande daling in bloeddruk gevolgd door een reflexstijging, bradycardia, en een
5 langzame daarop volgende daling van druk beneden controlewaarden. Uit deze resultaten blijkt, dat de methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding een bloeddruk-verlagend effect heeft bij relatief hoge doses.

VOORBEELD XII

10 Effekten op lever- en nierfuncties:

Ratten werden i.p. behandeld met de methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding (500 mg/kg) tegenover een equivalent volume zoutoplossing (0,85 % w/v) teneinde te testen op merkbare schade aan lever en nier. Geen veranderingen,
15 indicatief voor leverletsel werden waargenomen, waarbij serumlactaatdehydrogenase, sorbitoldehydrogenase, en glutamaat-oxaloacetaattransaminase werden bewaakt. De conclusies van deze voorstudies geven aan, dat leverschade geen significant aspect is bij de gebruikte doses van
20 methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding. De verbinding zorgde voor een iets zuurdere urine dan werd aangetroffen in controles.

VOORBEELD XIII

Effekten op pijnreceptoren:

25 Ileum van een cavia werd coaxiaal gestimuleerd zes keer per minuut en de effekten van methylglyoxaal, methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding en L-ascorbinezuur op de hoogte van de pijntrekkingen en de samentrekking werden gemeten en vergeleken met de vastgestelde effekten
30 van morfine.

Morfine gaf een 50 %'s reductie in pijntrekkingshoogte bij 8,5 mM; de corresponderende ED₅₀ voor methylglyoxaal-ascorbinezuur was 9-20 mM, voor methylglyoxaal 8 mM; en voor L-ascorbinezuur 32 mM. Geen verdere inhibitie
35 van pijntrekkingshoogte trad op bij toegenomen concentraties.

Deze resultaten tonen, dat de morfine/methylglyoxaal-ascorbinezuurverbindingverhouding van de werkzaamheid ongeveer 10⁶ bedraagt.

VOORBEELD XIV

Effekten op ontsteking:

In één serie proeven werden ratten i.v. behandeld met trypan blauw en vervolgens werd de toegenomen capillaire permeabiliteit, voortgebracht door intradermale injectie van serotonine (0,05 µg) of histamine (1 µg) gemeten.

Methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding (200 mg/kg) of L-ascorbinezuur (100 mg/kg) werden i.p. geïnjecteerd 30 min. voor het testen van de capillaire permeabiliteit, en kleurdiffusie werd waargenomen voor 20-30 min. na serotonine of histamine. Geen enkel effect van methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding of L-ascorbinezuur kon worden gevonden in dit systeem.

In andere experimenten werd edema van een rattenpoot geproduceerd door intradermale injectie van carrageenan (0,1 ml van een 1 %'s oplossing in zoutoplossing). Het volume van de rattenpoot werd gemeten onder gebruikmaking van een differentiële volumometer (U. Basile, Milaan, Italië), methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding (200 mg/kg), L-ascorbinezuur (199 mg/kg) of indomethacine (3 mg/kg) werd i.p. geïnjecteerd (methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding en L-ascorbinezuur) of per os gegeven (indomethacine) 60 min. eerder dan het carrogeenan. Zowel de methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding als het L-ascorbinezuur hadden in dit opzicht enigszins een anti-ontstekingswerking, maar zij waren veel minder actief dan indomethacine (de werkzaamheidsverhouding bedroeg ongeveer 200).

VOORBEELD XV

Tumoronderzoek:

Methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding (500 mg/kg, eenmaal per dag, i.p.) inhibiteerde Ehrlich carcinoma en Sarcoma 180 in zowel vaste (ongeveer 36 %) als ascitische (ongeveer 96 %) vorm. Methylglyoxaal-ascorbinezuurverbinding (250 mg/kg, tweemaal daags, i.p.) inhibiteerde de ascitische vormen (ongeveer 90 %), maar niet de vaste vormen van deze tumoren.

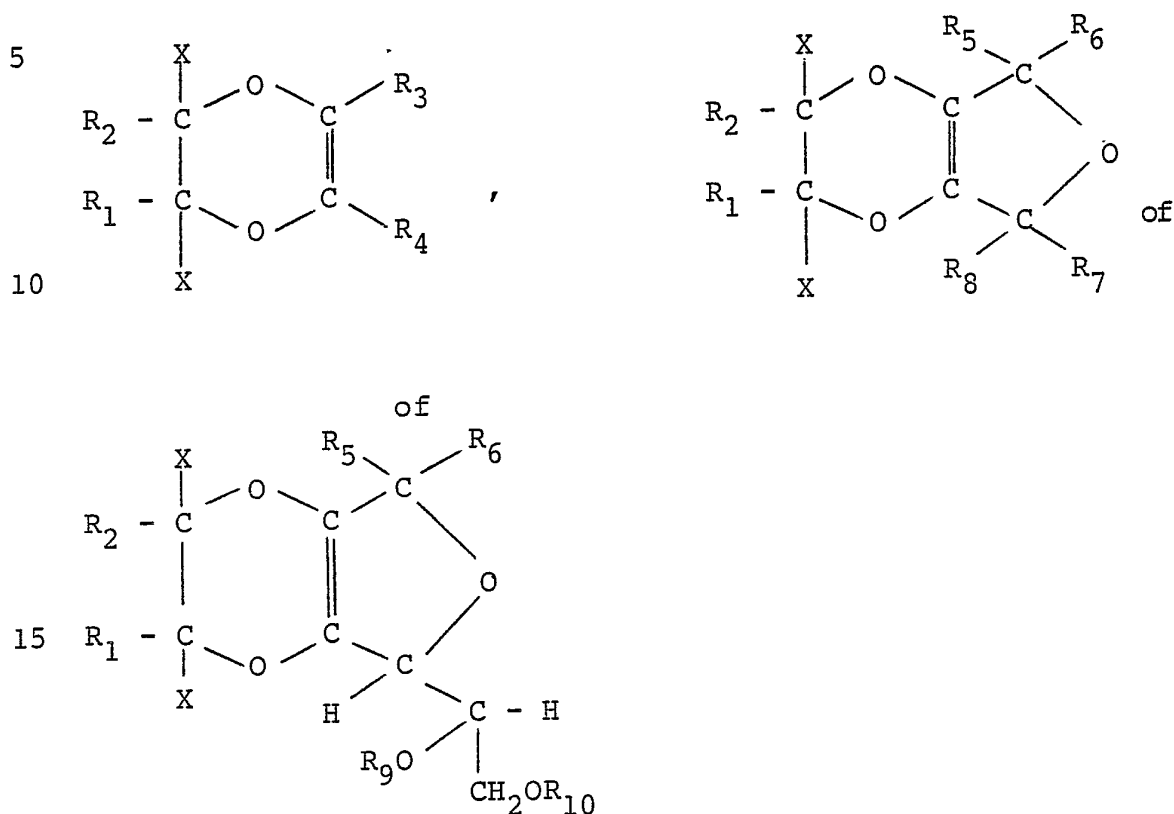
De werkingsmodus van de verbindingen volgens de uitvinding ten opzichte van cytostatische, hypotensieve en pijnverlichtende werking is tot op heden niet geheel

duidelijk. De empirische observatie, dat de cellen met celvermenigvuldiging stoppen, wanneer zij worden blootgesteld aan deze verbindingen, is evenwel voldoende om het gebruik ervan te waarborgen bij de behandeling van ernstige, tot nog toe onbehandelbare, en vaak fatale ziektes zoals kanker. Na een verklaring van de werking van deze medicijnen en bepaling van veiligheid zullen zij bovendien kunnen dienen als doelmatige middelen voor het verlagen van hoge bloeddruk en pijn.

- conclusies -

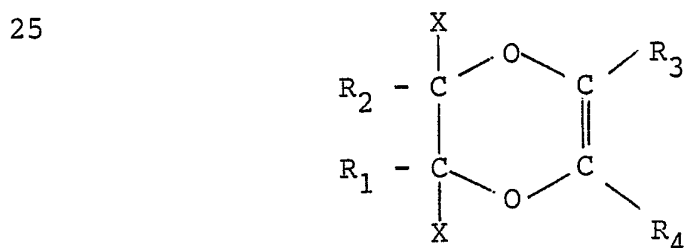
- C o n c l u s i e s -

1. Therapeutisch werkzame verbinding, in het bijzonder met cytostatische, hypotensieve, en/of analgesische eigenschappen, met het kenmerk, dat zij de structuurformule



20 bezit, waarin R_1 en R_2 zijn gekozen uit waterstof, alkyl, cycloalkyl, aryl en arylalkyl, R_3 t/m R_{10} zijn gekozen uit waterstof, alkyl en aryl, R_5 en R_6 samen =O kunnen vormen, en waarin X hydroxy is.

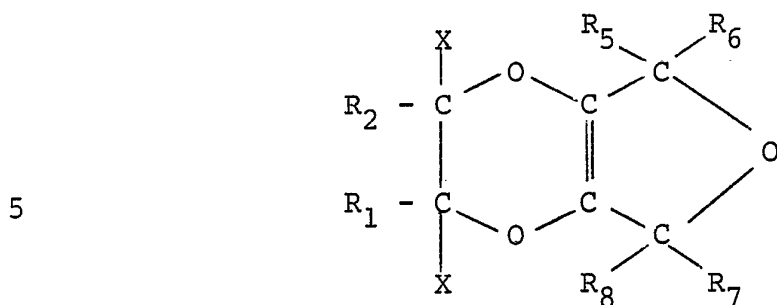
2. Verbinding volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de verbinding de structuurformule



30 bezit, waarin R_1 , R_2 , R_3 , R_4 en X de in conclusie 1 aangegeven betekenis hebben.

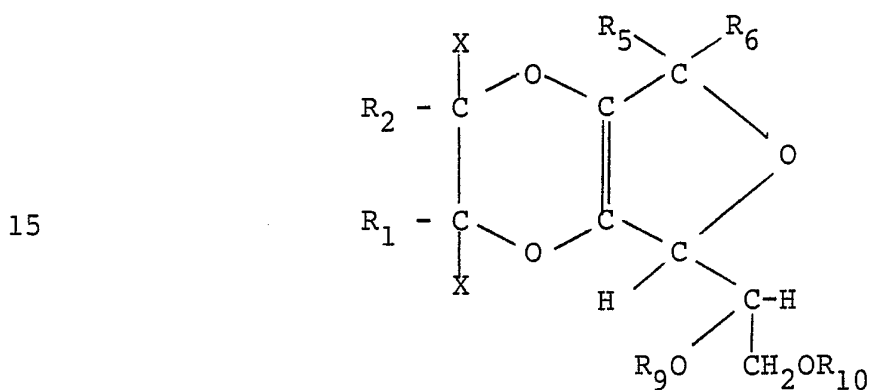
8001603

3. Verbinding volgens conclusie 1, met het
k e n m e r k, dat de verbinding de structuurformule



bezit, waarin R_1 , R_2 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , en X de in conclusie
1 aangegeven betekenis hebben.

10 4. Verbinding volgens conclusie 1, met het
k e n m e r k, dat de verbinding de structuurformule



bezit, waarin R_1 , R_2 , R_5 , R_6 , R_9 , R_{10} en X de in conclusie
1 aangegeven betekenis hebben.

20 5. Werkwijze voor het bereiden van een verbinding
volgens conclusie 1, g e k e n m e r k t door het
mengen van

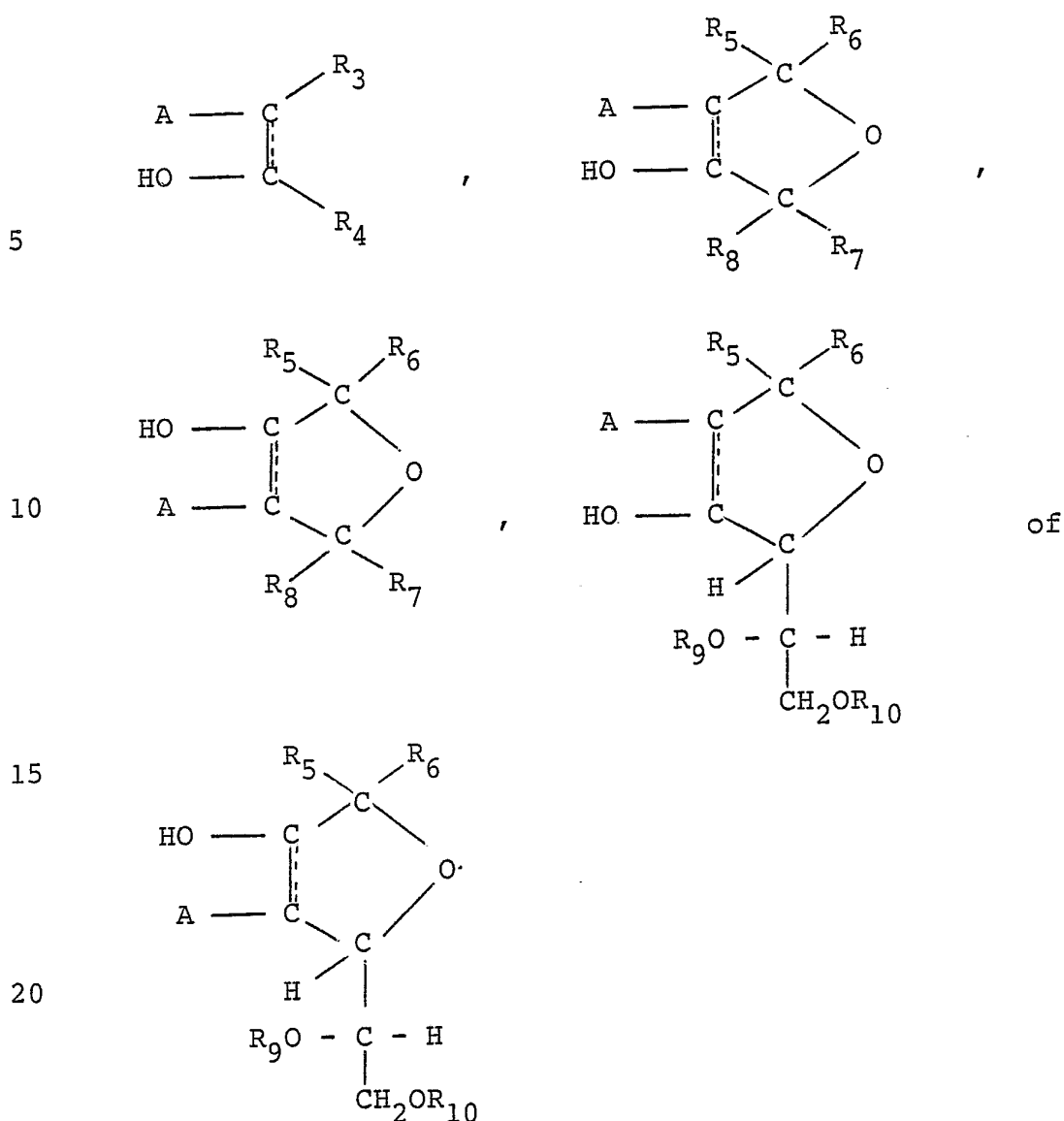
a) een dialdehyde, α -keto-aldehyde or diketon
met de formule



, waarin R_1 en R_2 zijn gekozen uit waterstof, alkyl, cyclo-
30 alkyl, aryl, en arylalkyl, en

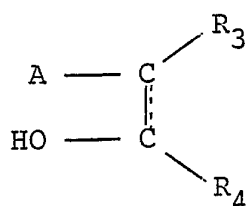
b) een enediol of acyloïneverbinding met de
formule

800 16 03



, waarin R_3 t/m R_{10} zijn gekozen uit waterstof, alkyl en aryl, waarin R_5 en R_6 tezamen =O kunnen vormen, en
 25 waarin A -OH of =O kan zijn, en waarin $\parallel$ een dubbele binding voorstelt, wanneer voor A -OH genomen wordt en een enkele binding wanneer voor A =O genomen wordt.

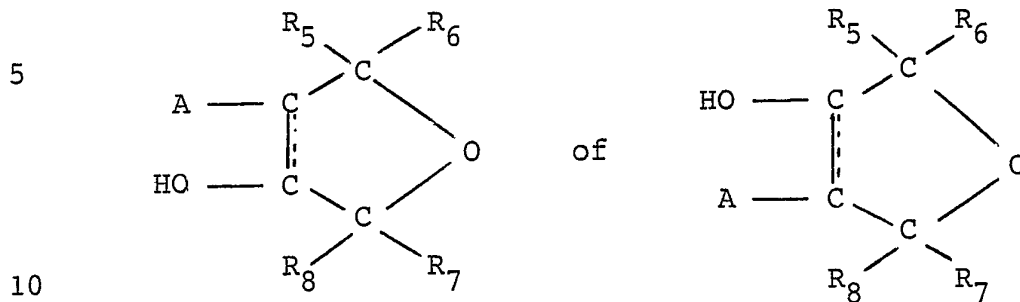
6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het
 kenmerk, dat enediol of acyloïneverbinding de
 30 formule



35 heeft.

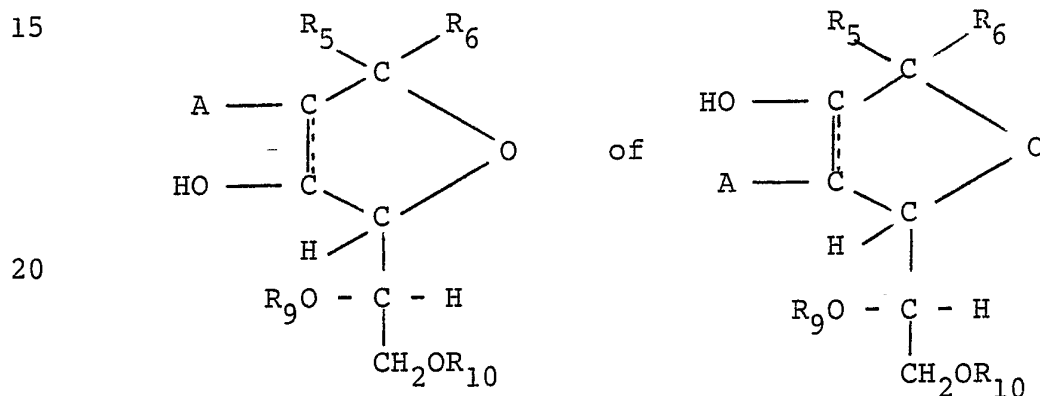
8001603

7. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat de enediol of acyloïneverbinding de formule



bezit.

8. Werkwijze volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat de enediol of acyloïneverbinding de formule



bezit.

9. Werkwijze volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat de enediolverbinding L-ascorbinezuur is.

10. Werkwijze volgens conclusie 6, 7, of 8, met het kenmerk, dat het aldehyde is gekozen uit methylglyoxaal, glyoxaal en fenylglyoxaalhydraat.

11. Cytostatische samenstelling, met het kenmerk, dat deze als werkzaam bestanddeel een verbinding bevat volgens conclusie 1.

8001603

12. Analgesische samenstelling, m e t h e t
k e n m e r k, dat deze als werkzaam bestanddeel een
verbinding bevat volgens conclusie 1.

13. Hypotensieve samenstelling, m e t h e t
5 k e n m e r k, dat deze als werkzaam bestanddeel een
verbinding bevat volgens conclusie 1.

14. Cytostatische samenstelling volgens conclusie 11,
m e t h e t k e n m e r k, dat de genoemde verbinding
10 is opgelost in ongeveer 10 tot 10.000 gew. %, gebaseerd
op het gewicht van de verbinding, van een 0,9 %'s zout-
oplossing.

15. Analgesische samenstelling volgens conclusie 12,
m e t h e t k e n m e r k, dat de genoemde verbinding
15 is opgelost in ongeveer 10 tot 10.000 gew. %, gebaseerd
op het gewicht van de verbinding, van een 0,9 %'s zout-
oplossing.

16. Hypotensieve samenstelling volgens conclusie 13,
m e t h e t k e n m e r k, dat de genoemde verbinding
20 is opgelost in ongeveer 10 tot 10.000 gew. %, gebaseerd
op het gewicht van de verbinding, van een 0,9 %'s zout-
oplossing.

17. Cytostatische samenstelling volgens conclusie 11,
m e t h e t k e n m e r k, dat deze de verbinding bevat
25 opgelost in ongeveer 10 tot 10.000 gew. %, gebaseerd op
het gewicht van de verbinding, van water.

18. Analgesische samenstelling volgens conclusie 12,
m e t h e t k e n m e r k, dat deze de verbinding bevat
opgelost in ongeveer 10 tot 10.000 gew. %, gebaseerd op
30 het gewicht van de verbinding, van water.

19. Hypotensieve samenstelling volgens conclusie 13,
m e t h e t k e n m e r k, dat deze de verbinding bevat
opgelost in ongeveer 10 tot 10.000 gew. %, gebaseerd op
het gewicht van de verbinding, van water.

8001603

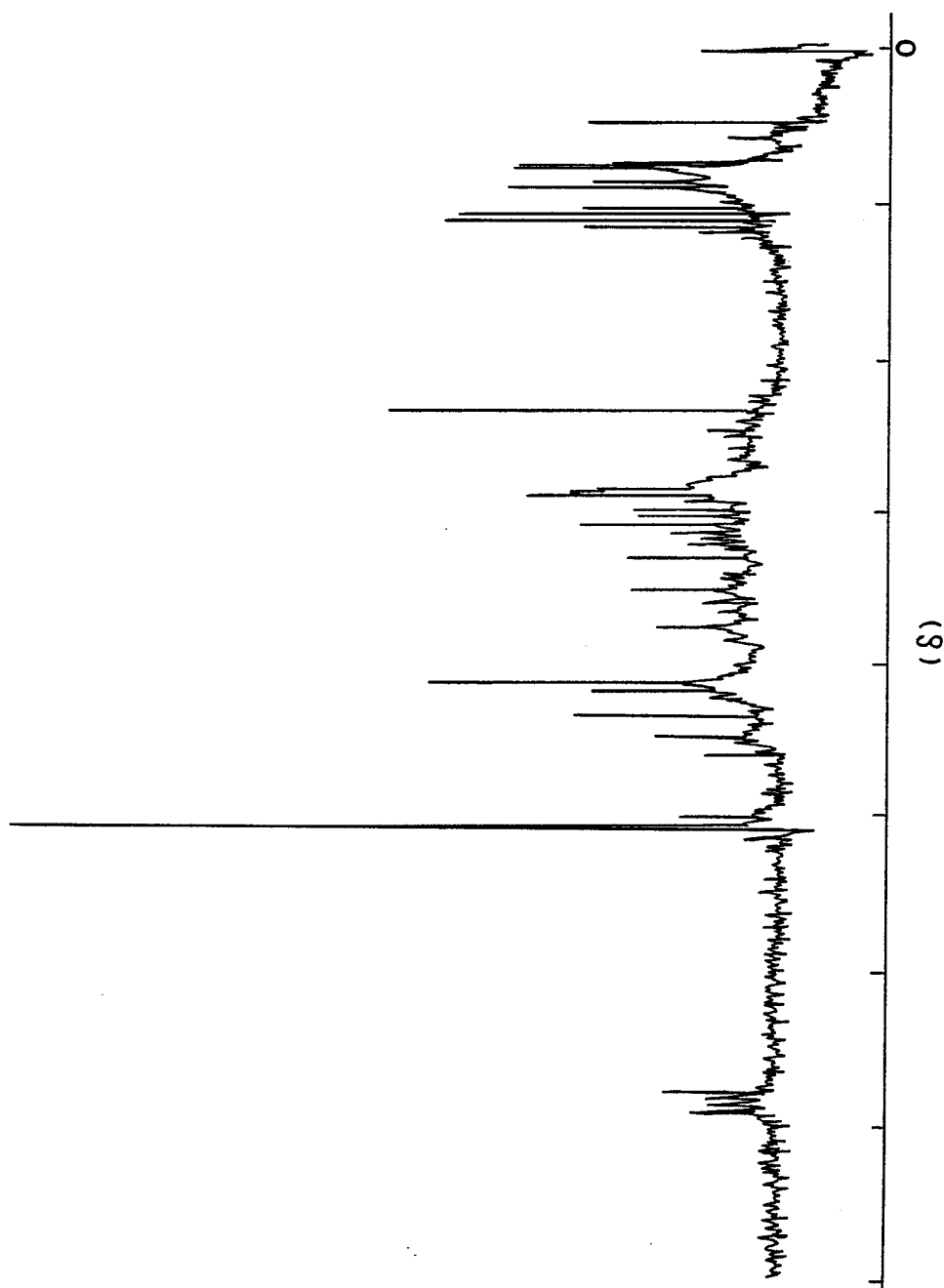
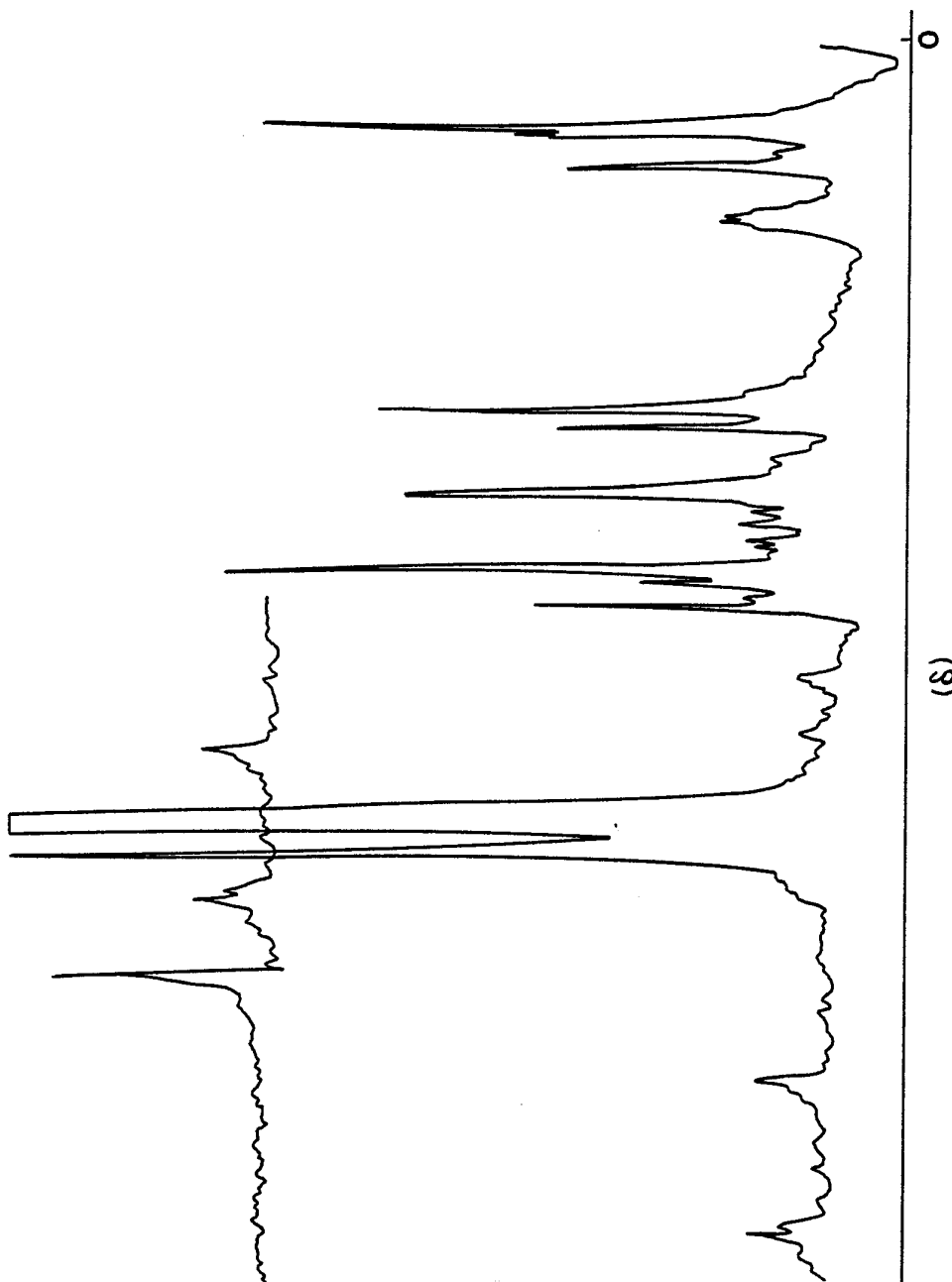


Fig.1

8001603

National Foundation for Cancer Research, BETHESDA, Maryland
Ver. St. V. Amerika

**Fig.2**

National Foundation for Cancer Research, BETHESDA, Maryland
Ver. St. v. Amerika

800 16 03

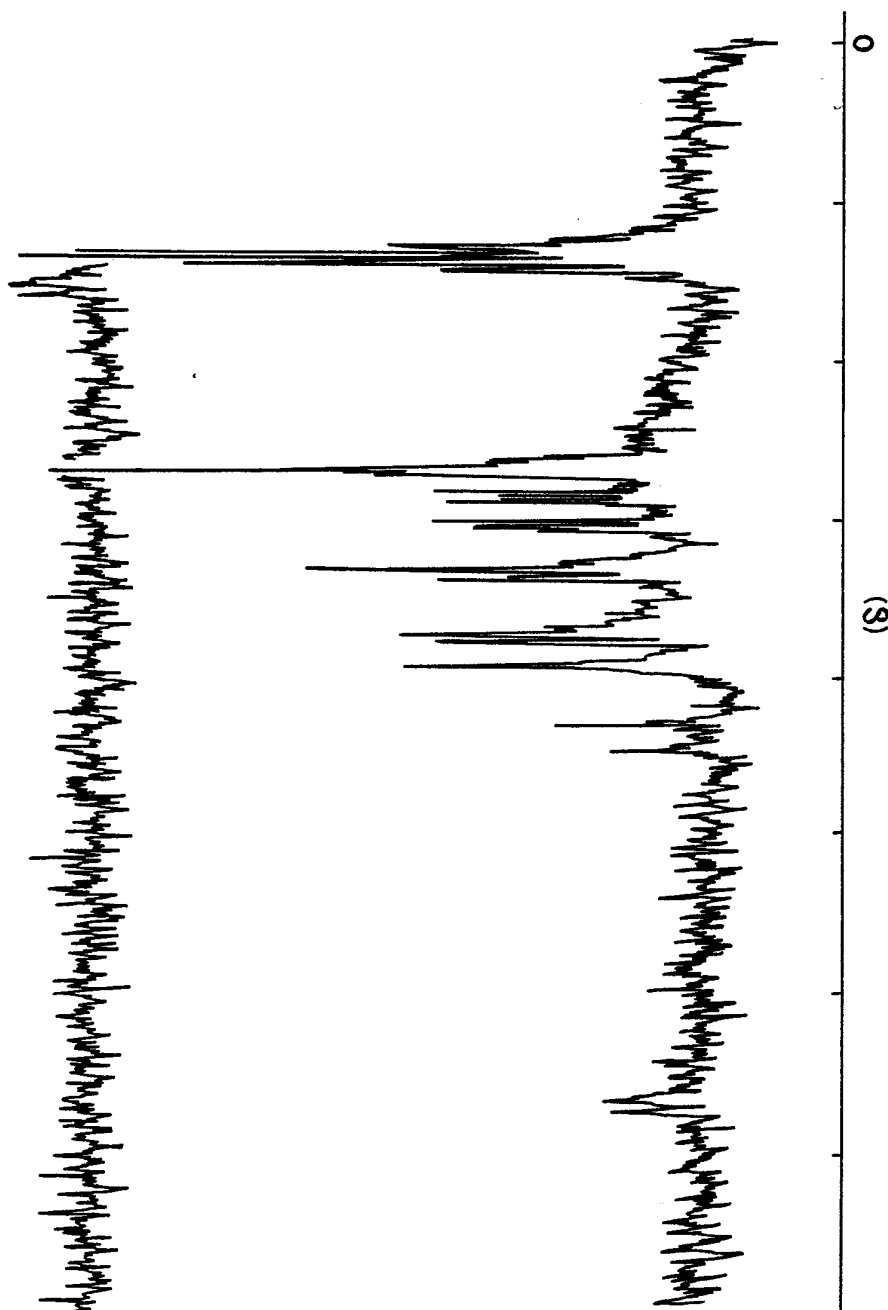


Fig. 3