

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 830078 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **830078**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁴)
C07D307/62

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **10.01.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **10.01.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **16.07.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

15.01.1982 US 339344

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Koppel, Gary Allen, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Barton, Russell Lavern, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Bewley, Jesse Robert, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Briggs, Stephen Lyle, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Parton, Joseph Wayne, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Askorbiinihappoeettereitä ja niitä lähellä olevia yhdisteitä.

Askorbinsyraetrar och liknande föreningar.

askorbiinihappoeettereitä ja niitä lähellä olevia yhdisteitä

Esillä oleva keksintö koskee yhdisteitä, joilla on angiogeneesistä ja niveltulehdusta vastustavaa aktiviteettia.

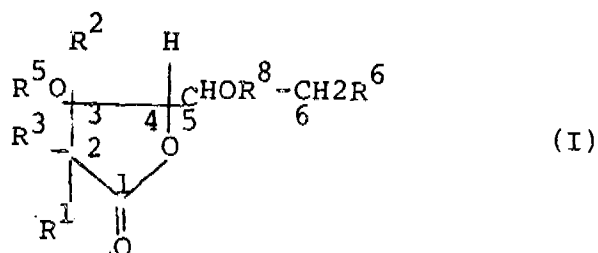
Angiogenesis tarkoittaa uusien verisuonien syntymisprosessia. Uusien verisuonien syntymistä esiintyy erilaisissa tautitiloissa, kuten kasvannaisen kasvussa, verkkokalvon muutoksissa, hilsetystaudissa ja nivelreumassa (jyväiskudosmuodostus).

Luonnossa esiintyviä angiogenesis-inhibiittoreita ovat useat tutkijaryhmästäneet rustosta, ja on osoitettu, että tällaiset angiogenesis-inhibiittorit inhiboivat erilaisia entsyymejä, kuten kollagenaasia. T.H. Maugh II, Angiogenesis Inhibitors Link Many Diseases, Science, 2.2: 1374-75 (1981). On myös ilmoitettu, että ruston angiogenesis-inhibiittorit ehkäisevät osteoklastien uudiskasvua, so. luun resorptiosta vastaavien solujen uudiskasvua.

Rustosta ja muista luonnon lähteistä eristetyt angiogenesis-inhibiittorit ovat proteiineja. Niitä on ollut saatavissa erittäin vähäisiä määriä, eikä niitä ole täysin karakterisoitu.

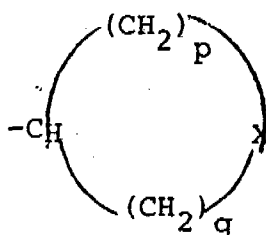
Olisi siten toivottua, että angiogenesisistä ja niveltulehdusta vastustavia, tunnetun rakenteen omaavia yhdisteitä voitaisiin valmistaa kaupallisia määriä.

Tämän keksinnön mukaisesti esitetään yhdisteitä, joilla on angiogenesisistä ja niveltulehdusta ehkäisevää aktiviteettia. Lähemmin määriteltynä keksinnön kohteena on menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on



jossa R^1 ja R^2 ovat molemmat vetyjä tai muodostavat yhdessä toisen sidoksen C_2 - ja C_3 -hiilen välille, R^3 on OH, NH_2 tai OR^4 , R^4 ja R^5 ovat toisistaan riippumatta (C_1-C_{22}) alkyyli, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkenyylili, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkynyylili, $-(C_1-C_{21})$ alkyyli-X- (C_1-C_{21}) alkyyli, jossa X on O, CO, S, NH, $N(C_1-C_5)$ alkyyli, SO tai SO_2 tai ne ovat yhdessä ryhmä

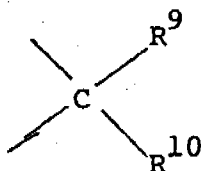
10



15

jossa X merkitsee samaa kuin edellä, ja $p+q$ on 1-6, jolloin R^4 ja R^5 ovat substituomattomia tai substituoituja yhdellä tai kahdella seuraavista; Cl, Br, F, I, (C_1-C_5) alkoksikarbo-nyyli, fenoksi, OH, CF_3 , $(C_1-C_5)^-$ alkoksi, nitro, -CN, $-SO_3H$, $-PO_3H_2$, di- (C_1-C_5) alkyyliamino tai ftaali-imido, R^6 on H, F tai OR^7 , R^7 ja R^8 ovat toisistaan riippumatta H, (C_1-C_{12}) alkyyli tai bentsyyli tai merkitsevät yhdessä ryhmää

20



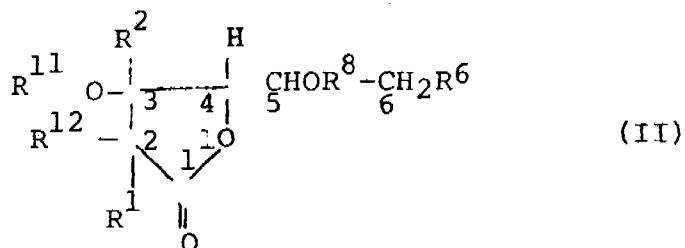
25

jossa R^9 ja R^{10} ovat toisistaan riippumatta H, (C_1-C_{10}) alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, fenyyllillä tai substituoidulla fenyyllillä, jonka substituentteina on yksi tai kaksi seuraavista: halogeeni, hydroksi, (C_1-C_5) alkoksi, nitro, CF_3 tai (C_1-C_5) alkyyli, tai mahdollisesti substituoitu fenyyli, jonka mahdolliset substituutit ovat samoja kuin edellä, sillä edellytyksellä, että vain toinen symboleista R^9 ja R^{10} voi olla H, tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävien sulojen valmistamiseksi.

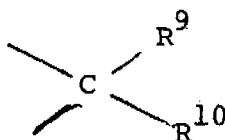
35

Keksinnön mukaisesti menetelmälle on tunnusomaista, että

(a) yhdiste, jonka kaava on

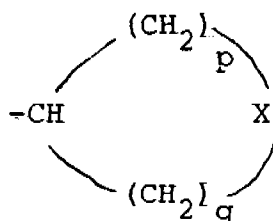


- 5 jossa R^1 , R^2 , R^6 ja R^8 merkitsevät samaa kuin edellä, R^{11} on H tai edellä määriteltä R^5 ja R^{12} on OH, OR^4 tai NH_2 , sillä edellytyksellä, että R^{12} on OH, kun R^{11} ei ole H, saatetaan reagoimaan kaavan R^4Z tai R^5Z mu-
 10 kaisen alkylointiaineen kanssa, joissa kaavoissa Z on halogeeni tai halogeenintapainen poistuva ryhmä, kuten p-tosyyli, mesyyli tai dialkyyli-sulfaatti ja R^4 ja R^5 merkitsevät samaa kuin edellä, emäksen läsnäollessa, kuten alkalimetalli-alemmen-alkanolaatin läsnäollessa
 15 inertissä liuotuksessa, tai
 (b) kun R^{11} ei ole H, R^6 on OR^7 ja R^7 ja R^8 muodostavat yhdessä ryhmän



- 20 kaavan II mukaiselle yhdisteelle suoritetaan happohydrolyysi, jolloin saadaan sellainen kaavan I mukainen yhdiste, jossa R^7 ja R^8 ovat vetyjä.

- Keksinnön toisena aspektina editetään kaavan I mukainen yhdiste, jossa R^1 ja R^2 ovat molemmat vetyjä tai muodostavat yhdessä toisen sidoksen C_2 - ja C_3 hiilien väliin, R^3 on OH, NH_2 tai OR^4 , R^4 , R^5 ovat toistaan riippu-
 30 matta $-(\text{C}_1-\text{C}_{22})$ alkyyli, $-\text{CH}_2(\text{C}_2-\text{C}_{12})$ alkenylyli, $-\text{CHR}^{13})_m$ -
 $\text{Y}-\text{R}^{14}$, jossa m on 0-12, Y on O, S tai suora sidos, R^{13} on H tai (C_1-C_5) -alkyyli, ja R^{14} on (C_3-C_8) sykloalkyyli, (C_3-C_8) sykloalkenylyli, $(\text{C}_7-\text{C}_{12})$ -bisykloalkyyli, $(\text{C}_7-\text{C}_{12})$ bisykloalkenylyli tai aryyli, $-\text{CH}_2(\text{C}_2-\text{C}_{12})$ alky-
 35 nylyli, $-(\text{C}_1-\text{C}_{21})$ alkyyli-X- $(\text{C}_1-\text{C}_{21})$ alkyyli, jossa X on O, CO, S, NH, $\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_5)$ alkyyli, SO tai SO_2 , tai kaavan

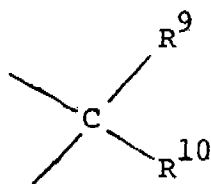


5

mukainen ryhmä, jossa X merkitsee samaa kuin edellä ja $p+q$ on 1-6, jolloin R^4 ja R^5 ovat substituomattomia tai substituoituja yhdellä tai kahdella seuraavista;

- 10 Cl, Br, F, I. (C_1-C_5) alkoksikarbonyyli, fenoksi, OH, CF_3 , (C_1-C_5) alkoksi, nitro, -CH, $-SO_3H$, $-PO_3H_2$, $di(C_1-C_5)$ alkyyliamino tai ftaali-imido, R^6 on H, F tai OR^7 , R^7 ja R^8 ovat kumpikin erikseen H, (C_1-C_{12}) alkyyli tai bentsyyli tai yhdessä ryhmä

15

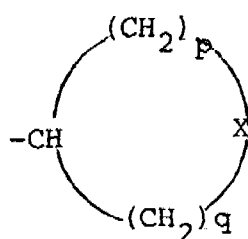


- 20 jossa R^9 ja R^{10} ovat toisistaan riippumatta H, (C_1-C_{10}) alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, fenyyllillä tai substituoidulla fenyyllillä, jonka substituenteina on 1 tai 2 halogeenia, hydroksi-, (C_1-C_5) alkoksi-, nitro-, CF - tai (C_1-C_5) alkyyli-ryhmää, tai mahdollisesti substituotua fenyyli-ryhmää, jonka mahdolliset substituentit ovat samoja kuin edellä, sillä edellytyksellä, että vain toinen symboleista R^9 ja R^{10} on H, ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat käytettäväksi lääkeaineina.

- 30 Keksinnön kohteena on myös farmaseuttinen koostumus, joka sisältää aktiivisena aineosana kaavan I mukaista yhdistettä, jossa R^1 ja R^2 ovat molemmat vetyjä tai muodostavat yhdessä toisen sidoksen C_2 - ja C_3 hiilen välille, R^3 on OH, NH_2 tai OR^4 , R^4 ja R^5 ovat toisistaan riippumatta (C_1-C_{22}) alkyyli, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkenyli, $-(CHR^{13})_m-Y-R^{14}$,

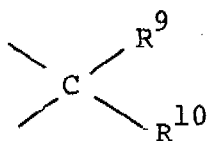
- jossa m on 0-12, Y on O, S tai suora sidos, R^{13} on H tai (C_1-C_5) alkyyli, ja R^{14} on (C_3-C_8) sykloalkyyli, (C_3-C_8) sykloalkenylyli, (C_7-C_{12}) bisykloalkyyli, (C_7-C_{12}) bisykloalkenylyli tai aryyli, $-CH_2(C_2-C_{12})$, alkyyli, $-(C_1-C_{21})$ alkyyli-X- (C_1-C_{21}) alkyyli, jossa X on O, CO, S, NH, N (C_1-C_5) alkyyli, SO tai SO₂ tai ryhmä

10



- jossa X merkitsee samaa kuin edellä, ja p+q on 1-6, jolloin R^4 ja R^5 ovat substituomattomia tai substituoituja yhdellä tai useammalla seuraavista: Cl, Br, F, I, (C_1-C_5) alkoksikarbonyyli, fenoksi, OH, CF₃, (C_1-C_5) , alkoksi, nitro, -CN, -SO₃H, -PO₃H₂, di (C_1-C_5) alkyyliamino tai ftaali-imido, R^6 on H, F tai OR⁷, R^7 ja R^8 ovat kumpikin erikseen H, (C_1-C_{12}) -alkyyli tai bentsyyli tai merkitsevät yhdessä ryhmää

25

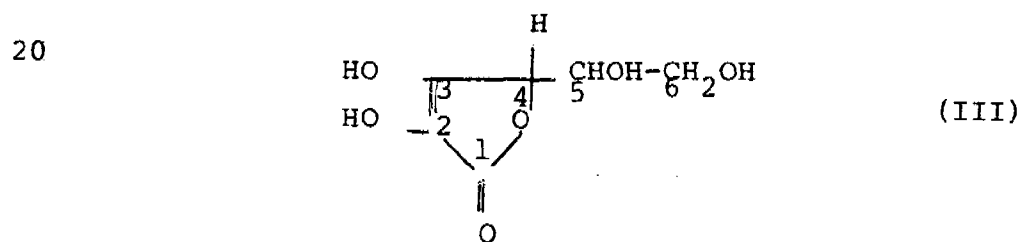


- jossa R^9 ja R^{10} ovat kumpikin erikseen H, (C_1-C_{10}) alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, fenyyllillä tai substituoidulla fenyyllillä, jonka substituenttina on yksi tai useampia seuraavista: halogeeni, hydroksi, (C_1-C_5) alkoksi, nitro, CF₃ tai (C_1-C_5) alkyyli, tai mahdollisesti substituoitu, fenyyli, jonka substituentit ovat samoja kuin edellä määritellyt,

sillä edellytyksellä, että vain toinen symboleista voi olla H, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa yhdessä yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen kanssa.

- 5 Kun R^1 ja R^2 muodostavat toisen sidoksen ja R^6 on OH, kaavn I mukaiset yhdisteet ovat askorbiinihapon tai isoaskorbiinihapon eettereitä. Kun R^1 ja R^2 ovat vetyjä ja R^6 on OH, kaavan I mukainen yhdiste on dihydroaskorbiinihappo tai dihydroisoaskorbiinihappo. Kun R^1 ja R^2 muodostavat yhdessä toisen sidoksen, R^3 on NH_2 ja R^6 on OH, kaavan I mukaiset yhdisteet ovat skorbamiinihapon eettereitä. Kun R^1 ja R^2 muodostavat yhdessä toisen sidoksen ja R^6 on H tai F, yhdisteet ovat deoksiaskorbiinihapon eettereitä.

Askorbiinihappoa ja isoaskorbiinihappoa voidaan esittää seuraavalla kaavalla III



- 25 Kaavassa III C_4 ja C_5 ovat asymmetrisiä hiiliatomeja; kaavaa III edustaa näin ollen 3-ketoheksuronihiappolaktonin (enolimuoto) neljää stereoisomeeria. Näiden neljän stereoisomeerin absoluuttiset konfiguraatiot ja yhdisteiden triviaalinimet ovat seuraavat:

30 $C_4(R)C_5(S)$ -3-ketoheksuronihiappolaktoni (enolimuoto) tunnetaan nimellä L-askorbiinihappo

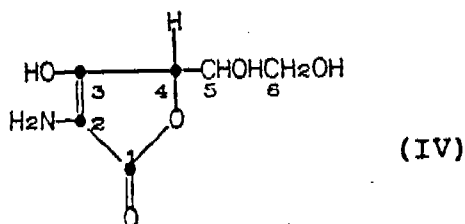
$C_4(R)C_5(R)$ -3-ketoheksuronihiappolaktoni (enolimuoto) tunnetaan nimellä D-isoaskorbiinihappo

35 $C_4(S)C_5(R)$ -3-ketoheksuronihiappolaktoni (enolimuoto) tunnetaan nimellä D-askorbiinihappo

$C_4(S)C_5(S)$ -3-ketoheksuronihappolaktoni (enolimuoto) tunnetaan nimellä L-askorbiinihappo.

L-askorbiinihappoa (C-vitamiini) voidaan myös nimittää 3-okso-L-gulofuranolaktoniksi (enolimuoto), ja se on L-gulofuranossin johdannainen. Samoin D-askorbiinihappo on D-gulofuranoosijohdannainen. Isoaskorbiinihapot ovat glukofuranoosin johdannaissia. Edellä olevan kaavan mukaisen yhdisteiden systemaattinen nimitys on 2-okso-3,4-dihydroksi-5-(1,2-dihydroksietyyli)-2,5-dihydrofuraani-johdannaiset, ja L-askorbiinihappo on $C_4(R)C_5(S)$ -2-okso-3,4-dihydroksi-5-(1,2-dihydroksietyyli)-2,5-dihydrofuraani. Seuraavassa käytetään kuitenkin heksuronihappo-terminologiaa viitattaessa kaavan III mukaisiin yhdisteisiin.

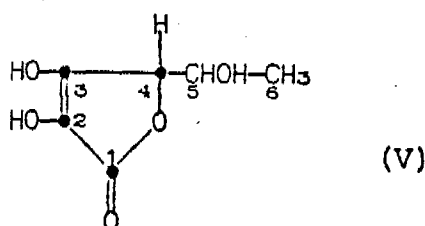
Skorbamiinihappoa ja isoskorbamiinihappoa voidaan esittää kaavalla



Kaavan IV mukaisten yhdisteiden systemaattinen nimi on 2-okso-3-amino-4-hydroksi-5-(1,2-dihydroksietyyli)-2,5-dihydrofuraani. Näitä yhdisteitä nimitetään kuitenkin noudattaen kaavan III mukaisten yhdisteiden geneeristä nimitystä 3-keto-2-aminoheksuronihappolaktonin (enolimuoto) isomeereiksi. Edellä olevassa molekyylissä on samoin kaksi asymmetristä hiiliatomia, C_4 ja C_5 , ja stereoisomeereja on siten 4. Niiden absoluuttiset konfiguraatiot ovat: $C_4(R)C_5(S)$ -3-keto-2-aminoheksuronihappolaktoni (enolimuoto) = L-skorbamiinihappo; $C_4(R)C_5(R)$ -3-keto-2-aminoheksuronihappolaktoni (enolimuoto) = isoskorbamiinihappo; $C_4(S)C_5(R)$ -3-keto-2-aminoheksuronihappolaktoni (enolimuoto) = D-skorbamiinihappo;

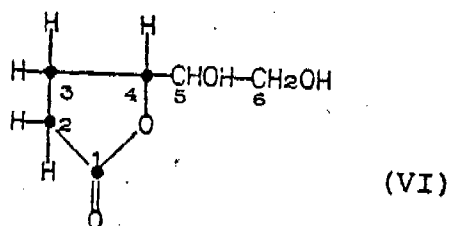
$C_4(S)C_5(S)$ -3-keto-2-aminohexuroni-happolaktoni (enolimuoto) = L-iso-skorbiinihappo. Ilmaisuihin "askorbiinihappo" ja "skorbiinihappo" sisältyy tässä käytettynä kaikki 4 stereoisomeeria, jollei absoluuttista konfiguraatiota ole erikseen määritetty.

6-deoksiaskorbiinihappoja voidaan esittää kaavalla V



Samoin kuin askorbiinihapossa C_4 - ja C_5 -asymmetriset hiiliatomit aiheuttavat 4 stereoisomeeria. Kaavan IV mukaisista yhdisteistä käytetään nimitystä 6-deoksiaskorbiinihapot. Vaihtoehtoinen nimitys on 3-keto-6-deoksiheksuroni-happolaktoni (enolimuoto).

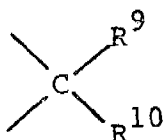
Dihydroaskorbiinihappoa ja dihydroisoaskorbiinihappoa voidaan esittää seuraavalla kaavalla VI



Näiden yhdisteiden systemaattinen nimitys on 2,3-dihydroksi-5-(1-hydroksietyyli)tetrahydrofuraanit. Dihydroaskorbiinihapon kaavassa on 4 asymmetriakeskusta, nimittäin C_2 , C_3 , C_4 ja C_5 . Edellä olevaan kaavaan sisältyy stereoisomeereja siten $2^4 = 16$; lisäksi näiden eetterit, asetaalit, ja ketaalit, ovat kaikki aktiivisia angiogenesis-

inhibiittoreita ja kuuluvat keksinnön suojauspiiriin.

On huomattava, että kun R^6 on $-OR^7$ ja R^7 ja R^8 muodostavat yhdessä ryhmän

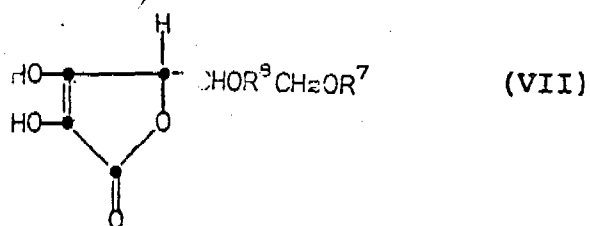


niin saadaan ketaali, kun R^9 ja R^{10} eivät ole kumpikaan vetyjä, ja asetaali, kun R^9 tai R^{10} on vety. Esimerkiksi, jos R^9 on metyyli ja R^{10} on etyyli, niin saatu rakenne on C-5 ja C-6 -hydroksyylien kanssa muodostettu metyyli-etyyliketonin ketaali.

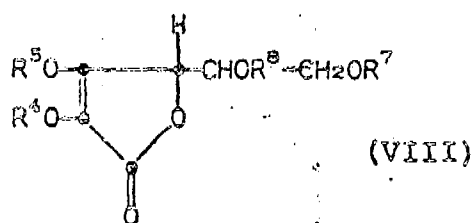
Edellä olevissa kaavoissa esimerkkejä symboleilla R^4 , R^5 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{13} ja R^{14} esitetyistä asyklisistä ja syklistä alifaattisista ryhmistä ovat etyyli, n-propyyli, isopropyyli, sek-butyli, n-butyli, isobutyli, isoamyyli, tert-amyyli, n-amyyli, 2-pentyyli, 3-pentyyli, 3-metyyli-2-butyli, 2-heksyyli, 1-heksyyli, 3-heksyyli, 4-metyyli-1-pentyyli, 3-metyyli-1-pentyyli, 3-metyyli-2-pentyyli, noepentyyli, 3,3-dimetyyli-1-butyli, 3,3-dimetyyli-1-pentyyli, 3,3,4-trimetyyli-1-pentyyli, 2,2,4-trimetyyli-1-pentyyli, 2,4,4-dimetyyli-2-pentyyli, iso-oktyyli, isoheptyyli, n-heptyyli, 2-heptyyli, 3-heptyyli, 4-heptyyli, 2-oktyyli, 3-oktyyli, 4-oktyyli, 2-metyyli-2-butenyyli, 2-metyyli-3-propenyyli, allyyli, metallyyli, krotyyli, syklobutyli, syklopropyyli, syklopentyyli, sykloheksyyli, 3-metyylisyklopentyyli, 3-etyyli-sykloheksyyli, sykloheptyyli, 4-metyylisykloheptyyli, 2-metyylisykloheptyyli, syklo-oktyyli, 1-sykloheksyyli, 2-sykloheksenyyli, 3-sykloheksenyyli, 2-syklopentenyyli, 3-etyyli-2-sykloheksyyli, 2-syklopentenyyli, 4-metyyli, 2-sykloheptenyyli, 4-syklo-oktenyyli, 2-bromietyyli, 2-jodietyyli, bentsyyli, o-klooribentsyyli, m-bromibentsyyli, 2,4-diklooribentsyyli, p-nitrobentsyyli, 2-jodibentsyyli, 4-fluoribentsyyli, 1-metyyli-4-trifluorimetyylibentsyyli, 2-metyyli-2-klooribentsyyli, m-etoksibentsyyli, bisyklo[2,2,1]heptanyyli, bisyklo

$\angle 2,2,1$ heptanyylimettyyli, bisyklo- $\angle 2,2,1$ heptenylyli,
 bisyklo $\angle 2,2,1$ heptenyylimettyyli, bisyklo $\angle 3,3,0$ okta-
 nylyli, bisyklo $\angle 2,4,0$ oktenylyli, bisyklo $\angle 3,3,0$ oktenylyli-
 ettyyli, bisyklo $\angle 3,3,1$ nonylyli, bisyklo $\angle 3,3,1$ nonylyli-
 mettyyli, bisyklo $\angle 3,3,1$ nonenylyli, bisyklo $\angle 3,3,1$ nonenylyli-
 5 mettyyli, bisyklo $\angle 3,3,1$ heptanylyli, bisyklo $\angle 3,3,1$ hepta-
 nyylipropylyli, bisyklo $\angle 3,1,1$ heptenylyli, bisyklo- $\angle 3,1,1$
 heptenyylimettyyli, bisyklo $\angle 4,2,0$ oktanylyli, bisyklo
 $\angle 4,2,0$ oktenylyli, bisyklo $\angle 4,2,0$ oktenyylimettyyli, 3-me-
 tyylibisyklo $\angle 4,2,0$ oktenylyli, bisyklo $\angle 4,3,1$ syklododekyyli,
 10 bisyklo $\angle 4,3,1$ syklodekyyylimettyyli, bisyklo $\angle 5,3,0$ syklo-
 dekenylyli, 5-metyylibisyklo $\angle 5,3,0$ syklododekenylyli,
 bisyklo $\angle 3,2,0$ heptanylyli, bisyklo $\angle 3,2,0$ heptanylyli-
 ettyyli, bisyklo $\angle 3,2,0$ -heptenylyli, bisyklo $\angle 3,2,0$ hepte-
 nyylimettyyli, bisyklo $\angle 4,1,0$ heptanylyli, bisyklo $\angle 4,1,0$
 15 heptanyylimettyyli, bisyklo $\angle 4,1,0$ heptenylyli, bisyklo-
 $\angle 4,1,0$ heptenyylimettyyli, 2-isopropylibisyklo $\angle 4,1,0$
 heptenylyli, 2-isoprpppyyli 3-metyylibisyklo $\angle 3,1,0$ hekse-
 nylyli n-hendekyyli, n-dodekyyli, n-tridekyyli, n-tetra-
 dekyyli, n-pentadekyyli, n-heksadekyyli, n-heptadekyyli,
 20 n-oktadekyyli, n-eikosyyli, n-dokosyyli, 2-tetradekyyli,
 4-tetradekyyli, 6-tetradekyyli, 7-tetradekyyli, 7-heksade-
 kyyli, 8-heksadekyyli, 9-oktadelyyli, 2-oktyylidodekyyli,
 3,7,11-trimetyylidodekyyli, tetrahydrogeranylyli, 12-me-
 tyyli-tridekyyli, myristoleyyli, myristeladyyli, oleyyli,
 25 linoleyyli, 12-metyyli-trideken-9-yyli jne.

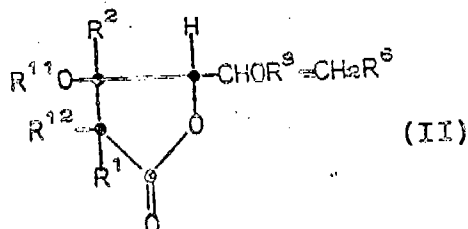
Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R^1 ja R^2 muo-
 dostavat yhdessä kaksoissidoksen ja R^3 on $-OR^4$, voidaan
 valmistaa saattamatta askorbiinihappo tai isoaskorbiini-
 happo tai ketaali tai asetaali, jonka kaava on



jossa R^7 ja R^8 merkitsevät samaa kuin ennen, reagoimaan yhden tai kahden moolin kanssa emästä, kuten alkalimetalli-alempialkanolaattia ja alkylointiaineen kanssa, jonka kaavassa R^4 tai R^5 merkitsevät samaa kuin edellä ja X on poistuva ryhmä (nukleofiilisessa reaktiossa labiili ryhmä), kuten halogeeni (Cl, I, Br) tai halogeeninkaltainen poistuva ryhmä, esim. p-tosyyli (p-tolueenisulfonaatti) tai mesyyli (metaanisulfonaatti). Myös dialkyyylisulfaattia (R_2SO_4) voidaan käyttää. Jos sekä emästä että alkylointiainetta käytetään kumpaakin 1 mooli, niin reaktiossa saadaan tulokseksi C-3:een liittynyt eetteriryhmä. Jos halutaan valmistaa dieetteri, jonka eetteriryhmät C-2:ssa ja C-3:ssa ovat identtiset, niin käytetään kaksi moolia emästä ja kaksi moolia alkylointiainetta. Saatu yhdiste on dieetteri, jonka kaava on



jossa R^4 ja R^5 ovat samoja ryhmiä. Jos halutaan valmistaa dieetteri, jossa R^4 ja R^5 ovat eri ryhmiä, niin mono-eetteri, jonka kaava on



jossa R^{11} on esimerkiksi etyyli ja R^{12} on OH, saatetaan reagoimaan alkylointiaineen R^4X kanssa, jossa R^4 ei ole etyyli, ja yhden moolin kanssa emästä. Riippuen C-2 ja C-3 hydroksyyli-ryhmien suhteellisesta reaktiivisuudesta ja alkylointiaineesta jonkin verran eetterinmuodostusta tapahtuu myös C-2:ssa, vaikka käytetään vain yksi mooli alkylointiainetta ja tarkoituksena on muodostaa vain 3-eetteri. Näin muodostuneiden mono- tai dieetterin seos voidaan helposti erottaa esimerkiksi kromatografian avulla. Myös R^7 :n ja R^8 :n ollessa hydroksyyli-ryhmiä on mahdollista, että toinen näistä alkyloitu ja saadaan C-3 ja C-5 dieetteri; myös tällaiset dieetteri voidaan erottaa kromatografian avulla.

Edellä olevat reaktiot suoritetaan inertissä liuotimessa, kuten DMSO:ssa (dimetyylisulfoksidi), DMF:ssä (N,N-dimetyyliformamidi), asetonitriilissä, nitrometaanissa, dietyylisulfoksidissa. Reaktiot voidaan suorittaa missä tahansa sopivassa lämpötilassa 0°C :n ja 80°C :n välillä, ne suoritetaan kuitenkin tavallisesti huoneen lämpötilassa. Edullinen emäs on natriummetoksidi.

Tietyissä olosuhteissa, varsinkin varsinkin silloin, kun kilpailevana reaktiona on C-5 tai C-6 hydroksyyli-ryhmän reaktio, L-askorbiinihappoeetterit voidaan valmistaa erityisen puhtaina alkyloimalla L-askorbiinihappo-5,6-asetonidi (kaavassa VII R^7 ja R^8 muodostavat yhdessä 1-metyyli-etyylideeniryhmän) ja poistamalla sitten ketaaliryhmä käsittelemällä hapolla, esim. etikkahapolla, 1-%:isellä kloorivetyhapolla jne. Tässä menetelmässä ketaaliryhmä hydrolysoituu selektiivisesti vaikuttamatta eetteriryhmiin C-2:ssa ja/tai C-3:ssa.

Kaavan VII mukaiset asetaali-lähtöaineet valmistetaan sinänsä tunnetuin menetelmin, esimerkiksi dioksaanissa tai muussa inertissä, vedettömässä liuottimessa suoritettussa reaktiossa ylimäärin käytetyn Lewis-hapon läsnäollessa, esim. sinkkikloridin tms. läsnäollessa.

Skorbaamihappoeetterit, -ketaalit ja -asetaalit valmistetaan samankaltaisella menetelmällä kuin askorbiinihapon ja isoaskorbiinihapon eetterit jne., vaikka on huomattava, että eetteri voidaan muodostaa vain C-3:een, koska C-2:ssa on amiinifunktio.

Sellaisia kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa R^1 ja R^2 ovat molemmat vetyjä, valmistetaan suoraan dihydroaskorbiinihaposta käyttäen menetelmiä, joita edellä kuvattiin askorbiinihapon ja isoaskorbiinihapon yhteydessä.

Keksintöä kuvataan lähemmin seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

2-O-n-butyyl-L-askorbiinihappo (yhdiste 1)

Reaktioseos valmistettiin seuraavista aineosista: 33 g L-askorbiinihappoa, 10,2 g natriummetoksidia, 34,5 g n-butyyljodidia ja 250 ml DMSO:ta. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa, ja reaktion kulkua seurattiin ohutkerroskromatografialla. 24 tunnin kuluttua reaktioseos lisättiin 500 ml:aan etyyliasetaattia. Reaktiossa muodostunut 3-O-n-butyyl-L-askorbiinihappo saostui ja suodatettiin. Lisää sakkaa saatiin lisättäessä suodokseen 300 ml tolueenia. Saostuneet kiteet suodatettiin ja liuotettiin yhdessä aikaisemmin saatujen kanssa 500 ml:aan metanolia (paino noin 20 g) ja liuokseen lisättiin 45 g silikageeliä, ja liuos haihdutettiin kuiviin vakuumissa.

Valmistettiin kromatografiakolonne seuraavalla tavalla: 100g silikageeliä (silikageeli 60) sekoitettiin 500 ml:aan hekseeniä. Seos pantiin tyypikehässä lasiseen kromatografiakolonneeseen, jossa oli lasivillatulppa, ja sen päällä 3-5 mm:n kerros merihiekkaa. Silikageeli sai tiivistyä noin 20 minuutin ajan, sitten lisättiin toinen 2-4 mm:n kerros merihiekkaa. Kummassakin tapauksessa oli välttämätöntä, että merihiekka asettui tasaiseksi kerrokseksi. Tämän jälkeen kuivattu silikageelin ja sakan seos

- sekoitettiin heksaaniin, ja tämä seos lisättiin varovasti kolonnin yläosaan. Sitten lisättiin 5 g silikageeliä heksaanissa. Kolonni sa jälleen olla typpisuojakaasussa 15-20 minuuttia kahden uuden silikageelikerroksen tiivistyksessä. Lopuksi lisättiin hiekkakerros (3-6 mm paksu).
- 5 Kromatogrammi kehitettiin seuraavasti: Kolonnin lävitse laskettiin 8 litraa etyyliasetatti/tolueeniseosta 1:1, Haluttua L-askorbiinihappoeetteriä ei tällöin saatu olennaisia määriä. Sitten kolonnin lävitse laskettiin 4
- 10 litraa etyyliasetatti/tolueeni-eluaattia 3:1, jolloin eluoitui suurin osa halutusta eetteristä. Haihduttamalla liuotin saatiin 3-O-n-butyyl-L-askorbiinihappo, jonka analyysi oli seuraava:
- laskettu: C 51,72 H 6,94
- 15 saatu: C 51,45 H 6,72
- Massaspektri: piikkejä kohdissa 232 (molekyyli-ioni), 172, 145, 100, 85, 71, 57, 41, 29.
- Seuraavat yhdisteet valmistettiin samanlaisella menetelmällä:
- 20 3-O-(2,6-diklooribentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 2)
 Analyysi, laskettu: C 46,59 H 3,61 Cl 21,16
 saatu: C 46,34 H 3,53 Cl 20,88.
 Massaspektri: piikkejä kohdissa 428 (molekyyli-ioni), 192.
- 3-O-allyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 3)
- 25 Massaspektri: piikkejä kohdissa 216 (molekyyli-ioni), 156, 58, 40.
- 2,3-di(O-allyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 4)
 Analyysi, laskettu: C 56,25 H 6,29
 saatu: C 56,12 H 5,93.
- 30 Massaspektri: piikkejä kohdissa 256 (molekyyli-ioni), 216, 174, 58, 40.
- 3-O-n-dodekyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 5)
 Saanto 7,183 g 33,0 g:sta L-askorbiinihappoa.
 Massaspektri: piikkejä kohdissa 344 (molekyyli-ioni), 284,
- 35 177, 145, 116, 100, 85, 71, 61, 57, 43, ja 29.

3-O-(3-bromibentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 6)

Saanto 3,986 g 17,6 g:sta L-askorbiinihappoa.

Analyysi, laskettu: C 45,24 H 3,80 Br 23,15
 saatu: C 45,45 H 3,57 Br 22,94.

pKa = 10,50.

5 3-O-(3-fluoribentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 7)

Saanto 4,194 g 23,3 g:sta L-askorbiinihappoa.

Analyysi, laskettu: C 54,93 H 4,61 F 6,68
 saatu: C 55,07 H 4,42 F 6,49.

Massaspektri: molekyyli-ioni kohdassa 284.

10 3-O-(10-karboksi-n-dekyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 8)

Analyysi, laskettu: C 56,66 H 7,83
 saatu: C 56,93 H 7,55

Massaspektri" piikkejä kohdissa 361 (molekyyli-ioni), 58.

15 3-O-n-pentadekyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 9)

Saanto 3,6 g 15,2 g:sta L-askorbiinihappoa.

2,3-di(O-n-pentadekyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 10)

eristetty samasta reaktioseoksesta kuin monoeetteri)

Analyysi, laskettu: C 72,49 H 11,48
 saatu: C 72,64 H 11,28

20

Saanto 1,26 g.

25 3-O-(2-bromietoksietyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 11)

Analyysi, laskettu C 36,72 H 4,62 Br 24,43
 saatu: C 36,46 H 4,92 Br 24,23

Massaspektri: piikkejä kohdissa 328, 326, 382, 58.

3-O-(3-fenoksiopropyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 12)

Analyysi: laskettu C 58,06 H 5,85
 saatu: C 58,17 H 4,59

30 Massaspektri: piikki kohdassa 310 (molekyyli-ioni).

3-O-(2-ftaali-imidoetyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 13)

Massaspektri: piikkejä kohdissa 349 (molekyyli-ioni),
 193, 174, 161, 148, 130, 102, 76, 44, 28.

35 3-O-n-heksadekyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 14)

Analyysi, laskettu: C 65,97 H 10,07 O 23,97

saatu: C 66,24 H 9,84 O 24,07

Titraus: pKa = 11,10,

IR-spektri: ν 1750, 1695, 1680 cm^{-1} .

2,3-di(O n-heksadekyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 15)

5

Analyysi, laskettu: C 73,03 H 11,61 O,15,36

saatu: C 72,92 H 11,88 O, 15,07

IR-spektri: ν 1740, 1680 cm^{-1}

Titraus: ei titrattavia ryhmiä.

3-O-n-heptadekyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 16)

10

Analyysi, laskettu: C 66,63 H 10,21

saatu: C 66,37 H 9,93

IR-spektri: ν 1760, 1710, 1695 cm^{-1}

Massaspektri: piikkejä kohdissa 414 (molekyyli-ioni),

354, 177, 116, 97,

15

3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 17)

Analyysi, laskettu: C 67,26 H 10,35

saatu: C 67,42 H 10,37

IR-spektri: ν 1757, 1705, 1690 cm^{-1}

Massaspektri: piikkejä kohdissa 428 (molekyyli-ioni), 297,

20

98, 63.

2,3-di-n-oktadekyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 18)

Analyysi, laskettu: C 74,07 H 11,84

saatu: C 74,34 H 12,07

25

IR-spektri: ν 1770, 1680 cm^{-1}

3-O-n-ikosyyli-L-askorbiinihappo (yhdiste 19)

Massaspektri: 456 (molekyyli-ioni)

IR-spektri: ν 1690, 1705, 1758, 3436 cm^{-1}

30

3-O-bentsvli -L-askorbiinihappo (yhdiste 20)

Analyysi, laskettu: C 58,65 H 5,30

saatu: C 58,53 H 5,60

Massaspektri" piikkejä kohdissa 266 (molekyyli-ioni), 228,

166,148, 107, 91

35

IR-spektri: ν 1760, 1695 cm^{-1}

3-O-(3-klooribentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 21)

Analyysi, laskettu: C 51,93 H 4,36 Cl 11,79
 saatu: C 51,77 H 4,10 Cl 12,09

IR-spektri: $\tilde{\nu}$ 1760, 1690, 1680 cm^{-1}

5 Massaspektri: piikkejä kohdissa 300 (molekyyli-ioni),
 240, 147, 125, 89.

3-O-(4-klooribentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 22)

Analyysi, laskettu: C 51,93 H 4,36 Cl 11,79
 saatu: C 51,71 H 4,21 Cl 11,86

10 IR-spektri: $\tilde{\nu}$ 1755, 1695 cm^{-1}

^{13}C nmr: δ 170,36, 150,09 135,62, 132,82, 129,53,
 129,42, 119,73, 74,63, 71,06 68,58. 61,82.

3-O-(3-trifluorimetylibentsyyli)-L-askorbiinihappo

15 (yhdiste 23)

Analyysi, laskettu: C 50,31 H 3,92 F 17,05
 saatu: C 50,59 H 3,40 F 17,00

IR-spektri: $\tilde{\nu}$ 1755, 1695 cm^{-1}

20 Massaspektri: piikkejä kohdissa 334 (molekyyli-ioni),
 295, 274, 228, 159.

^{13}C nmr: δ 170,32, 149,94, 119,85, 74,66, 71,14,
 68,62, 61,81.

3-O-(3-metylibentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 24)

25 Analyysi, laskettu: C 60,00 H 5,75
 saatu: C 60,21 H 5,82.

IR-spektri: $\tilde{\nu}$ 1740, 1685, 1675 cm^{-1}

Massaspektri: piikkejä kohdissa 280 (molekyyli-ioni),
 262, 186, 162, 134, 105, 91.

30 3-O-(2,5-dimetylibentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 25)

Analyysi: laskettu: C 61,22 H 6,17
 saatu: C 61,02 H 6,22

IR-spektri: $\tilde{\nu}$ 1755, 1695 cm^{-1}

35 Massaspektri: piikkejä kohdissa 294 (molekyyli-ioni), 176,
 158, 147, 131, 119, 91.

3-O-n-oktadekyyli-D-askorbiinihappo (yhdiste 26)

Analyysi, laskettu: C 67,3 H 10,4

saatu: C 67,1 H 10,4.

IR-spektri: 1700, 1755, 2840, 2905 cm^{-1}

5 Massaspektri: molekyyli-ioni kohdassa 428

Titraus: pKa = 11,00.

3-O-n-oktadekyyli-isoaskorbiinihappo (yhdiste 27)

Analyysi: laskettu: C 67,3 H 10,4

saatu: C 66,8 H 9,3

10 Titraus" pKa = 11,60.

Massaspektri: molekyyli-ioni kohdassa 428.

IR-spektri: 1695, 1755, 2840, 2905 cm^{-1} .

3-O-(2-metyyllibentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 28)

Analyysi: laskettu: C 60,00 H 5,8 O,34,2

15 saatu: C 59,9 H 5,5 O,34,1

Titraus: pKa = 10,78

Massaspektri: M^+ = 280

IR-spektri: 1685, 1750, 3370 cm^{-1} .

20 2-O-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiinihappohydrokloridi (yhdiste 29)

Analyysi: laskettu: C 63,31 H 10,26 N 2,55 Cl 6,44

saatu: C 63,10 H 10,13 N 2,69 Cl 6,66.

IR-spektri: \ 1762, 1675 cm^{-1}

Titraus: pKa = 8,0

25 Massaspektri: piikkejä kohdissa 513, 482, 415, 344, 260, 201, 160.

3-O-(2-klooribentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 30)

IR-spektri: 1690, 1760 cm^{-1}

Massaspektri: suurin piikki kohdassa 300.

3-O-(2-klooribentsyyli)-L-askorbiinihappo (yhdiste 30)

IR- spektri: 1690, 1760 cm^{-1}

Massaspektri: suurin piikki kohdassa 300.

5 Esimerkki 2

3-O-n-butylyli-5,6-O-(bentsylideeni)-L-askorbiinihappo
(yhdiste 31)

Samoin kuin esimerkissä 1 valmistettiin reaktioseos
 150 ml:sta DMSO:ta, 15 g:sta 5,6-O-bentsylideeni-L-askor-
 10 biinihappoa (yhdiste 33), 3,24 mg:sta natriummetoksidia ja
 10,5 g:sta n-butylylijodidia. Reaktioseosta sekoitettiin
 huoneen lämpötilassa 72 tuntia , jonka ajan kuluttua
 ohutkerroskromatgrafia osoitti reaktion tapahtuneen oleel-
 lisesti täydelleen. Reaktioseos uutettiin 600 ml:lla
 15 etyyliasetaattia, ja etyyliasetaattiuute uutettiin 30 m :n
 annoksilla natriumkloridin vesiliuosta. Etyyliasetaatti-
 uute kuivattiin, sitä käsiteltiin värinpoistohiilellä,
 se suodatettiin ja suodos haihdutettiin vakuuissa. Saatiin
 noin 15 g haihdutusjäännöstä. Preparatiivisella ohutkerros-
 20 kromatgrafialla silikageelillä saatiin kolme vyöhykettä
 (liuotinsysteemi metanoli/tolueeni/etyyliasetaatti
 1:2:2). Haluttua n-butylylieetteriä sisältävä vyöhyke
 raaputettiin levyiltä, uutettiin samalla liuotinsystee-
 millä ja kromatografoitiin uudelleen käyttäen liuotin-
 25 systeemiä etyyliasetaatti/tolueeni 1:2. 3-O-n-butylyli-
 5,6-bentsylideeni-L-askorbiinin lopullinen saanto oli
 5,54 g.

Massaspektri: piikkejä kohdissa 320 (nolekyyli-ioni),
 247, 223, 179, 149, 107, 91, 77, 56, 52, 43, 29 ja 15.

Seuraava yhdiste valmistettiin samankaltaisella menetelmällä:

3-(2-metoksietyyli)-5,6-O-bentsylideeni-L-askorbiinihappo
(yhdiste 32)

- 5 Analyysi, laskettu: C 59,62 H 5,63
saatu: C 59,33 H 5,49.

Massaspektri: piikkejä kohdissa 149, 81, 77, 59, 44, 30;
vähäisiä piikkejä kohdissa 322 (M^+) 281, 247, 223, 174 ja
18.

10 Esimerkki 3

Vaihtoehtoinen menetelmä 3-O-n-butyyl-L-askorbiinihapon
(yhdiste 1) valmistamiseksi

- Noin 0,5 g 3-O-n-butyyl-L-askorbiinihappoa (esimerkistä 2) liuotettiin 200 ml:aan
15 jääetikkaa. Lisättiin 5 ml vettä, ja reaktioseosta sekoitettiin sitten huoneen lämpötilassa. Noin 1,5 tunnin kuluttua ohutkerroskromatografia osoitti, että lähtöainetta oli jäljellä vielä noin 50-60 %; reaktioseosta sekoitettiin sen vuoksi vielä 48 tuntia huoneen lämpötilassa. Tällöin ohutkerroskromatografia osoitti bent-
20 sylideenijohdannaisen muuttuneen olennaisesti täydellisesti 3-O-n-butyyl-L-askorbiinihapoksi. Tuote puhdistettiin preparatiivisella ohutkerroskromatografialla sili-
kageelillä käyttäen eluenttina metanoli/-tolueeni/etyyli-
25 asetaattiseosta 1:2:1. Kemiallinen analyysi ja muut fysikaaliskemialliset mittaukset osoittivat, että yhdiste 1 oli saatu puhtaana tuotteena.

Esimerkki 4

5,6-O-bentsylideeni-L-askorbiinihappo (yhdiste 33)

- 30 Askorbiinihappoa (89,2 g) lietettiin 400 ml:aan p-dioksaania, ja seokseen lisättiin hitaasti 200 g sinkki-
kloridia. Tunnin sekoittamisen jälkeen lisättiin 100 ml (104 g) bentsaldehydiä. Reaktioseosta sekoitettiin noin 24 tuntia, sitten seos uutettiin 500 ml:lla etyyliase-
35 taattia. Etyyliasetattiute uutettiin 3 annoksella kyl-
lästettyä NaCl-vesiliuosta. Etyyliasetattiute kuivatettiin, sitä käsiteltiin värinpoistohiilellä, se suodatettiin selluloosasuodattimella ja suodos konsentroitiin.

jolloin saatiin kiteistä 5,6-bentsylideeni-L-askorbiinihappoa.

Analyysi, laskettu: C 59,09 H 4,58

saatu: C 59,19 H 4,34

Saanto 18,3 g.

- 5 Samalla menetelmällä valmistettiin seuraavat asetaalit:

5,6-O-(2-fenylylietyliideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 34)

Analyysi, laskettu C 60,4 H 5,1

10 saatu: C 60,3 H 5,2

IR-spektri: 3258, 1755, 1664 cm^{-1}

Massaspektri: $M^+ = 278$.

5,6-O-undekyylideeni-L-askorbiinihappo (yhdiste 35)

IR-spektri: 3258, 1750, 2840, 2920 cm^{-1}

15 Titraus: $pK_a = 6,48$

Massaspektri: $M^+ = 327$.

Esimerkki 5

5,6-O-(1-metyylietyliideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 36)

Reaktioseos valmistettiin 88 g:sta L-askorbiini-

20 happoa, 400 ml:sta dioksaania, 200 g:sta sinkkikloridia ja 500 ml:sta asetonia. Seosta sekoitettiin yön yli huoneen lämpötilassa, siten seos eluoitiin silikageelikolonissa

(silikageeli 60) tolueeni/metanoli-seoksella 1:1. Kerättiin 25 600 m. liuosta, ja liuotin haihdutettiin vakuuissa. Jäännökseen lisättiin asetonia, ja kiinteä tuote suodatettiin.

Saadut kiteet pestiin tolueenilla. Saatiin 35,6 g 5,6-O-(1-metyylietyliideeni)-L-askorbiinihappoa. Yhdisteellä oli seuraavat fysikaaliset tunnusluvut:

30

IR-spektri: 3258, 1760, 3000, 3250 cm^{-1} .

Titraus: $pK_a = 6,10$

Massaspektri: piikkejä kohdissa 216 (M^+), 201.

35 Edellä kuvatulla menetelmällä valmistettiin seuraavat ketaalit:

5,6-O-(1-kloorimetyylietyliideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 37)

Analyysi, laskettu: C 43,1 H 4,4 O 38,3 Cl 14,2

saatu: C 43,4 H 4,5 O 38,2 Cl 13,9

Titraus: $pK_a = 6,10$

Massaspektri: piikkejä kohdissa 250 (M^+), 201

IR-spektri: λ 1675, 1775, 3000, 3300 cm^{-1} .

5,6-O-(1-bentsyyli-2-fenyylieetylideeni)-L-askorbiini-
happo (yhdiste 38)

5 Analyysi, laskettu: C 68,5 H 5,4

saatu: C 68,2 H 5,6

IR-spektri: λ 1660, 1740 cm^{-1}

Titraus: $pK_a = 6,55$

Massaspektri: piikkejä kohdissa 369, 354, 277.

10 Esimerkki 6

3-O-n-oktadekyyli-5,6-O-(1-metyylietylideeni)-L-askor-
biinihapon (yhdiste 39) valmistus

Reaktioseos valmistettiin 20 g:sta 5,6-O-(1-metyyli-
tylideeni)-L-askorbiinihappoa, 5 g:sta natriummety-

15 laattia, 30,9 g:sta n-oktadekyylibromidia ja 400 ml:sta
DMSO:ta. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa

noin 5 vrk. Seokseen lisättiin vettä ja etyyliasetaatti-
kerros erotettiin. 3-O-n-oktadekyylietteriä sisältävä
liuos puhdistettiin esimerkissä 1 kuvatulla menetelmällä.

20 Kromatografoimalla saatiin noin 1,62 g puhdasta 3-O-n-okta-
dekyyli-5,6-O-(1-metyylietylideeni)-L-askorbiinihappoa.

Analyysi, laskettu C 69,2 H 10,3

saatu: C 69,2 H 10,6.

IR-spektri: λ 1705, 1760, 2870, 2930 cm^{-1}

25 Titraus: $pK_a = 11,4$

Massaspektri: piikkejä kohdissa 468, 453.

Edellä kuvatulla menetelmällä valmistettiin seuraavat
ketaalit:

3-O-(2,5-dimetoksifenasyyli)-5,6-O-(1-metyylietylideeni)-
L-askorbiinihappo (yhdiste 40)

30

Titraus: $pK_a = 10,59$

IR-spektri: λ 1700, 1750, 3340 cm^{-1}

Massaspektri: piikkejä kohdissa 394, 379.

3-O-(2-fthaali-imidoetyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 41)

Titraus: pKa = 10,32

Massaspektri: piikkejä kohdissa 389, 374

5 IR-spektri: λ 1710, 1780, 3220 cm^{-1}

3-O-(etoksikarbonyylimetyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 42)

IR-spektri: λ 1700, 1760, 3000, 3340 cm^{-1}

Titraus: pKa = 9,80

10 Massaspektri: piikkejä kohdissa 302, 287.

3-O-(2-etoksietyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 43)

Titraus: pKa = 10,31

Massaspektri: piikkejä kohdissa 288, 273

15 IR-spektri: λ 1695, 1765, 2990 cm^{-1}

3-O-(2-bromietoksietyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 44)

Analyysi, laskettu: C 42,5 H 5,2

saatu: C 42,7 H 5,4

20 Titraus: pKa = 10,4

Massaspektri: piikkejä kohdissa 368, 353

IR-spektri: λ 1700, 1700, 3010 3300 cm^{-1} .

2,3-di-O-n-oktadekyyli-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 45)

25 Ei titrattavaa ryhmää

Massaspektri" 721 (M^+)

3,4-Bis-O-(4-syaanibutyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 46)

Ei titrattavaa ryhmää

30 IR-spektri: 1690, 1750, 2260, 3000 cm^{-1}

Massaspektri: piikkejä kohdissa 378, 363.

2,3-bis-O-(4-fluoribentsyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 47)

IR-spektri: λ 1690, 1765, 2905, 2940, 3005, 3065 cm^{-1}

35 Ei titrattavaa ryhmää

Massaspektri" piikkejä kohdissa 432, 214.

3-O-(4-nitrobentsyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 48)

Titraus: pKa = 10,10

5 Massaspektri: piikkejä kohdissa 351, 336

IR-spektri: λ 1700, 1770, 3360, 3420 cm^{-1}

3-O-(3-fenoksiopropyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 49)

Analyysi, laskettu: C 61,7 H 6,3

10 saatu: C 59,9 H 5,7

IR-spektri" λ 1700, 1780, 3380, 3420 cm^{-1}

Titraus: pKa = 10,7

Massaspektri: piikkejä kohdissa 350, 335.

3-O-n-oktadekyyli-5,6-O-(1-kloorimetyylietyylideeni)

15 -L-askorbiinihappo (yhdiste 50)

Analyysi: laskettu: C 64,5 H 9,4 O 19,1 Cl 7,1

saatu: C 64,5 H 9,5 O,19,0 Cl 7,3

Titraus: pKa = 9,0

Massaspektri: piikkejä kohdissa 502, 453

20 IR-spektri: λ 1705, 1775, 2860, 2940, 3040 cm^{-1} ,

3-O-n-pentadekyyli-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 51)

IR-spektri: λ 1710, 1780, 2870, 2940 cm^{-1}

Titraus: pKa = 10,9

25 Massaspektri: piikkejä kohdissa 426, 411.

2,3-di-O-n-pentadekyyli-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 52)

Ei tarvittavia ryhmiä.

IR-spektri: 1690, 1770, 2885, 2940 cm^{-1}

30 Massaspektri"piikkejä kohdissa 636, 621.

3-O-(3-fluoribentsyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 53)

Analyysi, laskettu: C 59,3 H 5,3 F 5,9

saatu" C 59,1 H 5,1 F 5,6

35 IR-spektri: λ 1705, 1760, 3320 cm^{-1}

Massaspektri" piikkejä kohdissa 324, 309.

2,3-bis-O-(4-syaanibentsyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 54)

Massaspektri" piikkejä kohdissa 446, 431

Ei titrattavia ryhmiä.

5 IR-spektri: γ 1690, 1780, 2250, 2910, 3000 cm^{-1} .

2,3-bis-O-(2-metyylibentsyyli)-5,6-O-(1-metyylietyyli-deeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 55)

IR-spektri: γ 1705, 1780, 2950, 3020 cm^{-1}

Ei tarvittavia ryhmiä.

10 Massaspektri" piikkejä kohdissa 424, 409.

3-O-(11-hydroksiundekyyli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 56)

IR-spektri: γ 1710, 1780, 2950, 3540 cm^{-1}

Titraus: $\text{pK}_a = 10,79$

15 Massaspektri: M^+ 387

3-O-(4-syaanibutyryli)-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 57)

Titraus" pK_a 10,40

IR-spektri: γ 1700, 1765, 3000, 3514 cm^{-1}

20 Massaspektri: piikkejä kohdissa 287, 282.

3-O-metyyli-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 58)

IR-spektri: γ 1700, 1770 cm^{-1} ^1H nmr: δ 1,3-1,4 (2-singlettiä, 6H), 3,7-4,5 (multiplatti, 7H).

25 3,0-n-butyryli-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 59)

IR-spektri: γ 1700, 1770 cm^{-1}

^1H nmr: δ 0,82 (tripletti, 3H), 1,3-1,8 (multiplatti, 10 H), 3,9-4,52 (multiplatti, 6H).

30 3-O-n-heksyyli-5,6-O-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo (yhdiste 60)

IR-spektri: γ 1700, 1770 cm^{-1}

^1H nmr: δ 0,6 (2 singlettiä, 6H), 1,3-1,6 (multiplatti, 12H), 4,65-4,7 (dubletti, 1H).

35

3-O-n-dekyyli-5,6-O-(1-metyylietylideeni)-L-askorbiini-
happo (yhdiste 61)

Massaspektri: piikkejä kohdissa 356, 345

IR-spektri: λ 1700, 1770 cm^{-1}

5

^1H nmr: τ 0,5 (2 singlettiä, 6H), 1,3 -1,7 (multipletti, 20H), 4,65- 4,7 (dubletti, 1H),

3-O-(2-metoksietyyli)-5,6-O-(1-metyylietylideeni)-L-askor-
biinihappo (yhdiste 62)

10

IR-spektri: λ 1700, 1770 cm^{-1}

^1H nmr: δ 1,3-1,4 (2 singlettiä, 6H), 5,38 (singletti, 3H), 3,6-4,72 (multipletti, 8H).

Esimerkki 7

15

2-O-bentsyyli-3-O-n-heksadekyyli-L-askorbiinihapon (yh-
diste 63) valmistus

3-O-n-heksadekyyli-L-askorbiinihapon (0,933 g) liuos 7,5 ml:ssa vedetöntä DMF:ää lisättiin hitaasti huoneen lämpötilassa tyypikehässä. NaH:n (2,45 mol) suspensioon 10 ml:ssa vedetöntä DMF:ää 50 ml:n 3-kaulapullossa, joka oli varustettu magneettisekoittajalla, kuivausputkella ja tiputus-suppilolla. Reaktioseosta sekoitettiin 25 minuuttia (kunnes H_2 -kehitys lakkasi), jolloin 3-O-n-heksadekyyli-L-askorbiinihapon natriumsuola (2-OH-ryhmään) oli muodostunut. Seokseen lisättiin bentsyylikloridin (0,295) liuos 2 ml:ssa vedetöntä DMF:ää. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa noin 50 minuuttia, sitten lämpötila kohotettiin 90°C :seen ja sekoittamista jatkettiin tässä lämpötilassa vielä 50 minuuttia. Reaktioseos jäähdytettiin, ja siihen lisättiin kyllästettyä NaCl-vesiliuosta. Saatu vesipitoinen seos uutettiin etyyliasetaatilla. Etyyliasetaattiuute pestiin kyllästetyllä NaCl-liuoksella ja kuivattiin. Kuivattua uutetta käsiteltiin värinpoistohiilellä, seos suodatettiin ja suodos haihdutettiin vakuumissa. Saatu keltainen siirappi kromatografoitiin silikageelillä (silikageeli 60) käyttäen eluenttina etyyliasetaatti/tolueeniseosta 1:9. Fraktiot, jotka ohutkerroskromatografian mukaan sisälsivät haluttua tuotetta, yhdistettiin ja haihdutettiin. Saatin 694 mg

(62 %:n saanto) keltaista vahamaista kiinteätä ainetta,
2-O-bentsyyli-3-O-heksadekyyli-L-askorbiinihappoa.

Analyysi, laskettu: C 70,99 H 9,45

saatu: C 71,05 H 9,63

^1H nmr: 7,35 (singletti, 5H), 5,1 (singletti, 2H)

5 Massaspektri: piikkejä kohdissa 490 (M^+), 459, 398, 338,
295, 177, 116, 91.

IR-spektri: 1761, 1672 cm^{-1} .

Kuten edellä esitettiin keksinnön mukaisilla yh-
disteillä on angiogenesis-tekijän verisuonten kehittymistä
10 edistävä tekijä toimintaa ehkäisevää vaikutusta kasvan-
naisissa (osana kasvuprosessia), jonka mekanismin avulla
kasvannainen pystyy saamaan riittävästi verta. Angiogenesis-
tekijän inhibiatiovaikutuksen osoittamiseksi in vivo voidaan
käyttää seuraavaa menetelmää.

15 3683 Morris maksakasvaimesta valmistetaan angio-
genesis-tekijän sisältäviä lysosomi-mitokondrio-pellettejä.
Pelletti laimennetaan 7-8 ml:lla 15-%:ista "Ficoll"-liuosta.
Tätä lysosomi-mitokondrio-pelletin laimennusta injektoita-
20 essa saadaan standardivärjäyksellä. Laimennus voidaan
säättää suuremmaksi tai pienemmäksi serpentiiniverisuonin
lukumäärän saamiseksi alueelle 8-10, jotta angiogenesis-
tekijän konsentraatiot olisivat vertailukelpoisia lysosomi-
mitokondrio-pelletti-konsentraation kanssa.

25 Tämän jälkeen 15 SPF/ND4 naarashiireltä (paino 20-22 g)
ajetaan karvat pois vasemmasta kyljestä, ja hiiret jaetaan
kolmee ryhmään. Yhdelle ryhmälle annetaan ihonalaisesti
kylkeen $0,20 \text{ cm}^3$ lysosomimitokondriovalmistetta laimennettua
15 %:selle "Ficollilla". Tälle hiiriryhmälle annetaan
30 sitten intraperitoneaalisesti kullekin erikseen $0,5 \text{ cm}^3$
kokeiltavan yhdisteen liuosta tai suspensiota standardi-
väliaineessa; alkuannos on tavallisesti 300 mg/kg. Jos
tämä annos on myrkyllinen, valmistetaan kaksinkertaisia
laimennuksia, kunnes kaikki hiiret kestävät kuolematta
35 yhden annoksen. Toiselle hiiriryhmälle annetaan ihon alle
kylkeen $0,2 \text{ cm}^3$ lysosomimitokondriovalmistetta "Fiklollilla"

laimennettuna ja intraperitoneaalisesti $0,5 \text{ cm}^3$ pelkkää lääkeväliainetta. Hiiret tapetaan 24 tunnin kuluttua. Jokainen hiiri asetetaan kyljelleen ajeltu puoli ylöspäin tutkimuspöydälle. Alkaen nivuksista iho leikataan suoraan eläimen selkään. Samanlainen viilto tehdään etujalan taakse. Sitten iho leikataan pitkin selkää siten, että saadaan ihokaistale kooltaan noin $2,5 \times 5 \text{ cm}$. Iho erotetaan huolella siihen liittyvästä kudoksesta pihtien ja veitsen avulla. Ihokaistale vedetään sitten taaksepäin, jolloin ihoon kiinnitetty lysosomitokondrio-istute paljastuu. Ihosuikale levitetään varovasti tasaiseksi, ja käyttäen binokulaarianatomiamikroskooppia tehdään havaintoja lysosomitokondrio-istutteen ympärille kehittyneitä serpentiiniverisuonista ja lasketaan niiden lukumäärä. Kaikki serpentiiniverisuonihavainnot tehdään käyttäen samaa mikroskooppisuurenusta ($1 \times$). Jokaisen eläinryhmän serpentiiniverisuonien lukumäärän keskiarvo lasketaan. Inhibitio-% lasketaan sitten seuraavalla kaavalla:

$$\text{inhibitio, \%} = \left\{ \frac{1 - \text{sv (kontrolliryhmä)}}{\text{sv (lääkeryhmä)}} \right\} \times 100$$

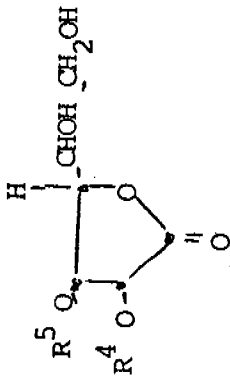
jossa sv = serpentiiniverisuonien keskimääräinen luku.

Seuraavissa taulukoissa 1, 2 ja 3 on näiden kokeiden tulokset.

Taulukossa 1 olevat yhdisteet ovat kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa R^2 ja R^3 ovat molemmat vetyjä, taulukossa 2 olevien yhdisteiden R^2 ja R^3 muodostavat 1-metyylietylideniryhmän, ja taulukossa 3 olevien yhdisteiden R^2 ja R^3 merkitsevät bentsylideniryhmää tai muuta ryhmää.

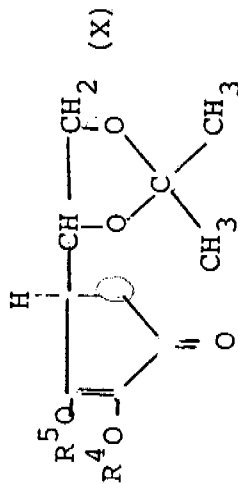
Yhtä keksinnön mukaista yhdisteen, 3-O-n-oktadekyyli-5,6-O-(1-metyylietylideni)-L-askorbiinihapon vaikutusta kasvannaisten angiogenesis-inhinitioon: kokeiltiin erilaisilla annostasoilla; näiden korkeiden tulokset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko



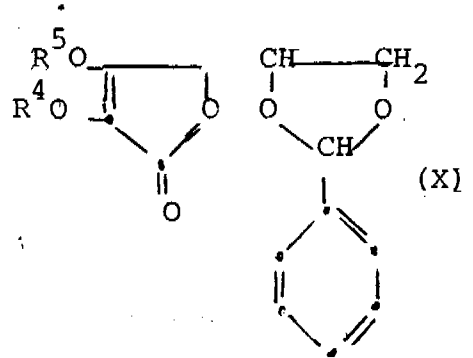
Yhdiste	R ⁵	R ⁴	Keskimääräinen inhibitio-%	Annos (mg/kg)
2	2,6-diklooribentsyyli	H	56	150-300
5	n-dodekyyli	H	59	25-300
6	3-bromibentsyyli	H	74	300
7	3-fluoribentsyyli	H	52	25
8	10-karboksi-n-dekyyli	H	41	25
9	n-pentadekyyli	H	50	300
10	n-pentadekyyli	n-pentadekyyli	38	25-300
11	2-bromietoksietyyli	H	36	300
12	3-fenoksi-propyyli	H	68	300
13	2-ftaali-imidoetyyli	H	55	300
14	n-heksadekyyli	H	31	35
15	n-heksadekyyli	n-heksadekyyli	13	25-150
17	n-oktadekyyli	H	82	25-300
18	n-oktadekyyli	n-oktadekyyli	52	25
21	3-klooribentsyyli	H	41	25
22	4-klooribentsyyli	H	36	25-300
23	3-trifluorimetyylibentsyyli	H	53	25-300
24	3-metylibentsyyli	H	54	25
25	2,5-dimetylibentsyyli	H	47	25-300
30	2-klooribentsyyli	H	55	25

Taulukko 2



Yhdiste	R^5	R^4	Keskimääräinen inhibitio-%	Annos (mg/kg)
36	H	H	48	10
39	n-oktadekyyli	H	38-82	25-300
41	2-ftaali-imidoetyyli	H	30	120
42	etoksikarbonyylimetyyli	H	12	10
44	2-bromietoksietyyli	H	71	240
45	n-oktadekyyli	H	18-85	25
46	4-syaanibutyli	n-oktadekyyli	47-82	25-150
47	4-fluoribentsyyli	4-syaanibutyli	45	37,5
48	4-nitrobentsyyli	4-fluoribentsyyli	42-85	150
49	3-fenoksiisopropyli	H	36	150
51	n-pentadekyyli	H	15-85	25-150
52	n-pentadekyyli	H	15-85	25-150
53	3-fluoribentsyyli	n-pentadekyyli	27-82	25
54	4-syaanibentsyyli	H	36-91	25
56	11-hydroksiundekyyli	4-syaanibentsyyli	67	150
57	4-syaanibutyli	H	37-72	27,5-150
58	metyyli	H	15	10
59	n-butyli	H	60	10
60	n-heksyyli	H	41	10
61	n-dekyyli	H	48	10
62	2-metoksietyyli	H	28-61	10-240

Taulukko 3



R^5	R^4	Inhibitio-%
n-butyyli	H	60
2-metoksietyyli	H	31

$\times$ 150 mg/kg annos intraperitonealisesti

Taulukko 4

3-O-n-oktadekyyli-5,6-O-(1-metyyli-etyylideeni)-L-askorbiinihapon vaikutus

Annos mg/kg	Inhibitio-%
240	71, 78 = 74,5
120	66, 78, 75, 71 = 72,5
60	72, 50 = 62,5
30	58, 38 = 48
15	45, 17 = 32

Lisäksi keksinnön mukaisen yhdisteiden on havaittu olevan käyttökelpoisia angiogenesis-inhibiittoreita metastastaasi muodostuksessa. Tällainen aktiviteetti on osoitettu keinoitekoisella metastaasi-metallilla käyttäen Madison keuhkokarsinoomaa (M 109), jonka metastaasit muodostuvat herkemmin keuhkoihin ja joka ei ole erityisen herkkä kemoterapiahoidolle. Kokeet suoritettiin seuraavasti.

Madison-keuhkometastaasikoe

- 10 Madison-keuhkokarsinooma (M 109) siirretään kudossiirtolinjana samansyntyisiin BALB C -hiiriin. Tämä kasvannaislinja saatiin kasvannaispankista Mason Research Institute, Worcester, Mass. Kasvannaismetastaasitutkimusten suorittamiseksi ihonalaisesti kehittynyt kasvannainen
- 15 leikataan irti aseptisesti, hienonnetaan saksilla pieniksi palasiksi ja trypsinoidaan huoneen lämpötilassa yksisolususpensioksi. Solut suspendoidaan "RPMI-1640"-väliaineeseen (M. A. Bioproducts, Walkersville, MD). Elinkelpoiset M 109-solut määritetään trypaanisinipoissulkemismenetelmällä, ja solukonsentraatio määritetään hemosytometrillä. Solukonsentraatio säädetään arvoon 1×10^5 elävää solua/väliaineen ml. N 109 soluja injektoidaan i.v. normaaleihin BALB/C-uroshiiriin. Ympäriäärä hiirtä kohti on 0,2 ml (2×10^4 solua). Lääkkeitä annetaan i.p. satunnaisesti
- 25 välituille 10 hiiren ryhmälle 2 vrk ennen kasvannaissoluinjektiota. Kontrollieläimet saavat 0,5 ml puskuria. Kuolleisuus todetaan päivittäin ja jokaisen ryhmän keskimääräinen hengissäpysymisaika määritetään. Tämän kokeen tulokset käytettäessä koeyhdisteenä 3-O-n-oktadekyyli-
- 30 L-askorbiinihappoa on esitetty taulukossa 5. Positiivisena kontrollina käytettiin sytoksaania. Taulukon 1 sarakkeessa on lääkekäsittely ja sarakkeissa 2 ja 3 vaurioiden lukumäärä (+ standardivirhe) keuhkoa kohti koepäivinä 30 ja 42.

Taulukko 5

	<u>Lääkekäsittely</u>	<u>Vaurioiden keskimääräinen luku</u> <u>+ standardivirhe/keuhko</u>	
	"Emulphor"-kontrolli	15,8 $\pm$ 4,6	20,6 $\pm$ 1,8
	Sytoksaani (30 mg/kg) ^x	8,4 $\pm$ 1,5	—
5	3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiini-		
	happo (35 mg/kg)	1,8 $\pm$ 1,2	18,6 $\pm$ 1,3
	3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiini-		
	happo (35 mg/kg) + sytoksaani (30 mg/kg)	1,6 $\pm$ 0,6	myrkyllinen

10 ^x
Sytoksaania annettiin joka 4, päivä i.p. alkaen päivänä 12.

Edellä olevassa kokeessa keuhkometastaasien kasunopeus ja lukumäärä olivat tavallista vähäisemmät. Toisessa määrityksessä käytettiin uutta, nopeammin keuhkovaurioita kehittävää kudossiirtolinjaa. Taulukossa 6 nähdään tämän kokeen tulokset; kokeessa käytettiin kontrollina askorbiinihappoa.

Taulukko 6

	<u>Lääkekäsittely</u> ^{xx}	<u>Vaurioiden keskimääräinen luku</u> <u>+ standardivirhe/keuhko</u>	
		<u>päivä 16</u>	
	"Emulphor"-kontrolli	69,8 $\pm$ 10,4	
	Askorbiinihappo (100 mg/kg)	33,8 $\pm$ 9,6	
25	3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiini-		
	happo (30 mg/kg)	10,7 $\pm$ 3,4	
	3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiini-		
	happo (100 mg/kg)	13,0 $\pm$ 5,1	

30 ^{xx}
Kaikkia lääkkeitä annettiin päivittäin päivästä 0 lähtien.

Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat suhteellisen myrkyttömiä; niiden LD₅₀-arvot hiirillä ovat yli 400 tai 1000 mg/kg.

35 Toinen angiogenesis-laboratoriokoe (uusien verisuonien

- muodostus) perustuu sen ajan määrittämiseen, joka tärvi-
 taan eriytyneen kasvannaisen muuttumiseen ei-eriytyneeksi
 (verisuonitetuksi). Tulehdustila edistää kasvannaisten
 kasvua ja lyhentää niiden piiloaikaa. Tässä kokeessa rot-
 tiin injektoidaan ihonsisäisesti selän ajelulle alueelle
 5 koeyhdistettä 30 minuuttia ennen ICFA-annostusta (ICFA- epä-
 täydellinen Freund-~~adjuvantti~~) + India-musteannostusta,
 jolla injektio kohta tulee merkityksi. Koeyhdistettä anne-
 taan 2 kertaa vuorokaudessa 3 vuorokauden ajan, jolloin
 jokaisen annon jälkeen on ICFA-injektio; 3 vuorokauden
 10 kuluttua kasvannainen siirretään merkitys injektio kohdan
 periferiaan. Eläimet punnitaan ja kasvannaisen koko määri-
 tetään (pituus + leveys/2) viikon väliajoin 4 viikon aikana.
 Ei-eriytyneenä kasvannaisena käytettiin Morris-maksakas-
 vainta (5123D).
- 15 Edellä olevalla koemenetelmällä 10-100 mg 3-O-n-okta-
 dekyyli-L-askorbiinihappoa annettuna oraalisesti 1-2 ker-
 taa vuorokaudessa joko esti ei-eriytyneen kasvannaisen
 kasvun tai hidasti sen kasvun alkua 4-7 vrk. Myös 0,5 cm³
 ICFA-annos annettiin jokaiselle koe-rotalle 1-2 kertaa
 20 vuorokaudessa ihonalaisesti.
- Kaavan I mukaisten yhdisteiden angiogenesis-inhi-
 biittoriominaisuuksien osoittamiseksi on käytetty vielä
 koetta, joka perustuu kollageeni-niveltulehdukseen;
 25 koe suoritetaan seuraavasti.
- Tyypin II kollageeni eristetään naudan nivelrus-
 tosta menetelmällä , jonka ovat kuvanneet Strawich ja
 Nimni /Biochemistry, 10, 3905 (1971)/. Kollageeni liuo-
 tetaan 0,1-m etikkahappoon ja liuosta säilytetään
 30 -20°C:ssa. Tyypin II kollageeniliuos laime nnetaan konsen-
 traatioon 2 mg/ml ja emulgoidaan perusteellisesti yhtä
 suureen tilavuusmäärään epätäydellistä Freund-~~adjuvanttia~~
 (ICFA). Emulsiota, jota sisältää noin 0,5 mg/ml kolla-
 geenia, injektoidaan ihonsisäisesti 6 samansukuiseen
 35 Lewis-urostrotan (Charles River Breeders. 170-200 g) selän

eri kohtiin. Tulehdusreaktion toteamiseksi kunkin rotan takajalkojen tilavuus mitataan koko kokeen aikana 3 kertaa viikossa. Eläimet saavat kokeiltavia yhdisteitä suspensiona karboksimeetyyliselluloosaväliaineessa oraalisena

5 pakkosyöttönä viitenä päivänä viikossa (maanantaista perjantaihin). Kokeen lopussa (päivä 28 tai 30) koe-eläimistä otetaan sydänpunktuurilla verta, ja seerumin anti-

tyyppi-II-kollageenin vasta-ainetasot määritetään passiivisen hemagglutinaation menetelmällä käyttäen glutar-

10 aldehydikäsiteltyjen lampaiden punasoluja, joihin on konjugoitu tyyppiä II oleva kollageeni [Avrameas et al., *Immunochemistry*, 6, 67 (1969); Andriopoulos et al., *Arth. Rheum.*, 19, 613 (1976)]. Soluvaste tai viivästynyt ylikerkkyysvaste tyyppin II kollageenille mitataan radio-

15 metrisellä korvaaindeksiokokeella (Kostiala, *Immunology*, 33, 561, 1977). Joissakin kokeissa tyyppin II kollageeni-immunisaation aiheuttamat luuvauriot ja lääkeaineiden vaikutukset määritetään jokaisen ryhmän 2-3 edustavan eläimen takajalkojen radiografista. Negatiivisena kontrollina

20 joillekin rotille annettiin injektiona ainoastaan ICFA:a.

Eräässä edellä olevalla menetelmällä suoritettussa kokeessa koe yhdisteinä oli 3-O-n-oktadekyyli-5,6-O-(1-metyylietylideeni)-L-askorbiinihappo ja 3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiinihappo, joita annettiin oraalisesti annoksina

25 50 mg/kg. Ensin mainittu yhdiste esti tyyppin II kollageeni-injektion jalkaan aiheuttaman turvotuksen noin 50-%sesti, kun sensijaan toisen yhdisteen ja ICFA-käsittelyn negatiivinen kontrolli välillä ei ollut olennaista eroa.

Toisissa kokeissa, joissa 3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiini-

30 happoa annettiin 50 mg/kg annostasolla, rottien jalan-tilavuudet olivat 90-100% pienempiä kuin rotilla, jotka oli immunoitu tyyppin II kollageenilla, mutta joita ei ollut käsitelty lääkeaineilla (positiiviset kontrollit). Käytet-

täessä 3-O-n-oktadekyyli-5,6,0-(1-metyylietylideeni)-L-askorbiinihappoa samalla annostasolla jalan tilavuus oli

35 sama kuin negatiivisessa kontrollissa.

Alemmalla 3-O-n-oktadekyyli-L-askorbiinihapon annoksilla 12,5 mg/kg annos alensi jalan tilavuutta noin 25 %, mutta 17,5 mg/kg annoksella saatu tulos ei eronnut kontrollista.

5 2,3-O-bis(n-oktadekyyli)-L-askorbiinihapon annoksilla 12,5 ja 25 mg/kg saatiin myös alentuneita jalan-tilavuusarvoja (33-67 %). 3-O-(m-trifluorimetyyli)-L-askorbiinihapon annoksella 25 mg/kg jalan tilavuus oli olennaisesti sama kuin ICFA-kontrolleissa.

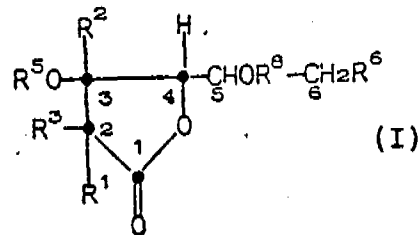
10 Seuraavilla lääkeaineilla saatiin selvää kollageenitaiheutetun turvotuksen vähenemistä (kollageenityyppin II injektio, lääkeannos 15 mg/kg p.a. 3-O-n-heptadekyyli-L-askorbiinihappo, 2,3-O-bis(4-syaanibent-syyli)-5,6-(1-metyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo, 3-O-(4-syaanibutyyli)-5,6-(1-metyylietyylideeni)-L-askor-
15 biinihappo ja 5,6-O-(1-n-dekyylietyylideeni)-L-askorbiinihappo.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää angiogenesis-inhibitioaineina joko parenteraalisesti tai oraalisesti. Oraalinen annostus on edullisempi.
20 Kaavan I mukainen yhdiste sekoitetaan sopivasti yhden tai useamman tavanomaisen farmaseuttisesti hyväksyttävän täyteaineen kanssa, kuten tärkkelyksen kanssa, ja seosta täytetään suljettaviin gelatiinikapseleihin yksikköannosmäärä tai jaettu annos.

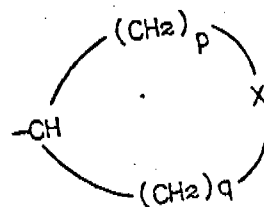
25 Vaihtoehtoisesti lääkeaine + tärkkelys + liukastusaine + muut farmaseuttisesti hyväksyttävät tarvittavat täyteaineet puristetaan tableteiksi, joista jokainen sisältää aktiivista aineosaa 100-500 mg. Tabletit voidaan varustaa jakouralla, jos tarkoituksena on käyttää alhai-
30 sempia tai jaettuja annoksia. Parenteraaliseen lääkeantoon käytetään lääkeaineen liuosta tai suspensiota. Kaikissa annostustavoissa lääkeaineen yksikköannos sisältää sellaisen määrän kaavan I mukaista yhdistettä, jolla angiogenesis inhiboituu tehokkaasti. Vuorokausiannokset nisä-
35 käillä ovat 10-100 mg/kehonpaino-kg.

Patenttivaatimukset

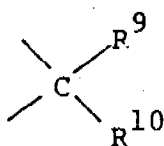
1. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jonka
kaava on



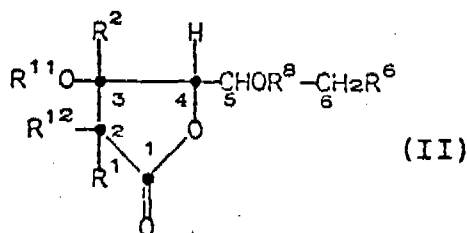
jossa R^1 ja R^2 ovat molemmat vetyjä tai muodostavat yhdessä toisen sidoksen C_2 - ja C_3 -hiilen välille, R^3 on OH, NH_2 tai OR^4 , R^5 ja R^5 ovat toisistaan riippumatta (C_1-C_{22}) alkyyli, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkenylyli, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkenylyli, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkynylyli, $-(C_1-C_{21})$ alkyyli-X- (C_1-C_{21}) alkyyli, jossa X on O, CO, S, NH, $N(C_1-C_5)$ alkyyli, SO tai SO_2 tai ne ovat yhdessä ryhmä



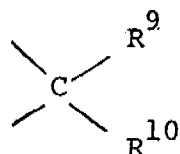
jossa X merkitsee samaa kuin edellä, ja $p+q$ on 1-6, jolloin R^4 ja R^5 ovat substituioimattomia tai substituoituja yhdellä tai kahdella seuraavista: Cl, Br, F, I, (C_1-C_5) alkoksikarbonyyli, fenoksi, OH, CF_3 , (C_1-C_5) -alkoksi, nitro, $-CH$, $-SO_3H$, $-PO_3H_2$, di- (C_1-C_5) alkyyliamino tai ftaali-imido, R^6 on H, F tai OR^7 , R^7 ja R^8 ovat toisistaan riippumatta H, (C_1-C_{12}) alkyyli tai bentsyyli tai merkitsevät yhdessä ryhmää



- 5 jossa R^9 ja R^{10} ovat toisistaan riippumatta H, (C_1-C_{10}) alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, fenyylillä tai substituoitulla fenyylillä, jonka substituenteina on yksi tai kaksi seuraavista: halogeeni, hydroksi, (C_1-C_5) alkoksi, nitro, CF_3 tai (C_1-C_5) alkyyli, tai mahdollisesti substituoitu fenyyl, jonka mahdolliset substituennit ovat samoja kuin edellä, sillä edellytyksellä, että vain toinen symboleista R^9 ja R^{10} voi olla H, t u n n e t t u siitä, että
- 10 (a) yhdiste, jonka kaava on



- 15 jossa R^1 , R^2 , R^6 ja R^8 merkitsevät samaa kuin edellä, R^{11} on H tai edellä määriteltä R^5 , ja R^{12} on OH, OR^4 tai NH_2 , sillä edellytyksellä, että R^{12} on OH, kun R^{11}
- 20 ei ole H, saatetaan reagoimaan emäksen läsnäollessa kaavan R^4Z tai R^5Z mukaisen alkylointiaineen kanssa, joissa kaavoissa Z on poistuva ryhmä, ja R^4 ja R^5 merkitsevät samaa kuin edellä tai
- 25 (b) kun R^{11} ei ole H, R^6 on OR^7 ja R^7 ja R^8 muodostavat yhdessä ryhmän
- 30



kaavan II mukaiselle yhdisteelle suoritetaan happohydrolyysi, jolloin saadaan sellainen kaavan I mukainen yhdiste, jossa R^7 ja R^8 ovat vetyjä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdiste, jossa R^1 ja R^2 muodostavat toisen sidoksen C_2 - ja C_3 -hiilen välille.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaavan II mukainen reaktantti on askorbiinihappo tai isoaskorbiinihappo tai askorbiinihapon tai isoaskorbiinihapon johdannainen.

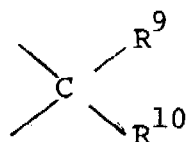
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaavan II mukainen yhdiste on L-askorbiinihappo tai sen johdannainen.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^4 tai R^5 on (C_8-C_{22}) alkyyli.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä t u n n e t t u siitä, että R^6 on OR^7 , ja R^7 ja R^8 ovat vetyjä.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^6 on OR^7 , ja R^7 ja R^8 merkitsevät yhdessä ryhmää

20

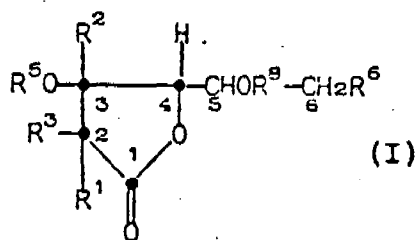


8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^9 on vety.

9. Kaavan I mukainen yhdiste valmistettuna minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-8 mukaisella menetelmällä.

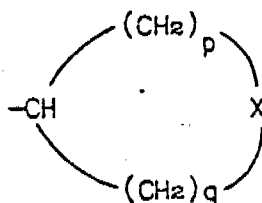
Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av en förening med formeln (I)



vari R^1 och R^2 vardera är väte eller sammangår för bildande av en andra bindning mellan C_2 och C_3 , R^3 är OH , NH_2 eller OR^4 , R^4 och R^5 är oberoende av varandra valda

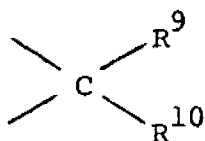
15 bland (C_1-C_{22}) alkyl, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkenyl, $-CH_2(C_2-C_{12})$ alkynyl, $-(C_1-C_{21})$ alkyl- X -($C_1-C_{21})$ alkyl, vari X är O , CO , S , NH , $N(C_1-C_5)$ alkyl, SO eller SO_2 , eller



vari X är som ovan definierats och summan av p och q är 1-6, varvid nämnda R^4 - och R^5 -grupper är osubstituerade

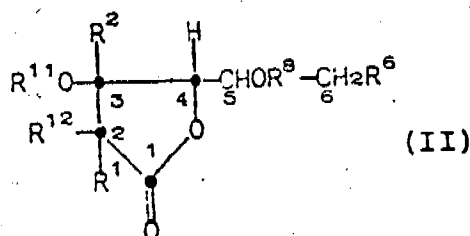
25 eller eventuellt substituerade med en eller två grupper, vilka oberoende av varandra valts bland Cl , Br , F , J , (C_1-C_5) -alkoxikarbonyl, fenoxi, OH , CF_3 , (C_1-C_5) alkoxi, nitro, $-CN$, $-SO_3H$, $-PO_3H_2$, di- (C_1-C_5) -alkylamino eller ftalimido; R^6 är H , F eller OR^7 ; R^7 och R^8 , tagna separat,

30 har oberoende av varandra valts bland H , (C_1-C_{12}) alkyl och bensyl, eller, tagna tillsammans, betecknar

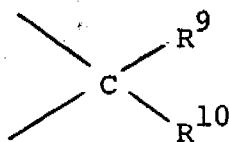


vari R^9 och R^{10} oberoende av varandra valts bland H, en (C_1-C_{10}) alkylgrupp som eventuellt substituerats med halogen, fenyl eller substituerad fenyl, varvid nämnda eventuellt fenylsubstituenten består av en eller två grupper, vilka oberoende av varandra valts bland halogen, hydroxi, (C_1-C_5) -alkoxi, nitro, CF_3 och (C_1-C_5) alkyl; eventuellt substituerad fenyl, vari nämnda eventuella fenylsubstituenten är som ovan definierats; med villkor att endast den ena av R^9 och R^{10} kan vara H; k ä n n e t e c k n a t d ä r a v , a t t

a) en förening med formeln (II)



vari R^1 , R^2 , R^6 och R^8 är som ovan definierats, R^{11} är H eller R^5 som ovan definierats, och R^{12} är OH, OR^4 eller NH_2 , med villkor att R^{12} är OH ifall R^{11} är annat än H, reageras med ett alkyleringsmedel med formeln R^4Z eller R^5Z , vari Z är en avgående grupp, och R^4 och R^5 är som ovan definierats, i närvaro av en bas, eller b) då R^{11} är annat än H, R^6 är OR^7 och R^7 och R^8 sammangår för bildande av



utsätts föreningen med formeln (II) för syrahydrolys för erhållande av en produkt med formeln I, vari R^7 och R^8 är väte.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t d ä r a v , a t t R^1 och R^2 sammangår för bildan-

de av en andra bindning mellan C_2 och C_3 .

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att reaktanten med formeln II är
askorbinsyra eller isoaskorbinsyra eller ett derivat
5 av askorbinsyra eller isoaskorbinsyra.

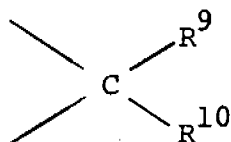
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att reaktanten med formeln II är
L-askorbinsyra eller ett derivat därav.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4,
10 k ä n n e t e c k n a t därav, att R^4 eller R^5 är (C_8 -
 C_{22})alkyl.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5,
k ä n n e t e c k n a t därav, att R^6 är OR^7 och R^7 och
 R^8 är vardera väte.

15 7. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5,
k ä n n e t e c k n a t därav, att R^6 är OR^7 och att
 R^7 och R^8 sammangår för bildande av

20



8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att R^9 är väte.

25 9. Förening med formeln (I) närhelst den fram-
ställts genom ett förfarande enligt något av patentkra-
ven 1-8.