
Octrooiraad



Nederland

⑩ A Terinzagelegging ⑪ 8101067

⑲ NL

- ⑤4 **Acylderivaten van carnitine, werkwijzen ter bereiding ervan alsmede farmaceutische preparaten, die deze derivaten bevatten.**
- ⑤1 Int.Cl³.: C07C 101/30, A61K 31/205.
- ⑦1 Aanvrager: Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A. te Rome.
- ⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8101067.
- ②2 Ingediend 5 maart 1981.
- ③2 Voorrang vanaf 6 maart 1980.
- ③3 Land van voorrang: Italië (IT).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 4809980 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 oktober 1981.

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

N.O. 29.943

Acylderivaten van carnitine, werkwijzen ter bereiding ervan alsmede farmaceutische preparaten, die deze derivaten bevatten.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een nieuwe klasse acylderivaten van carnitine (β -hydroxy γ -butyrobetaïne), een werkwijze ter bereiding ervan, alsmede het therapeutische gebruik.

5 Meer in het bijzonder heeft de onderhavige uitvinding betrekking op acylderivaten van carnitine met de algemene formule 1, waarin

X^- een anion, bij voorkeur een halogenide- of sulfaatanion en

R het radikaal van de volgende organische zuren zijn:

- 10 (a) onverzadigde organische zuren: acrylzuur, vinylazijnzuur en allylazijnzuur;
- (b) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een tertiaire alkylgroep: tert.butylazijnzuur en tert.butylpropionzuur;
- (c) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een cycloalkyl-
15 groep: cyclopentaancarbonzuur, cyclopentaanazijnzuur, cyclopentaanpropionzuur, cyclohexylazijnzuur en cyclohexylboterzuur;
- (d) verzadigde organische zuren gesubstitueerde met een cyclo-
20 alkenylgroep: 3-cyclohexeencarbonzuur en 2-cyclopenteenazijnzuur;
- (e) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een alkoxygroep: methoxyazijnzuur en ethoxyazijnzuur;
- (f) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een carbalkoxygroep: 3-carbomethoxypropionzuur en 4-carbomethoxyboterzuur;
- 25 (g) met hydroxy gesubstitueerde verzadigde organische zuren: 2-hydroxyisoboterzuur, 2-hydroxyisovaleriaanzuur, 2-hydroxyisocapronzuur, 2-hydroxy-2-methylboterzuur, 2-methyl-3-hydroxypropionzuur, 2-hydroxy-tert.butylazijnzuur, 3-hydroxy-3-methylglutaarzuur (monoester), 3-hydroxy-2-methylglutaarzuur (monoester) en 3-hydroxypropionzuur;
- 30 (h) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een aldehydgroep: 2-formylpropionzuur en formylisoboterzuur;
- (i) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een heterocyclische groep: 1,2-dithiolan-3-pentaaanzuur, 2-thiofeencarbonzuur en 2-thiofeenazijnzuur.
- 35

De onderhavige uitvinding omvat de verbindingen met formule 1

8101067

zowel in hun optische actieve vormen (hetzij D hetzij L) en in hun racemische vorm (D,L) en omvat eveneens een farmacologisch aanvaardbare zouten, waarbij deze optisch actief of inactief zijn.

De verbindingen met formule 1 kunnen in feite bereid worden als zodanig of in de vorm van zouten met minerale zuren of met alifatische en aromatische mono- of polyzuren of met sulfonzuren en sulfaminezuren.

In het algemeen hebben de verbindingen met formule 1 en hun overeenkomstige farmacologisch aanvaardbare zouten opmerkelijke cardiotrope, hyperlipoproteïnemische en hyperlipidemische activiteiten laten zien.

De verbindingen met formule 1 worden gewoonlijk bereid in de vorm van chloriden.

Het verdient in feite de voorkeur β -hydroxy- γ -butyrobetaïne-chloride om te zetten met het zuurchloride van de hiervoor vermelde geschikte zuren (a) tot en met (i).

De werkwijze ter bereiding van deze nieuwe acylderivaten heeft gewoonlijk plaats bij een temperatuur tussen 0°C en 80°C in een watervrije omgeving en bij aanwezigheid van een organisch oplosmiddel gekozen uit de groep bestaande uit trifluorazijnzuur en de onder formule 1 hiervoor vermelde lijst zuren (a) tot en met (i) overeenkomend met het gebruikte zuurchloride. Wanneer het zuurchloride vast is en niet gemakkelijk oplosbaar in het organische oplosmiddel, is het mogelijk de oplosbaarheid ervan op een zodanige wijze te verbeteren, dat een homogene fase verkregen wordt door toevoeging van een kleine hoeveelheid van een gechloreerd oplosmiddel, zoals chloroform of watervrij dichloormethaan.

In het bijzonder dient er op gelet te worden, dat de omgeving watervrij wordt gehouden door het reactiesysteem te beschermen met geschikte dehydrateringsmiddelen, bijvoorbeeld calciumchloride bevattende buizen.

Aan het einde van de reactie wordt het verkregen mengsel gekoeld en gewoonlijk met aceton behandeld; de eventueel afgescheiden vaste stof wordt verwijderd, terwijl het precipitaat, dat door toevoeging van diethylether wordt gevormd, verzameld wordt.

Het precipitaat kan gezuiverd worden door kristallisatie met diethylether. In het algemeen zijn een of twee kristallisaties voldoende voor het verkrijgen van een produkt met grote zuiverheid, hetgeen gemakkelijk gecontroleerd kan worden door dunne-laag-chromatografie (D.L.C.) onder toepassing van siliciumoxide-

platen en verschillende elueermiddelen zoals CHCl_3 -MeOH-geconc.
 NH_4OH (50:30:8 volumeverhouding) of n-BuOH-azijnzuur- H_2O
 (60:20:20 volumeverhouding).

In het algemeen varieert de reactieopbrengst van 60 tot 85 %
 met dien verstande, dat de eventuele opbrengst-verlaging, die
 plaats kan hebben tijdens de zuivering door kristallisatie, niet
 in overweging is genomen.

De volgende voorbeelden lichten naast de opstelling van de
 verschillende fysisch-chemische gegevens van enkele verbindin-
 gen van de onderhavige uitvinding, het syntheseproces zonder de
 uitvinding te beperken, toe.

Voorbeeld I

Bereiding van tert.butylacetylcarnitinechloride
 (verbinding met formule 2)

1,97 g (0,01 mol) carnitinechloride werden in 10 cm^3 tri-
 fluorazijnzuur opgelost. Aan de oplossing werden 1,4 cm^3 (0,01 mol)
 tert.butylacetylchloride langzaam onder roeren toegevoegd. Het
 reactiemengsel werd 48 uren bij kamertemperatuur geroerd. Aan het
 mengsel werd diethylether toegevoegd en het aldus verkregen neer-
 slag werd afgefiltreerd. Het onzuivere produkt werd gekristalli-
 seerd uit isopropanol-diethylether, waarbij een zuiver produkt
 werd verkregen. Smeltpunt $164 - 165^\circ\text{C}$.

Opbrengst 80 %.

NMR δ 5,6 (m, 1H, $-\text{CH}-$); 3,9 (d, 2H $\equiv \text{N}-\text{CH}_2-$); 3,3 (s, 9H,
 OCO)

25 CH_3 $\searrow$
 CH_3 $\xrightarrow{\text{N}^+}$); 2,9 (d, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$); 2,4 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$ $-\text{C}\equiv$);
 CH_3 $\nearrow$
 1,0 (s, 9H, $-\text{C}$ $\begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3 \\ \text{---} \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array}$); D_2O .

Voorbeeld II

(a) Bereiding van cyclohexylacetylchloride
 (verbinding met formule 3)

2,5 g (0,02 mol) cyclohexylazijnzuur werden met 3,7 cm^3
 (0,05 mol) SOCl_2 gemengd en de verkregen oplossing werd 90 minu-
 ten op 80°C gehouden. Het mengsel werd onder een verminderde druk
 geconcentreerd en enkele wasbehandelingen werden uitgevoerd met
 watervrije toluen ter verwijdering van SOCl_2 . Vervolgens werd
 het mengsel onder een verminderde druk gedroogd en het bovenge-
 noemde produkt werd verkregen als een grondstof, die als zodanig

bij de volgende trap (b) werd gebruikt.

(b) Bereiding van cyclohexylacetylcarnitinechloride

(verbinding met formule 4)

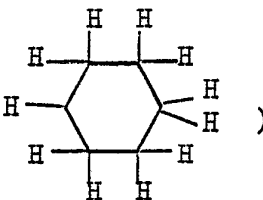
2,97 g (0,01 mol) carnitinechloride werden in 10 cm³ tri-
 5 fluorazijnzuur opgelost. Aan deze oplossing werd 0,01 mol cyclo-
 hexylacetylchloride, bereid zoals hiervoor beschreven, toegevoegd
 en het verkregen mengsel werd 48 uren geroerd. Daarna werd diethyl-
 ether toegevoegd en het verkregen mengsel werd 30 minuten bij 0°C
 geroerd. Een neerslag werd verkregen, dat werd afgefiltreerd en
 10 onder een verminderde druk werd gedroogd.

Smeltpunt 161 - 162°C, opbrengst 70 %.

NMR δ 5,6 (m, 1H, -CH-); 3,8 (m, 2H, $\begin{smallmatrix} \text{O} \\ | \\ \text{C} \end{smallmatrix} \text{N}^+ \text{CH}_2 \text{-}$); 3,2 (s, 9H,
 $\begin{smallmatrix} \text{O} \\ | \\ \text{C} \end{smallmatrix} \text{CO}$)

$\begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix} \text{N}^+$); 2,8 (d, 2H, $\text{-CH}_2\text{COOH}$); 2,3 (d, 2H, $\text{O-COCH}_2 \text{-}$);

2,0-0,8 (m, 11H,



15 Voorbeeld III

Bereiding van cyclopentaanpropionylcarnitinechloride

1,97 g (0,01 mol) carnitinechloride werden in 10 cm³ tri-
 fluorazijnzuur opgelost, aan de verkregen oplossing werden 1,60 g
 (0,01 mol) 3-cyclopentaanpropionylchloride langzaam onder roeren
 20 toegevoegd. Het verkregen mengsel werd een nacht bij 45°C geroerd.
 Vervolgens werd het mengsel gekoeld, werden 40 ml aceton toege-
 voegd en werd het mengsel 2 uren in ijs geroerd. Het aldus gevorm-
 de neerslag werd afgefiltreerd en aan het filtraat werd diethyl-
 ether toegevoegd. De witte vaste stof, die neersloeg, werd in
 25 ethanol-aceton (5 : 1) opgelost en opnieuw met ether neergeslagen.
 Smeltpunt 170 - 172°C, opbrengst 90 %.

NMR (D₂O) δ 5,5 (m, 1H, $\text{CH}_2 \text{-CH-CH}_2$)

2,8 (d, 2H, N-CH_2)

3,2 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$)

30 2,7 (d, 2H, $\text{CH}_2 \text{-COOH}$)

2,4 (t, 2H, $\text{CH}_2 \text{-CH}_2 \text{-}$)

1,9-0,9 (m, 11H, $\text{-CH}_2 \text{-}$)

8101067

Voorbeeld IVBereiding van vinylacetylcarnitinechloride

(verbinding met formule 5)

Aan een oplossing van 2 g (0,01 mol) carnitinechloride in
 5 6 ml trifluorazijnzuur werden 1,8 ml (0,02 mol) vinylacetylchlori-
 de onder roeren bij kamertemperatuur toegevoegd. Het reactiemeng-
 sel werd vervolgens op 50°C gebracht en een nacht onder reactie-
 omstandigheden gehouden. Vervolgens werd het mengsel tot kamertem-
 peratuur gekoeld, in 200 ml diethylether gegoten en 20 minuten ge-
 10 roerd. De etherfase werd gedecanteerd en het aldus verkregen neer-
 slag werd opgenomen met acetonitrile en de verkregen oplossing
 werd 2 uren bewaard. Het niet-omgezette carnitine, dat werd afge-
 scheiden in de vorm van een kristallijne vaste stof, werd afgefil-
 treerd en aan het filtraat werd diethylether toegevoegd. Het aldus
 15 gevormde neerslag was een witte kristallijne vaste stof.
 DLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$, 55 : 35 : 5 : 5) Rf 0,55.

NMR (D_2O) δ : 2,88 (2H, d- CH_2 -COOH); 3,28 (11H, m, $\text{N}^+ \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$,
 - CH_2 -OCO-); 3,73-4,03 (2H, m- $\text{CH}_2\text{N} \equiv$); 5,06-6,26 (4H, m,
 $\text{CH}_2=\text{CH}-$, - $\text{CH}-$).
 OCO-

20 In hetzelfde NMR spectrum waren ook de volgende betekenis-
 volle signalen aanwezig, die werden toegeschreven aan het isomeer
 crotonoylcarnitine:

δ 1,95 (3H, d.d., $\text{CH}_3\text{-C=}$); 6,64-7,38 (2H, m, - $\text{CH}=\text{CH}-$).

Bij berekening van de integralen van de voorgaande signalen
 25 was het mogelijk de hoeveelheid isomeer te evalueren, die aanwezig
 was in het produkt in een hoeveelheid van ongeveer 15 - 20 %.

Voorbeeld VBereiding van ethoxyacetylcarnitineisobutylester

(a) Bereiding van carnitineisobutylester.

30 10 g (0,05 mol) carnitinechloride werden in 100 ml isobutanol
 gesuspenseerd. De suspensie werd met een ijsbad gekoeld en gasvor-
 mig HCl werd erdoor geborrelt tot volledige verzadiging bereikt
 was. Het verkregen mengsel werd 2 uren onder terugvloeiing verhit.
 Het mengsel werd vervolgens geconcentreerd om de alcohol te verwij-
 35 deren, het concentraat werd in gedestilleerd water opgelost en de
 oplossing werd geneutraliseerd met IR-45 hars. Het verkregen pro-
 dukt werd gelyofiliseerd, waarbij 12 g carnitineisobutylester wer-

den verkregen.

(b) Bereiding van ethoxyazijnzuurchloride.

1,1 cm³ (0,0125 mol) thionylchloride werden aan 1,3 cm³ (0,012 mol) ethoxyazijnzuur toegevoegd. Het verkregen mengsel werd 12 uren op kamertemperatuur gehouden. Het reactiemengsel werd driemaal gewassen met een mengsel van chloroform en water vrije diethylether en vervolgens onder een verminderde druk van 11,1 kPa bij 30°C geconcentreerd. 1,15 g ethoxyazijnzuurchloride werden verkregen.

10 (c) Reactie tussen carnitineisobutylester en ethoxyazijnzuurchloride.

1,1 g (0,043 mol) carnitineisobutylester werden in water vrije aceton opgelost en aan de verkregen oplossing werden 1,15 g (0,009 mol) ethoxyazijnzuurchloride toegevoegd. Het reactiemengsel 15 werd gedroogd en het residu werd in een atmosfeer van inert gas (argon) twee dagen bij kamertemperatuur gehouden. Het residu werd vervolgens gekristalliseerd uit isopropanol-diethylether. Het beoogde produkt werd verkregen in een opbrengst van 65 %.

D.L.C. Elueermiddel: CHCl₃ 40
 20 CH₃ OH 40
 CH₃ COONa 0,01M 10
 NMR D₂O δ 5,8 (1H, m, CH);
 OCO
 4,2 (2H, s, -COCH₂ O-); 4,0 (4H, m, -COOCH₂-, O-CH₂CH₃); 3,7 (2H, d, $\xrightarrow{+}$ N-CH₂-); 3,3 (9H, s, CH₃-N⁺); 2,7 (2H, d, -CH₂ COO-); 1,9 (1H, m, CH-CH₃); 1,6 (2H, t, -CH₂CH₃); 1,1 (6H, d, -CH-CH₃).

Voorbeeld VI

30 Bereiding van 3-cyclohexenylcarboxylcarnitinechloride

(a) Bereiding van 3-cyclohexeencarboxylchloride

1,2 cm³ (0,01 mol) cyclohexeencarbonzuur werden met 0,9 cm³

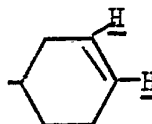
(0,01 mol) oxalylchloride gemengd en het verkregen mengsel werd 3,5 uren bij kamertemperatuur geroerd.

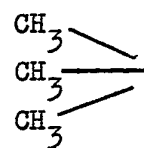
Vervolgens werd de oplossing onder een verminderde druk van 13,3 kPa bij 70°C geconcentreerd. Het aldus verkregen onzuivere
5 produkt werd als zodanig bij de volgende trap gebruikt.

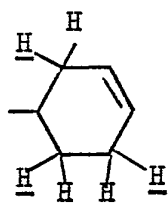
(b) Reactie van 3-cyclohexeencarbonzuurchloride met carnitine-chloride.

1 g (0,05 mol) carnitinechloride werd in 2 cm³ trifluorazijn-
zuur opgelost. Aan de verkregen oplossing werd langzaam onder roe-
10 ren bij kamertemperatuur 0,01 mol van het bij de voorafgaande trap
verkregen chloride toegevoegd. Het verkregen reactiemengsel werd
15 uren geroerd. Diethylether werd vervolgens aan het reactiemeng-
sel toegevoegd en een neerslag werd verkregen, dat vervolgens twee-
maal met diethylether werd gewassen om de overmaat zuurchloride te
verwijderen. Het neerslag werd afgefiltreerd en onder een vermin-
derde druk gedroogd. Opbrengst: 90 %.

D.L.C. Elueermiddel:	CHCl ₃	60
	MeOH	40
	H ₂ O	15
20	Isopr OH	10
	CH ₃ COOH	15

NMR (D₂O) δ 5,76 (3H, m, , );

3,9 (2H, d, -CH₂ -); 3,27 (9H, s, );

2,86 (2H, d, -CH₂ COO-); 2,00 (7H, m, ).

25 Voorbeeld VII

Bereiding van 3-carbomethoxypropionylcarnitinechloride

Aan een oplossing van 4 g (20 mmol) carnitinechloride in trifluorazijnzuur werden 3,0 cm³ (24 mmol) 3-carbomethoxypropio-
nylchloride toegevoegd en het verkregen reactiemengsel werd een
30 nacht bij 45°C geroerd. Vervolgens werd het mengsel gekoeld en
diethylether werd toegevoegd. De gevormde vaste stof werd uit iso-
propanol gekristalliseerd.

Smeltpunt 160 - 161°C

D.L.C. : $\text{CH Cl}_3\text{MeOH/CH}_3\text{COONa}$

40/40/20 m.u.

NMR: D_2O = 2,75 (4H s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
 2,80 (2H d, $\text{CH}_2\text{-COOH}$)
 5 3,25 (9H s, $(\text{CH}_3)_3$)
 3,70 (3H s, COOCH_3)
 3,80 (2H d, N-CH_2)
 5,65 (m, $\text{-CH}_2\text{-CH-CH}_2$)

Voorbeeld VIII

10 Bereiding van 4-carbomethoxybutyrylcarnitinechloride

Aan een oplossing van 2,0 g (10 mmol) carnitinechloride in 5 cm³ TFA, werden 1,65 cm³ (12 mmol) 4-carbomethoxybutyrylchloride toegevoegd en het verkregen reactiemengsel werd 24 uren bij kamertemperatuur geroerd. Aan dit mengsel werd vervolgens watervrije
 15 diethylether toegevoegd. Een vaste stof werd gevormd, die werd afgefiltreerd en uit warme isopropanol werd gekristalliseerd.

Smeltpunt 130 - 132°C

NMR D_2O δ 5,6 (1H, m, -CH-); 3,7 (5H, m, =N-CH_2 , -OCH_3);
 OCO

3,2 (9H, s, $\text{CH}_3\text{-N-}$); 2,8 (2H, d, $\text{-CH}_2\text{COOH}$);
 CH_3

20 2,4 (4H, m, $\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COO-}$); 1,9 (2H, m, $\text{-OCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$).

Voorbeeld IX

Bereiding van methoxyacetylcarnitinechloride

Een mengsel van 3 ml (0,04 mol) methoxyazijnzuur en 3 ml
 25 (0,03 mol) methoxyacetylchloride werd 2 uren bij 30°C geroerd. Aan dit mengsel werden 4 g (0,02 mol) carnitinechloride, dat vooraf was gedroogd, toegevoegd. Het verkregen mengsel werd op 40°C gebracht en 7 dagen geroerd. Vervolgens werd het mengsel opgenomen met acetonitrile en het niet-omgezette carnitinechloride werd af-
 30 gefiltreerd. Na toevoeging van tert.butylmethylether sloeg een olie neer. De olieprecipitatie werd viermaal herhaald met acetonitrile/tert.butylmethylether. De olie, die tenslotte werd afgescheiden, werd gelyofiliseerd. 4 g methoxyacetylcarnitinechloride werden op deze wijze verkregen. Opbrengst: 75 %

35 NMR D_2O δ 5,68 (1H, m, -CH-); 4,21 (2H, s, $\text{-COCH}_2\text{O-}$);
 OCO

3,85 (2H, d, $\text{=N}^+\text{-CH}_2\text{-}$); 3,45 (3H, s, -OCH_3);

3,23 (9H, s, $\text{CH}_3\text{-N}^+$); 2,85 (2H, d, $\text{-CH}_2\text{COOH}$).

Voorbeeld X

Bereiding van ethoxyacetylcarnitinechloride

- 5 Een mengsel van 5 ml (0,07 mol) ethoxyazijnzuur en 1,8 ml (0,015 mol) ethoxyacetylchloride, dat bereid was zoals beschreven in trap (b) van voorbeeld V, werd 2 uren bij 80°C geroerd. Aan dit mengsel werden 2 g (0,01 mol) carnitinechloride, dat vooraf was gedroogd, toegevoegd. Het verkregen mengsel werd eerst op 80°C ge-
- 10 houden tot volledige oplossing van carnitine had plaats gevonden, gevolgd door 8 dagen op 40°C. Een verdere hoeveelheid ethoxyacetylchloride (0,9 ml, 0,007 mol) werd toegevoegd en het verkregen mengsel werd 7 dagen op 40°C gehouden. Na toevoeging aan het mengsel van tert.butylmethylether sloeg een olie neer. De olieprecipitatie
- 15 werd viermaal herhaald met acetonitrile/tert.butylmethylether tot volledige verwijdering van de overmaat ethoxyazijnzuur. 1,5 g van de beoogde verbinding werden op deze wijze verkregen.
- Opbrengst: 75 %.

NMR D_2O δ 5,96 (1H, m, -CH-); 4,23 (2H, s, $\text{-COCH}_2\text{-O}$);

OCO

20 3,78-3,50 (4H, m, $\text{=N}^+\text{-CH}_2\text{-}$; $\text{-OCH}_2\text{CH}_3$); 3,23 (9H, s, $\text{CH}_3\text{-N}^+$);

2,85 (2H, d, $\text{-CH}_2\text{COOH}$); 1,2 (3H, t, $\text{-OCH}_2\text{CH}_3$).

De kenmerken van de farmacologische activiteit van de verbindingen met de algemene formule 1 zijn hierna toegelicht.

- De acute toxiciteit van de verbindingen met de algemene formule 1 werd onderzocht bij muizen onder toepassing van de methode van Weil (Weil C.S., Biometr. J. 8, (1952) 249. De in tabel A hierna gegeven LD_{50} -waarden laten zien, dat de verbindingen een goede tolerantie hebben.

- Het cardiokinetische effect werd onderzocht bij konijne-harten,
- 30 die geïsoleerd waren volgens de methode van Langendorff. Volgens deze methode geïsoleerde konijne-harten werden bij 38,2°C overgoten met een met zuurstof behandelde Ringer oplossing. De isometrische contracties, het elektro-cardiogram en de coronaire stroming werden geregistreerd onder toepassing van een "Battaglia-Rangoni"

8101067

polygraaf. Door verwijdering van de zuurstof uit de perfusie-vloeistof werd een metabolische beschadiging teweeg gebracht in de hartspier tot een reductie van 80 % in de cardiale contractiekracht.

5 Onder deze omstandigheden van voortgezette anoxie wordt de aerobe glycolyse van het myocardium vertraagd met de begeleidende vorming van zure catabolieten tengevolge van zowel de accumulatie van pyrodruivezuur en de omzetting ervan tot melkzuur, die niet nuttig gebruikt kunnen worden vanwege de verlaging van pyridine-
10 enzymen, zoals LDH (lactodehydrogenase). Dit heeft repercussies op de anaerobe glycolyse onder beïnvloeding van ^{een} steeds toenemend aantal enzymen, vergezeld van een progressieve en toenemend kritische uitputting van het myocardium. Derhalve komt een gehele reeks hartspier-vermoeidheidsniveaus voor, die kunnen worden waar-
15 genomen door het gedrag van de onderzochte parameters, namelijk de contractiekracht, de coronaire stroming, het harttempo en het hartritme. Zodra de contractiekracht met 80 % verminderd was, werd de perfusie-vloeistof opnieuw met zuurstof behandeld hetzij zonder toevoeging van andere verbindingen (controle) hetzij met
20 toevoeging van de onderzochte verbindingen.

Tabel B geeft de percentage-waarden van de contractiekracht van het hart, waarbij een positief inotroop effect wordt getoond, berekend na 10 minuten vanaf de onderbreking van de anoxie periode (myocardisch herstel).

25 Het anti-aritmische effect van de verbindingen werd eveneens bij muizen onderzocht volgens de methode van P.W. Nwangwu en T. Holcslow (P.W. Nwangwu, T.L. Holcslow; Arch. Int. Pharmacodyn. 229, (1977) 219. Onder toepassing van aconitine (5 γ /ml) als aritmogeen middel, werden de veranderingen in het hartritme van de
30 dieren geregistreerd en de aanvangstijd van initiële aritmie en/of ventriculaire tachycardie werd (en) als eindpunt gebruikt. De resultaten zijn in tabel C samengevat.

Het effect van de verbindingen op de modificatie van het lipoproteïne-patroon alsmede op de niveaus van plasma cholesterol
35 en triglyceriden, gewijzigd door orale toediening van olijfolie, werd onderzocht bij normaal gevoederde ratten, oraal behandeld met 15 ml kg^{-1} olijfolie 1 uur voordat de verbinding oraal werd toege-
diend en met de verbindingen bij verschillende concentraties.

Het meest belangrijke effect, 2 uren na de toediening van
40 olijfolie, dat een toename in triglyceriden en cholesterol met zich

bracht met vermindering van α -lipoproteïnen en toename van de β - en voor- β -fracties, werd goed geantagoneerd door sommige verbindingen, die, zoals aangegeven in tabel D, bewezen in staat te zijn de voorgaande parameters, die in ruime zin de grenzen van de

5 statistische betekenis bereiken, tot normaal terug te brengen.

Tabel A

LD₅₀, mg kg⁻¹ i.p. in muizen van enkele acylderivaten met de algemene formule 1. Weil methode (N= 5, K=4)

Verbindingen	LD50	en betrouwbaarheids- grenzen
acrilyl-CAR	1380	(950-1800)
vinyl-CAR	1200	(800-1600)
tert.butyl ACAR	1115	(789-1440)
cyclohexyl ACAR	850	(572-1128)
cyclohexyl-butyryl CAR	925	(675-1175)
2-cyclopenteen ACAR	1200	(850-1550)
ethoxyacetyl CAR	760	(545-975)
3-carbomethoxypropionyl CAR	985	(709-1260)
2-hydroxy-isobutyryl CAR	1470	(1170-1770)
2-hydroxy-isovaleryl CAR	1585	(1227-1943)
formyl-propionyl CAR	1010	(850-1170)
ethoxy ACAR	2120	(1820-2420)
methoxy ACAR	1980	(1630-2330)
monomethylglutaryl CAR	1870	(1620-2120)

Tabel B

Effect van enkele acylderivaten van carnitine met de algemene formule 1 op de contractiekracht van konijnhart in vitro.

Verbindingen	Concentratie	Contractiekracht gem. - ESM	P
Krebs. (controle)	-	26,93 [±] 5,31	
acrilyl CAR	10 ⁻⁶ M	55,31 [±] 4,36	≤ 0,01
vinyl CAR	10 ⁻⁶ M	48,25 [±] 5,12	≤ 0,01
tert.butyl ACAR	10 ⁻⁶ M	59,33 [±] 5,26	≤ 0,001
cyclohexyl ACAR	10 ⁻⁶ M	43,18 [±] 4,81	≤ 0,05
cyclohexylbutyryl CAR	10 ⁻⁶ M	42,15 [±] 4,17	≤ 0,05
2-cyclopentenyl ACAR	10 ⁻⁶ M	59,83 [±] 3,26	≤ 0,01
ethoxyacetyl CAR	10 ⁻⁶ M	62,25 [±] 3,24	≤ 0,01
3-carbomethoxypropionyl CAR	10 ⁻⁶ M	70,35 [±] 5,23	≤ 0,001
2-hydroxy-isobutyryl CAR	10 ⁻⁶ M	73,88 [±] 4,12	≤ 0,001
2-hydroxy-isovaleryl CAR	10 ⁻⁶ M	82,53 [±] 4,09	≤ 0,001
formylpropionyl CAR	10 ⁻⁶ M	74,26 [±] 4,15	≤ 0,001
ethoxy ACAR	10 ⁻⁶ M	78,15 [±] 3,12	≤ 0,001
methoxy ACAR	10 ⁻⁶ M	81,25 [±] 4,08	≤ 0,001
monomethylglutaryl CAR	10 ⁻⁶ M	58,12 [±] 4,25	≤ 0,01

8101067

Tabel C

Effect van enkele acylderivaten van carnitine met de algemene formule 1 op het arhythmie opgewekt door aconitine bij muizen. % Toename van de latentheidstijd tot begin van initiële hartarythmie en tachycardie met betrekking tot de controle groep.

Verbindingen	Concentraties mg kg ⁻¹ i.v.	Latentheidstijd voor arhythmie	tachycardie
acryl CAR	50	45	39
vinyl CAR	38	53	41
tert.butyl ACAR	25	59	36
cyclohexyl ACAR	35	63	44
cyclohexylbutyryl ACAR	50	48	32
cyclopentenyl ACAR	100	40	20
ethoxyacetyl CAR	100	40	20
3-carbomethoxypropionyl CAR	25	65	39
2-hydroxy-isobutyryl CAR	25	55	48
2-hydroxy-isovaleryl CAR	40	60	30
formylpropionyl CAR	60	55	34
ethoxy ACAR	20	60	55
methoxy ACAR	25	65	50
monomethylglutaryl CAR	30	52	40
chinidine	8,9	50	41,7

8101067

Tabel D

Effect van enkele acyl-carnitine-derivaten met de algemene formule 1 op plasma cholesterol (Chol.) triglyceriden (TG) en α -, β - en vóór- β -lipoproteïnen in ratten behandeld met olijfolie, 15 ml kg^{-1} oraal, 1 uur vóór toediening van de verbinding.

Verbindingen	mg kg^{-1}	olie ml kg^{-1}	TG mg/100 ml	Chol. mg/100 ml
Blanco	-	-	75,12 $\pm$ 6,15 $\blacktriangle$	65,15 $\pm$ 6,18 $\blacktriangle$
Controle	-	15	215,36 $\pm$ 20,18	96,18 $\pm$ 4,16
vinyl CAR	300	15	112,15 $\pm$ 15,16 n.s.	78,15 $\pm$ 6,16 n.s.
tert.butyl CAR	350	15	99,36 $\pm$ 10,12 $\blacktriangle$	70,12 $\pm$ 3,24 $\triangle$
cyclohexyl CAR	400	15	100,12 $\pm$ 15,16 $\triangle$	85,15 $\pm$ 4,26 n.s.
3-carbomethoxypropionyl CAR	350	15	88,15 $\pm$ 15,36 $\blacktriangle$	69,25 $\pm$ 3,26 $\blacktriangle$
2-hydroxyisobutyryl CAR	450	15	100,29 $\pm$ 12,48 $\blacktriangle$	75,03 $\pm$ 4,12 $\triangle$
ethoxy ACAR	250	15	78,25 $\pm$ 10,12 $\blacktriangle$	70,26 $\pm$ 6,48 $\blacktriangle$
methoxy ACAR	300	15	85,14 $\pm$ 13,26 $\blacktriangle$	72,12 $\pm$ 6,87 $\blacktriangle$
monomethylglutaryl CAR	400	15	120,36 $\pm$ 14,15 $\blacktriangle$	81,27 $\pm$ 5,92 n.s.

8101067

Tabel D (vervolg)

Verbindingen	mg kg ⁻¹	olie -1 ml kg ⁻¹	α	% lipoproteïnen β	voor- β
Blanco	-	-	36,15 ⁺² ,12 ▲	10,15 ⁺¹ ,23 ▲	49,22 ⁺² ,17 ▲
Controle	-	15	23,28 ⁺² ,19	16,12 ⁺¹ ,48	56,45 ⁺² ,36
vinyl CAR	300	15	29,46 ⁺³ ,15 n.s.	14,13 ⁺¹ ,63 n.s.	48,89 ⁺² ,96 n.s.
tert.butyl CAR	350	15	31,12 ⁺² ,17 □	13,27 ⁺¹ ,12 □	51,36 ⁺² ,11 □
cyclohexyl CAR	400	15	36,48 ⁺² ,36 ▲	12,15 ⁺¹ ,09 ▲	49,12 ⁺² ,17 ▲
3-carbomethoxypropionyl CAR	350	15	34,17 ⁺³ ,23 ▲	11,18 ⁺¹ ,15 ▲	50,03 ⁺² ,09 ▲
2-hydroxyisobutyryl CAR	450	15	27,19 ⁺³ ,48 n.s.	10,36 ⁺¹ ,12 ▲	48,36 ⁺¹ ,15 ▲
ethoxy ACAR	250	15	37,15 ⁺² ,17 ▲	10,28 ⁺¹ ,52 ▲	42,15 ⁺² ,27 ▲
methoxy ACAR	300	15	36,39 ⁺³ ,12 ▲	12,32 ⁺¹ ,65 ▲	45,83 ⁺³ ,46 ▲
monomethylglutaryl CAR	400	15	35,28 ⁺³ ,94 n.s.	14,25 ⁺¹ ,83 n.s.	51,12 ⁺⁴ ,15 n.s.

Student "t" proef voor het verschil met betrekking tot de controle

□ , Δ e ▲ geven respectievelijk $P \leq 0,05$, $0,01$ en $0,001$. N = 6 aan.

FARMACEUTISCHE PREPARATEN

1. Oplossingen en steriele waterige oplossingen, die acyl-carnitinen met formule 1 in concentraties van 25 mg tot 500 mg per ml bevatten.

- 5 a) Het versnijdingsmiddel voor injecteerbare ampullen/flesjes wordt bereid volgens de volgende niet-beperkende samenstelling:

natriumcarboxymethylcellulose (met lage viscositeit)	10 mg/ml
---	----------

- | | |
|-------------------|-----------|
| 10 polysorbaat 80 | 4 mg/ml |
| propylparaben | 0,4 mg/ml |
- water voor injecties voldoende voor 1 ml, 2 ml, 5 ml en 10 ml ampullen/flesjes.

- 15 b) Het versnijdingsmiddel voor fleboclyse flessen, die 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml en 1000 ml bevatten, wordt bereid volgens de volgende niet-beperkende samenstelling:

NaCl	8,6 g/l
------	---------

KCl	0,3 g/l
-----	---------

CaCl ₂	0,33 g/l
-------------------	----------

- 20 water voor injecties voldoende voor 1 liter.

- c) Het versnijdingsmiddel voor flessen voor oraal gebruikt, die 5 ml tot 100 ml bevatten, wordt bereid volgens de volgende niet-beperkende samenstelling:

mannitol	11 mg/ml
----------	----------

- | | |
|-------------|-----------|
| 25 sorbitol | 600 mg/ml |
|-------------|-----------|

natriumbenzoaat	3 mg/ml
-----------------	---------

sinaasappelextract	200 mg/ml
--------------------	-----------

vitamine B ₁₂	3 mcg/ml
--------------------------	----------

voldoende gezuiverd water.

- 30 2. Tabletten, die 20 mg tot 500 mg acyl-carnitine met formule 1 bevatten. Het versnijdingsmiddel wordt bereid volgens de volgende niet-beperkende samenstelling:

zetmeel	45 %
---------	------

avicel	45 %
--------	------

- | | |
|---------|------|
| 35 talk | 10 % |
|---------|------|

3. Capsules, die 20 mg tot 500 mg acyl-carnitine met formule 1 zonder versnijdingsmiddel bevatten.

4. Aerosol en spuitpreparaten met 500 mg tot 10 g van een acyl-carnitine met formule 1. Het versnijdingsmiddel wordt bereid volgens de volgende niet-beperkende samenstelling:
- 40

8101067

ethanol	30 %
gezuiverd water	30 %
voldoende freon 12/114 (gelijke delen)	

C O N C L U S I E S

1. Acylderivaten van carnitine met de algemene formule 1, waarin

- X^- een anion is, bij voorkeur een halogenide of sulfaat-anion, en
 5 R het radikaal is van de volgende organische zuren:
 (a) onverzadigde organische zuren,
 (b) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een tertiaire alkylgroep,
 (c) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een cycloalkyl-
 10 groep,
 (d) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een cycloalke-nylgroep,
 (e) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een alkoxy-groep,
 15 (f) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een carbalkoxygroep,
 (g) verzadigde, met hydroxy gesubstitueerde organische zuren,
 (h) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een aldehyd-groep en
 20 (i) verzadigde organische zuren gesubstitueerd met een hetero-cyclische groep.

2. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (a) gekozen is uit de groep bestaande uit acrylzuur, vinylazijnzuur en allylazijnzuur.

- 25 3. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (b) gekozen is uit de groep bestaande uit tert.butylazijnzuur en tert.butylpropionzuur.

4. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (c) gekozen is uit de groep
 30 bestaande uit cyclopentaancarbonsuur, cyclopentaanzijnzuur, cyclopentaanpropionzuur, cyclohexylazijnzuur en cyclohexylboterzuur.

5. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (d) gekozen is uit de groep
 35 bestaande uit 3-cyclohexeen-carbonsuur en 2-cyclopenteenazijnzuur.

6. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (e) gekozen is uit de groep bestaande uit methoxyazijnzuur en ethoxyazijnzuur.

7. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t
 40 h e t k e n m e r k, dat het zuur (f) gekozen is uit de groep

8101067

bestaande uit 3-carbomethoxypropionzuur en 4-carbomethoxyboterzuur.

8. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (g) gekozen is uit de groep
5 bestaande uit 2-hydroxy-isoboterzuur, 2-hydroxy-isovaleriaanzuur, 2-hydroxy-isocapronzuur, 2-hydroxy-2-methylboterzuur, 2-methyl-3-hydroxypropionzuur, 2-hydroxy-tert.butylazijnzuur, 3-hydroxy-3-methylglutaarzuur (monoester), 3-hydroxy-2-methylglutaarzuur (monoester) en 3-hydroxypropionzuur.

10 9. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (h) gekozen is uit de groep bestaande uit 2-formylpropionzuur en formyl-isoboterzuur.

10. Acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het zuur (i) gekozen is uit de groep
15 bestaande uit 1,2-dithiolan-3-pentaanzuur, 2-thiofeencarbonzuur en 2-thiofeenazijnzuur.

11. Acylderivaten van carnitine volgens conclusies 1 tot 10, m e t h e t k e n m e r k, dat de derivaten in hun optisch actieve vormen zijn.

20 12. Acylderivaten van carnitine volgens conclusies 1 tot 10, m e t h e t k e n m e r k, dat de derivaten in hun racemische vorm zijn.

13. Farmaceutisch aanvaardbaar zout van de acylderivaten van conclusies 1 tot 12.

25 14. Farmaceutisch preparaat voor de behandeling van hart-ziekten, hyperlipoproteïnemieën en hyperlipidemieën, m e t h e t k e n m e r k, dat het preparaat een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een of meer acylderivaten van carnitine volgens conclusies 1 tot 12, bevat.

30 15. Farmaceutisch preparaat voor de behandeling van hart-ziekten, hyperlipoproteïnemieën en hyperlipidemieën, m e t h e t k e n m e r k, dat het preparaat een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een farmaceutisch aanvaardbaar zout volgens conclusie 13 bevat.

35 16. Werkwijze ter bereiding van acylderivaten van carnitine volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat men
(1) volgens op zichzelf bekende methoden het chloride van het overeenkomstige zuur (a) tot en met (i) bereidt, en
(2) het chloride van trap (1) omzet met carnitine-chloride bij
40 aanwezigheid van een organisch oplosmiddel bij een tempera-

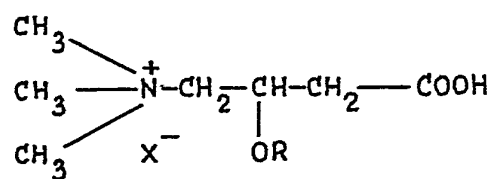
tuur tussen ongeveer kamertemperatuur en ongeveer 80°C.

17. Werkwijze volgens conclusie 16, m e t h e t k e n-
m e r k, dat men als organisch oplosmiddel trifluorazijnzuur en
de zuren (a) tot en met (i) overeenkomend met het zuurchloride
5 van trap (1) toepast.

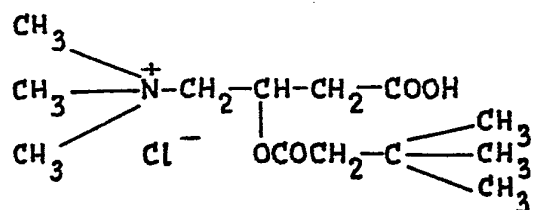
18. Werkwijze ter bereiding van een farmaceutisch preparaat,
m e t h e t k e n m e r k, dat men een of meer acylderivaten
van carnitine met de formule 1 in een voor een dergelijke toepas-
sing geschikte vorm brengt.

* * * * *

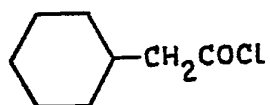
1.



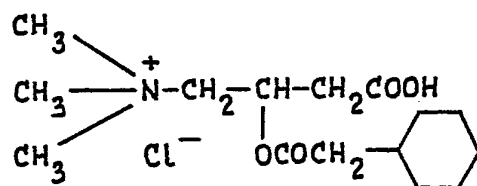
2.



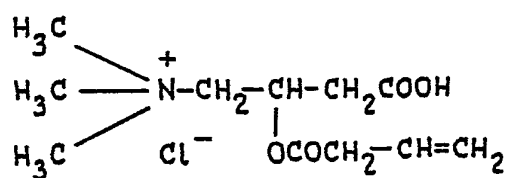
3.



4.



5.



8101067